Filogenetički odnosi i genska raznolikost roda Squalius (Cypriniformes, Actinopteri) u jadranskom slijevu

Kristina, Čavlović

Doctoral thesis / Disertacija

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:090996

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb



PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

Kristina Čavlović

FILOGENETIČKI ODNOSI I GENSKA RAZNOLIKOST RODA *SQUALIUS* (CYPRINIFORMES, ACTINOPTERI) U JADRANSKOM SLIJEVU

DOKTORSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Davor Zanella

Zagreb, 2019.

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Kristina Čavlović

PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS AND GENETIC DIVERSITY OF THE GENUS *SQUALIUS* (CYPRINIFORMES, ACTINOPTERI) IN ADRIATIC SEA BASIN

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor: prof. dr. sc. Davor Zanella

Zagreb, 2019

„Ovaj je doktorski rad izrađen na Zoologijskom zavodu, pod vodstvom prof. dr. sc. Davora Zanelle, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu“.

INFORMACIJE O MENTORU

ZANELLA, Davor (Zagreb, 19. travnja 1973.)

Redoviti profesor, 235863

U Zagrebu je završio osnovnu i srednju školu. Maturirao je 1992. g. na V. gimnaziji, a iste je godine upisao studij biologije, smjer profesor biologije na PMF-u u Zagrebu. Diplomirao je 1997. g. Od 2000. g. zaposlen je u Zoologijskom zavodu kao znanstveni novak. Godine 2003. obranio je magistarski rad, a 2007. i doktorsku disertaciju. Na mjesto docenta izabran je 2009., 2013. g. u izvanrednog profesora, a 2019. u redovitog profesora. Usavršavao se iz ekologije slatkih voda (određivanje kvalitete vode pomoću biotičkog indeksa) i populacija riba riječnih tokova i jezera u Laboratoriju za ihtiologiju i plankton Sveučilišta u Trstu, boravio je u Tromsu, Norveška na stručnom usavršavanju iz područja ihtiologije u sklopu projekta "Management of Freshwater Fisheries of Bordering Rivers" u NIVA (Norwegian Institute for Water Research). Do 2009. g. vodi praktikume na preddiplomskom studiju iz kolegija Kralježnjaci, kao i terensku nastavu iz zoologije. Od 2009. g. nositelj je ili sunositelj kolegija Vertebrata, Upravljanje prirodnim populacijama, Ekologija i zaštita prirode, Zoologija 3 (Kralježnjaci), Ihtiologija, Akvakultura i ribarstvo slatkih voda i Akvakultura za studente preddiplomskog i diplomskog studija različitih smjerova. Sudjeluje u terenskoj nastavi iz navedenih kolegija. Voditelj je i 12 diplomskih radova te dva magistarska i 15 završnih radova. Njegova znanstvena djelatnost obuhvaća istraživanja raznolikosti i staništa slatkovodnih riba Hrvatske, posebno endemskih vrsta (inventarizaciju i utvrđivanje stupnja ugroženosti te bioloških i ekoloških značajki pojedinih vrsta). Drugo područje njegova znanstvenog rada usmjereno je na proučavanje prirodnih populacija te njihovom upravljanju. Objavio je kao autor ili koautor 51 znanstveni rad (41 u časopisima indeksiranim u CC, 10 u časopisima indeksiranim u drugim sekundarnim i tercijarnim bazama), Koautor tri knjige te jednog poglavlja u knjizi. Sudjelovao na međunarodnim skupovima s 46 priopćenja te domaćim skupovima s 12 priopćenja. Sudjelovao je na brojnim međunarodnim i domaćim skupovima sa 60-tak priopćenja. Aktivno je sudjelovao u izvedbi triju znanstvena projekta. Bio je i suradnik na dva međunarodna projekta Jedan je od osnivača, tajnik i blagajnik te član Upravnog odbora Hrvatskog ihtiološkog društva od 1999. godine. Od 2005. do 2012. g. je tajnik, blagajnik i član Upravnog odbora Hrvatskog ekološkog društva.

ZAHVALE

Stvaranje ove doktorske disertacije ne bi bilo moguće bez svih izvanrednih ljudi koji su bili uz mene tijekom dobrih i loših trenutaka.

Najveća hvala prof. dr. sc. Davoru Zanelli koji mi je omogućio izradu rada pod svojim mentorstvom, pružajući mi veliko znanstveno iskustvo. Hvala na svim korisnim savjetima i mirnoći koja mi je pomogla da ostanem fokusirana na sam znanstveni rad, te bezrezervnom željom za pomoć u svakom trenutku. Zahvaljujem se na velikoj strpljivosti u svim trenucima neuspjeha i nepredvidivih događaja tijekom cijelog puta.

Ogromno hvala doc. dr. sc. Ivani Buj na odvojenom vremenu koje mi je posvetila, te na svom prenešenom znanju i pomoći oko laboratorijskih metoda i računalnih programa, bez čega bih u više slučajeva bila potpuno izgubljena. Isto tako, želim se zahvaliti i na periodu osamostaljenja, bez čega ne bih naučila samostalno znanstveno razmišljati.

Isto tako, htjela bih se zahvaliti svim djelatnicima Laboratorija za vertebrata Zoologijskog zavoda, koji su mi omogućili vrlo ugodan boravak te znanstvenu podršku. Osobito bih se zahvalila dr. sc. Zoranu Marčiću za slike i svu pomoć oko terenskih pitanja.

Veliko hvala svim kolegama sa Zavoda za humanu reprodukciju KBC-a Rijeka, bez čijeg razumijevanja ne bi bili mogući svi moji izostanci zbog potreba istraživanja i pisanja ove disertacije. Veliko hvala prof. dr. sc. Nedi Smiljan Severinski na započetom putu, a posebno hvala kolegicama Lindi, Tamari i Vanji na svim pretrpljenim „fazama“, razumijevanju, dizanju morala i savjetima koji su doprinijeli znanstvenom sazrijevanju.

Posebna zahvala ide dragim prijateljima i kolegama, Miljenku i Petri, bez kojih se ne bih upustila u ovo putovanje. Vaše vjerovanje i stalno podupiranje davalo mi je vjetar u leđa. Jelka, hvala ti na smještaju i psihološkoj podršci, te neiscrpnom izvoru smijeha. Hvala Tini, Ivani, Ani, Jeleni i Korani i svim ostalim prijateljima koji su bili zakinuti za druženja kroz svo ovo vrijeme, ali uvijek s razumijevanjem.

Posebno veliko hvala mojoj obitelji, mami i tati, jer bez vašeg truda i odricanja ostvarenje ovog sna ne bi bilo moguće. Hvala na bezuvjetnoj ljubavi i podršci koju nikad nisam izgubila, a niti morala tražiti.

Na kraju, Ivane, hvala ti što si nam krojio život dok sam se ja borila s računalnim simulacijama. Hvala ti na konstantnoj potpori, ljubavi i motivaciji, a posebice na zdravom i ukusnom jelovniku.

Još jedno hvala - Mucanu i Mucki. Uz njih je svako ostajanje doma uz znanstveni rad bilo puno lakše.

Sveučilište u Zagrebu Doktorski rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

FILOGENETIČKI ODNOSI I GENSKA RAZNOLIKOST RODA *SQUALIUS* (CYPRINIFORMES, ACTINOPTERI) U JADRANSKOM SLIJEVU

KRISTINA ČAVLOVIĆ

Zoologijski zavod

Rod *Squalius* (Leuciscidae, Cypriniformes) živi u slatkovodnim vodotocima Europe i Azije, s velikom raznolikosti u mediteranskoj regiji. Cilj istraživanja bio je razriješiti taksonomske nedoumice klenova rijeka jadranskog slijeva u Hrvatskoj i BiH, te odrediti rasprostranjenosti pojedinih vrsta, povezanost populacija i razinu genske raznolikosti, te ugroženost pojedinih populacija u svrhu djelotvornije zaštite. Filogenetička rekonstrukcija napravljena na mitohondrijskim i jezgrinim molekularnim biljezima (*cyt b*, *rhod*, *rag1* i S7) pokazala je dvije nezavisne, genetički udaljene evolucijske grupe: mediteransku (*S. svallize*, *S. microlepis*, *S. tenellus*, *S. illyricus* i *S. zrmanjae*) i *S. cephalus* grupu (*S. squalus*), zahvaljujući davnom vremenu divergencije. Na raznolikost navedenih vrsta najviše je utjecala alopatrijska specijacija, čemu je doprinijela i prirodna hibridizacija. Ovim istraživanjem nije potvrđeno postojanje istarske vrste *S. janae*, te se predlaže da se taj naziv koristi kao mlađi sinonim vrste *S. squalus*. Manja zabilježena unutarvrsna genska raznolikost u dalmatinskoj regiji objašnjava se povećanom osjetljivosti klenova na antropogene utjecaje.

(197 stranica, 48 slika, 47 tablica, 301 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski jezik)

Ključne riječi: *filogenetička rekonstrukcija, raznolikost vrsta, taksonomija, mitohondrijski i jezgrini molekularni biljezi, genska udaljenost, dijagnostička mjesta, migracije.*

Mentor: Davor Zanella, prof. dr. sc.

Ocjenjivači: Ivana Buj, doc. dr. sc., Marko Ćaleta, izv. prof. dr. sc.; Ana Galov, izv. prof. dr. sc.

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Doctoral Thesis

PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS AND GENETIC DIVERSITY OF THE GENUS *SQUALIUS* (CYPRINIFORMES, ACTINOPTERI) IN ADRIATIC SEA BASIN

KRISTINA ČAVLOVIĆ

Division of Zoology

Background: Genus *Squalius* (Leuciscidae, Cypriniformes) inhabits european and asian freshwater bodies, with particularly high diversity in Mediterranean area. The taxonomic status of many populations is still matter of debate. This paper constitute first attempt at deciphering mitochondrial and nuclear relationships of Adriatic *Squalius* species.

Aim: The aim of this investigation was to resolve taxonomic uncertainties of the Adriatic chubs from Croatia and Bosnia and Herzegovina and to determine distribution of species, population's connection, status and genetic diversity for future conservation purposes. Also, to test biogeographical hypotheses that could have determined the current distribution of Adraitic *Squalius* species.

Methods: In order to reveal phylogeographic and population genetic structure of the genus *Squalius* in the Adriatic watershed, samples from 19 localities in Croatia and Bosnia and Herezegovina were obtained. The isolation of DNA, gel electrophoresis, PCR and sequencing of DNA from frozen fin tissue. Selective neutrality of mutations and recombinations was tested by statistical tests D* and F*, Tajima test and recombination test. Haplotype variants of nuclear genes in heterozygous individuals were resolved using a Bayesian statistical method with 1000 iterations. Phylogenetic resconstruction was based on mitochondrial and nuclear genetic markers (cytochrome *b*, rhodopsin, recombination activating gene 1 and first intron of ribosomal protein S7). The complete mitochondrial cytochrome *b* (total of 1140 bp) from 166 sequences belonging to the *Squalius* species was obtain from Adriatic rivers, Europe and Asia. For the nuclear phylogenetic analysis, a subsets of 158 *rhod* sequences (782 pb), 136 *rag1* sequences (1443 pb) and 47 S7 sequences (726 pb) was selected. Phylogenetic

reconstruction was constructed using maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML) and Bayes (BAY) methods. For MP and ML analyses a heuristic search mode with 100 replicates and tree bisection-reconnection (TBR) branch swapping algorithm was used. Phylogenetic relationships among populations from Istria, Dalmatia and Herzegovina were investigated by a statistical parsimony and median joining methods. Divergence times estimation was conducted using the Bayesian MCMC coalescent method only on *cyt b* sequences (strict molecular clock model).

Results: Neutrality tests suggested no evidence of selection, while recombination test showed no traces of recombination for all investigated genes. The results revealed high diversity of chubs in the investigated area. All genetic markers revealed the existence of two independent, genetically distinct evolutionary groups: The first one, Mediterranean group, comprising species *S. svallize*, *S. microlepis*, *S. tenellus*, *S. illyricus* and *S. zrmanjae*, whereas the second group corresponds with *S. squalus*. All Istrian samples clustered inside *S. squalus* lineage. Specimens of hybrid origin were found in Pazinčica, Ljuta, Trebišnjica, Krka, Zrmanja as well as in the Ravno karstic field. Separation of two main phylogenetic groups occured in late oligocene-early miocene, while diversification of Adriatic *Squalius* species is of younger origin. Genetic distinctiveness of species belonging to different groups is very high, due to an old age of their divergence.

Conclusions: The paraphyletic origin of Adriatic chubs imply multiple colonization events of chubs on Adriatic area. The main divergence force for Adriatic *Squalius* species was allopatric speciation together with the phenomenon of recorded ongoing and past natural hybridization events. This investigation did not confirm the existence of the *S. janae* species. It has been recommended that name of *S. janae* can be used as a junior synonim for *S. squalus* species. Surprisingly, no high genetic diversity was recorded for any of the investigated species which is alarming, and it should be taken into account while considering conservational plans. Smaller genetic diversity than expected is noticed in chubs from Dalmation area and explained by higher sensitivity on anthropogenic influences and pollution.

(197 pages, 48 pictures, 47 tables, 301 references, original in: croatian)

Supervisor: Davor Zanella, prof. dr. sc.

Reviewers: Ivana Buj, doc. dr. sc.; Marko Ćaleta, Assoc. prof. dr. sc.; Ana Galov, Assoc. prof. dr. sc.

Key words: *phylogenetic reconstruction, species diversity, taxonomy, mitochondrial and nuclear molecular markers, genetic distinctiveness, diagnostic sites, migrations.*

Sadržaj

1. UVOD 2

1.1. Raznolikost i sistematika klenova 2
1.2. Razvoj filogenije 13
1.3. Polazna hipoteza 26
1.4. Svrha, cilj i opseg rada 27
2. LITERATURNI PREGLED 28

2.1. Problemi u dosadašnjem određivanju taksonomske pripadnosti unutar skupine klenova 28
2.2. Dosadašnja istraživanja filogenije i filogeografije roda Squalius 30
2.3. Porijeklo potporodice Leuciscinae na mediteranskom području 31
2.4. Hibridizacija i hibridogeneza u klenova 34
2.5. Stupanj ugroženosti i zaštita klenova u Hrvatskoj 35
3. MATERIJALI I METODE 39

3.1. Područje istraživanja 39
3.2. Prikupljanje uzoraka 60
3.3. Popis korištenih kemikalija, setova reagensa, puferskih otopina i laboratorijske opreme 63
3.4. Izolacija DNA 64
3.5. Umnažanje fragmenata DNA lančanom reakcijom polimeraze (PCR) 65
3.6. Elektroforetsko odjeljivanje umnoženih fragmenata DNA 67
3.7. Određivanje primarne strukture DNA (sekvenciranje) 67
3.8. Računalne analize 67
3.9. Filogenetičke analize 69
4. REZULTATI 87

4.1. Testovi neutralnosti mutacija i rekombinacije za sve ispitivane gene 87
4.2. Raznolikost i geografska distribucija haplotipova 91
4.3. Filogenetički odnosi unutar klenova jadranskog slijeva 103
4.3.1. Filogenetička rekonstrukcija mitohondrijskog *cyt b* gena 103
4.3.2. Filogenetička rekonstrukcija prema jezgrinim genskim biljezima 109
4.3.3. Usporedba filogenetičke rekonstrukcije istraživanih genskih biljega 126
4.3.4. Hibridne jedinke 130
4.4. Vremena divergencije klenova jadranskog slijeva 132
4.5. Dijagnostička mjesta 134
4.5.1. Gen za citokrom b 134
4.5.2. Gen za rodopsin 135
4.5.3. Gen za aktivaciju rekombinacije 136
4.6. Genska raznolikost 137
4.6.1. DNA polimorfizam svih ispitivanih gena klenova jadranskog slijeva 137
4.6.2. Genska raznolikost mitohondrijskog *cyt b* gena jadranskih vrsta *Squalius* 139
4.6.3. Genska raznolikost istraživanih jezgrinih gena (*rhod* i *rag1*) jadranskih vrsta *Squalius* 145
5. RASPRAVA 154

6. ZAKLJUČCI 170

7. POPIS LITERATURE 175

1. UVOD

1.1. Raznolikost i sistematika klenova

Vrste roda *Squalius* taksonomski pripadaju potporodici Leuciscinae, porodici Leuciscidae, podredu Cyprinoidei, redu šaranki (Cypriniformes) i razredu zrakoperki (Actinopteri) (Fricke i sur., 2018.) unutar potkoljena kralješnjaka (Vertebrata) i koljena svitkovaca (Chordata). Šaranke općenito karakteriziraju vrste sa ždrijelnim zubima za usitnjavanje hrane te s modificiranim sustavom kralješaka koji zajedno s mišićima, ligamentima i plivaćim mjehurom čine Weberov aparat koji povezuje plivaći mjehur i unutrašnje uho, omogućavajući na taj način prijenos zvuka, što im je omogućilo vrlo dobro snalaženje i preživljavanje, uz veliku raznolikost vrsta (Kottelat i Freyhof, 2007.). Sistematika unutar šaranki oduvijek je predmet mnogih rasprava (Cavender i Coburn, 1992., Brito i sur., 1997., Gilles i sur., 1998., Gilles i sur., 2001., Doadrio i Carmona, 2006., Wang i sur., 2007., Tao i sur., 2013.), a po najnovijim filogenetičkim analizama status potporodice Leuciscinae uzdignut je do statusa porodice Leuciscidae (Bufalino i Mayden, 2010a. i b., Mayden i Chen, 2010., Stout i sur., 2016., Schönhuth i sur., 2018.). Budući da noviji radovi upućuju na porodično stanje skupine Leuciscidae, ovaj rad vodit će se tom klasifikacijom. Opće su značajke porodice Leuciscidae odsudstvo brkova, kratka leđna peraja s nenazubljenom, nerazgranatom zadnjom šipčicom i ždrijelni zubi u jednom ili dva reda. S 35 poznatih rodova i preko 180 opisanih vrsta koje naseljavaju cijelu palearktičku regiju (sjeverni dio Azije, Afrike, Europa i Sjeverna Amerika), potporodica Leuciscinae predstavlja jednu od najraširenijih u Europi, s najvećom zastupljenosti u Europi i na Srednjem istoku (Freyhof i sur., 2005.). S obzirom na veliku raznolikost potporodica predstavlja i odličan model za istraživanje biogeografske prošlosti sredozemnog područja (Perea i sur., 2010.). Unutar potporodice sistematika i razumijevanje evolucijske prošlosti otežani su zbog velike brojnosti i raznolikosti leuciscina. Postojeća taksonomija često se ne slaže s morfološkim i molekularnim podacima, što zahtijeva nova istraživanja (Kottelat i Freyhof, 2007.). Neki su europski klenovi donedavno ubrajani u rod *Leuciscus*, no morfološkim i genetičkim analizama utvrđeno je da se radi o genski odvojenoj skupini riba od roda *Leuciscus* (Bogutskaya, 1994., Doadrio i Carmona, 1998.) pa su prema pravilima zoologijske nomenklature vraćeni u prvotno opisani rod *Squalius*.

Unutar potporodice Leuciscinae rod je *Squalius* široko rasprostranjen diljem Europe i Bliskog istoka s velikom raznolikosti unutar sredozemnog područja (Doadrio i Carmona, 1998., Zardoya i Doadrio, 1998., Durand i sur., 2000., Doadrio i Carmona, 2003.). U

sredozemnoj je regiji velik udio lokaliziranih vrsta na pojedine sljevove (Kottelat i Freyhof, 2007., Bogutskaya i Zupančič, 2010.), što regiju čini „vrućom točkom“ bioraznolikosti i time posebno zanimljivom za istraživanja. Do danas je opisano oko 50-ak vrsta klenova roda *Squalius* (Froese i Pauly, 2019.), dok se nove vrste još uvijek otkrivaju i opisuju pa se taksonomski i sistematski položaj ove skupine još uvijek razmatra. Naime, postoje najmanje četiri neopisane i neimenovane vrste na Balkanu (Sanjur i sur., 2003., Doadrio i Carmona, 2006., Kottelat i Economidis, 2006., Stomboudi i sur., 2006., Doadrio i sur., 2007a., Kottelat i Freyhof, 2007., Zupančič, 2008.) s potpuno nepoznatim filogenetičkim odnosima. Dosad priznate vrste roda *Squalius* prikazane su u Tablici 1. Većina navedenih vrsta *Squalius* analizirana je u velikoj filogenetičkoj rekonstrukciji potporodice Leuciscinae (Perea i sur., 2010., Perea i sur., 2016.), ali s malim brojem uzoraka po vrsti.

Klenovi roda *Squalius* su vrlo raznolika skupina u kojoj se mogu naći predstavnici malih vrsta veličine oko 10 cm (*S. svallize* Heckel & Kner, 1858) pa sve do vrsta koje narastu i više od 60 cm u dužinu (*S. squalus* Bonaparte, 1837). Naziv roda *Squalius* dolazi od latinske riječi *squaleo*, što znači „s grubom kožom“. Naime, tijelo klenova je uobičajeno prekriveno s izraženim velikim ljuskama, osim kod vrsta *S. microlepis* Heckel, 1843 i *S. tenellus* Heckel, 1843 za koje su karakteristične sitne ljuske. Tijelo klena je vretenasto i lagano bočno spljošteno, s cjelovitom bočnom prugom. Glava je uska s razmjerno malim i mesnatim, završnim ili poludonjim ustima, te ždrijelnim zubima položenim u dva reda. Tamnijih su leđa, dok su bokovi metalnosrebrnkasti, a trbuh je srebrne do bijele boje. Tamne pruge nisu izražene na bokovima, što ih razlikuje od vrsta roda *Telestes*. Osim toga, karakterizira ih 8-11½ razgranatih šipčica analne peraje i 7-9½ razgranatih šipčica leđne peraje (Kottelat i Freyhof, 2007.).

Tablica 1. Popis trenutno priznatih vrsta roda *Squalius* (Froese i Pauly, 2019.)

Vrsta	**Država**	**Literatura**
S. adanaensis Turan, Kottelat & Doğan, 2013	Turska	Turan i sur., 2013.
S. alburnoides Steindachner, 1866	Portugal, Španjolska	Collares-Pereira i Coelho, 2010.
S. albus Bonaparte, 1838	Italija	Kottelat i Freyhof, 2007.
S. anatolicus Bogutskaya, 1997	Turska	Fricke i sur., 2007.
S. aphipsi Aleksandrov, 1927*	Rusija	Kottelat i Freyhof, 2007.
S. aradensis Coelho, Bogutskaya, Rodrigues & Collares-Pereira,1998	Portugal	Kottelat i Freyhof, 2007.
S. aristotelis Özuluğ & Freyhof, 2011	BiH, Turska	Özuluğ i Freyhof, 2011.
S. berak Heckel, 1843	Sirija	Turan i sur., 2013.
S. cappadocicus Özuluğ & Freyhof, 2011	Turska	Özuluğ i Freyhof, 2011.
S. carinus Özuluğ & Freyhof, 2011	Turska	Özuluğ i Freyhof, 2011.
S. carolitertii Doadrio, 1988	Portugal, Španjolska	Carmona i Doadrio, 2000.
S. castellanus Doadrio, Perea & Alonso, 2007	Španjolska	Doadrio i sur., 2007b.
S. cephaloides Battalgil, 1942	Turska	Özuluğ i Freyhof, 2011.
S. cephalus Linnaeus, 1758	Armenija, Azerbajdžan, Finska, Francuska, Gruzija, Hrvatska, Iran, Rusija, Švedska, Turkmenistan, Turska, Velika Britanija	Kottelat i Freyhof, 2007.
S. cii Richardson, 1857	Turska	Stoumboudi i sur., 2006.
S. fellowesii Günther, 1868	Turska	Turan i sur., 2013.
S. ghigii Gianferrari, 1927	Grčka	Bogutskaya, 1996.
S. illyricus Heckel & Kner, 1858	Hrvatska	Kottelat i Freyhof, 2007.
S. janae Bogutskaya & Zupančič, 2010	Hrvatska	Bogutskaya i Zupančič, 2010.
S. keadicus Stephanidis, 1971	Grčka	Economidis, 1996.
S. kosswigi Karaman, 1972	Turska	Turan i sur., 2009.
S. kottelati Turan, Yilmaz & Kaya, 2009	Sirija, Turska	Turan i sur., 2009.
S. laietanus Doadrio, Kottelat & de Sostoa, 2007	Andora, Francuska, Španjolska	Doadrio i sur., 2007a.
S. lepidus Heckel, 1843	Turska	Bogutskaya, 1994.

Tablica 1. - nastavak

S. lucumonis Bianco, 1983	Italija	Kottelat i Freyhof, 2007.
S. malacitanus Doadrio & Carmona, 2006	Španjolska	Doadrio i Carmona, 2006.
S. microlepis Heckel, 1843	BiH, Hrvatska	Kottelat i Freyhof, 2007.
S. moreoticus Stephanidis, 1971	Grčka	Kottelat i Freyhof, 2007.
S. orientalis Heckel, 1847**	Turska	Turan i sur., 2009.
S. orpheus Kottelat & Economidis, 2006	Bugarska, Grčka, Makedonija, Srbija, Turska	Kottelat i Economidis, 2006.
S. pamvoticus Stephanidis, 1939	Albanija, Grčka	Kottelat i Freyhof, 2007.
S. peloponensis Valenciennes, 1844	Grčka	Kottelat i Freyhof, 2007.
S. platyceps Zupančič, Marić, Naseka & Bogutskaya, 2010	Albanija, Crna Gora, Makedonija	Zupančič i sur., 2010b.
S. prespensis Fowler, 1977	Albanija, Grčka, Makedonija	Doadrio i Carmona, 2006.
S. pursakensis Hankó, 1925	Turska	Turan i sur., 2013.
S. pyrenaicus Günther, 1868	Portugal, Španjolska	Kottelat i Freyhof, 2007.
S. recurvirostris Özuluğ & Freyhof, 2011	Turska	Özuluğ i Freyhof, 2011.
S. seyhanensis Turan, Kottelat & Doğan, 2013	Turska	Turan i sur., 2013.
S. spurius Heckel, 1843	Sirija, Turska	Bogutskaya, 1997.
S. squaliusculus Kessler, 1872	Kazahstan, Kirgistan, Uzbekistan	Doadrio i Carmona, 2006.
S. squalus Bonaparte, 1837	BiH, Hrvatska, Italija, Slovenija, Švicarska	Kottelat i Freyhof, 2007.
S. svallize Heckel & Kner, 1858	BiH, Hrvatska	Crivelli, 1996.
S. tenellus Heckel, 1843	BiH, Hrvatska	Kottelat i Freyhof, 2007.
S. torgalensis Coelho, Bogutskaya, Rodrigues & Collares-Pereira, 1998	Portugal	Kottelat i Freyhof, 2007.
S. turcicus De Filippi, 1865	Turska	Doadrio i Carmona, 2006.
S. ulanus Günther, 1899	Iran	Doadrio i Carmona, 2006.
S. valentinus Doadrio & Carmona 2006	Španjolska	Doadrio i Carmona, 2006.
S. vardarensis Karaman, 1928	Albanija, Bugarska, Grčka, Makedonija, Srbija	Kottelat i Freyhof, 2007.
S. zrmanjae Karaman, 1928	Hrvatska	Kottelat i Freyhof, 2007.

* - došlo je do promjene roda u *Petroleuciscus* (Perea i sur., 2010.); ** - potrebno je preimenovanje vrste

Rijeke jadranskog slijeva Hrvatske i Bosne i Hercegovine (BiH) imaju izuzetno bogatu i specifičnu ihtiofaunu zahvaljujući svom geografskom položaju. U jadranskom slijevu Hrvatske po recentnoj taksonomiji obitava sedam vrsta klenova: ilirski klen (*S. illyricus*), istarski klen (*S. janae*), makal (*S. microlepis*), sitnoljuskavi klen (*S. tenellus*), svalić (*S. svallize*), bijeli ili primorski klen (*S. squalus*) i zrmanjski klen (*S. zrmanjae*). Osim velike bioraznolikosti rijeke jadranskog slijeva odlikuje i visok stupanj endemizma. Jedan od glavnih razloga velikog broja endema jest činjenica da ova područja nisu bila pod značajnim glacijacijskim utjecajima te su služila kao refugijska utočišta. Uz planine, podzemne špilje i otoke, krške rijeke jadranskog slijeva predstavljaju glavne centre endemske flore i faune (Radović, 1999.). Od sedam spomenutih vrsta klenova, šest je endema jadranskog slijeva koji većinom naseljavaju krške vodotokove južnog dijela Dalmacije i Hercegovine. Osim primorskog klena, sve su navedene vrste klenova endemi jadranskog slijeva. Dodatno, istarski klen predstavlja i stenoendem Istre, dok je zrmanjski klen endem Hrvatske (Ćaleta i sur., 2015.). Vrste klenova jadranskog slijeva zajedno s geografskim rasprostranjenjem prikazane su u Tablici 2.

Tablica 2. Rasprostranjenost vrsta klenova u slatkim vodama jadranskog slijeva Hrvatske i Hercegovine (prema literaturnim podacima)

Latinski naziv	**Hrvatski naziv**	**Rasprostranjenost u Hrvatskoj i BiH**
S. illyricus Heckel & Kner, 1858	Ilirski klen	Cetina, gornji i srednji tok Krke (Ćaleta i sur., 2015.)
S. janae Bogutskaya & Zupančič, 2010	Istarski klen	Slijev rijeke Dragonje (Bogutskaya i Zupančič, 2010.), Boljunšćica, Pazinčica (Zupančič i sur., 2010a.)
S. microlepis Heckel, 1843	Makal	Ričica (Kottelat i Freyhof, 2007.), Neretva, Matica, Baćinska jezera i Prološko blato kod Imotskog (Ćaleta i sur., 2015.)
S. squalus Bonaparte, 1837	Primorski klen, bijeli klen	Neretva (Bogutskaya i Zupančič, 1999.), sve istarske rijeke (Kottelat i Freyhof, 2007.), Krka (Freyhof, 2013.)
S. svallize Heckel & Kner, 1858	Svalić, strugač, sval	Ljuta (Kottelat i Freyhof, 2007.), donji dio toka Neretve, rijeka Matica, jezera u blizini Vrgorca i Baćinska jezera. U BiH: Rama, Buna, Trebišnjica i Hutovo blato (Ćaleta i sur., 2015.)
S. tenellus Heckel, 1843	Sitnoljuskavi klen	U Hrvatskoj: gornji dijelovi rijeka Cetine i Rude. Krški vodotoci Livanjskog polja te Buško blato i Mandečko jezero u BiH (Ćaleta i sur., 2015.).
S. zrmanjae Karaman, 1928	Zrmanjski klen	Zrmanja, Krka, Ričica (Ćaleta i sur., 2015.).

Istarski klen, *S. janae*, živi u slijevu rijeke Dragonje u Sloveniji i Hrvatskoj (Dragonja, Pazinčica, Boljunšćica; Zupančič i sur., 2010a., Freyhof, 2011a.). Jedinke narastu i do 35 cm dužine (Ćaleta i sur., 2015.). Karakterizira ih izdužena glava, veličine oko 30% standardne dužine tijela s velikim okom promjera 19-25% dužine glave. Njuška je zašiljena i konična te natkriva pomalo poludonja usta s dugim i ravnim usnim otvorom. Na tijelu se može zamijetiti nepovezanost između leđnog profila glave i tijela. Tijelo im je obojano svijetlosrebrnkastom bojom, dok su prsna, trbušna, podrepna peraja i šarenica žućkasto osjenčani. Na ljuskama bočne pruge nazire se nekoliko crnih točaka te je prisutna crna pigmentacija na džepovima ljusaka, što stvara izgled crnih okomito posloženih točaka (Slika 1). Uobičajeno imaju 44-47 ljusaka u bočnoj pruzi i 9½ razgranatih šipčica u analnoj peraji, te ukupno 44 kralješka (Bogutskaya i Zupančič, 2010.). Vrsta nastanjuje male rijeke i potoke koji često presušuju ljeti, za vrijeme kojeg preživljava u bazenima (Zupančič i sur., 2010a.). Odrasle jedinke sa zrelim gonadama pronađene su u svibnju i ranom srpnju, a jedinke koje su se već izmrijestile pronađene su u kasnom srpnju. Prehrana im se sastoji od algi, biljnog materijala i detritusa (Bogutskaya i Zupančič, 2010.).



Slika 1. Istarski klen, *S. janae* (Foto: Perica Mustafić)

Squalius squalus, poznat kao bijeli ili primorski klen, autohton je za područje jugoistočne Europe, a obitava na području Švicarske, Italije (Po), Slovenije (Osapska reka, Rižana, slijev Soče), Hrvatske (Mirna) i BiH (Zupančič i sur., 2010a., Freyhof, 2011b.). Vrsta je pripadala rodu *Leuciscus,* ali je preimenovana u rod *Squalus* (Kottelat i Freyhof, 2007.). Područje rasprostranjenosti ograničeno je pretežno na slijev Ligurskog, Tirenskog i Jonskog mora (od Genove do najjužnijih talijanskih predjela), te na jadranski slijev od rijeke Ofanto u južnoj Italiji do rijeke Krke (Kottelat i Freyhof, 2007., Freyhof, 2011b.). U odnosu na *S. janae*, jedinke primorskog klena imaju kraću glavu, okrugliju njušku te kraći usni otvor horizontalnog položaja, uz još neke morfometrijske razlike. Mogu narasti i do 60 cm dužine.

Dužina glave iznosi 26-29% standardne dužine tijela (Bogutskaya i Zupančič, 2010., Zupančič i sur., 2010a.). U bočnoj pruzi nalazi se 40-45 (+2-3) ljuski (Kottelat i Freyhof, 2007.). Posteriorni dio podrepne peraje izbočen je ili ravan, a sadrži 8-10½ šipčica. Leđna peraja sadrži 8½ šipčica (Kottelat i Freyhof, 2007.). Tijelo je tamnije boje sa smeđim i brončanim tonovima. Podrepna, prsna i trbušna peraja također su tamnije boje, a mogu se uočiti i crveni ili narančasti tonovi. U bočnoj se pruzi nalaze ljuske s crnim pigmentom raspoređenim po rubovima čineći uobičajeni mrežasti uzorak (Bogutskaya i Zupančič, 2010., Zupančič i sur., 2010a.). Čest je stanovnik manjih rijeka i plitkih dijelova potoka s brzim protokom vode, uz mogućnost preživljavanja sušnih razdoblja prilikom kojih se njihovo stanište ograniči na vrlo plitka područja. Ličinke i juvenilne jedinke pojavljuju se u skupinama uz obalu u vrlo plitkim staništima, dok su odrasle jedinke više solitarne naravi. Primorski se klen mrijesti na plitkim dijelovima potoka s brzim protokom vode ili uz obalu sporo tekućih nizinskih rijeka, kao i u manjim planinskim potocima, u razdoblju od travnja do srpnja kada temperatura vode poraste iznad 14°C (Freyhof, 2011b.). Ženke se počinju razmnožavati između 3. i 5. godine, te se mrijeste u više navrata tijekom sezone kada se jedna ženka mrijesti s više različitih mužjaka. Mužjaci ranije počinju s reprodukcijom (od 1. do 3. godine), kada se okupljaju na područjima mrijesta prateći zrele ženke prema plićim područjima uz živahno i izrazito prskanje. Ženke ostavljaju svoja ljepljiva jaja u iskopinama u šljunku, nakon čega ih oplode mužjaci u pratnji. Prehrana im se sastoji od raznolikih vodenih i kopnenih životinja te od biljnog materijala, dok se odrasle jedinke najviše prehranjuju drugim ribama (Kottelat i Freyhof, 2007.). Mogu živjeti i do 15 godina (Freyhof, 2011b.). Ova se vrsta konzumira te se lovi u svrhu sportskog ribolova, ali joj je status ugroženosti najmanje zabrinjavajuć (Slika 2) (Freyhof, 2011b.).



Slika 2. Primorski klen, *S. squalus* (Foto: preuzeto iz Bogutskaya i Zupančič, 2010.)

Svalić ili *S. svallize* donedavno je pripadao rodu *Leuciscus*, no nakon ustanovljenih molekularnih razlika na *cyt b* genu vrsta je vraćena u prvotno opisani rod *Squalius* (Zardoya i Doadrio, 1999., Sanjur i sur., 2003., Doadrio i Carmona, 2006.). Jedinke ove vrste nastanjuju krške rijeke, a autohtone su za jezera pokraj Vrgorca i šire područje slijeva Neretve (Ćaleta i sur., 2015.). Rasprostranjen je u Hrvatskoj, BiH i Albaniji, međutim areal vrste nije potpuno utvrđen, a postoje i taksonomske dvojbe. U BiH zabilježen je u Neretvi sve do Jablaničkog jezera, te u njezinim pritocima Rami, Buni, Trebišnjici, u Bilečkom jezeru, Hutovom blatu te u ponornicama Ravnog polja (Ćaleta i sur., 2015.), dok je u Hrvatskoj zabilježen i u rijeci Ljuti (Bogutskaya i Zupančič, 2010.). Karakterizira ga vitko tijelo dužine do 20 cm pokriveno velikim ljuskama (Ćaleta i sur., 2015.), iako su zabilježene i veće muške jedinke do 27.7 cm u Hutovom blatu (Dulčić i sur., 2009.). Glava je uska, s uskim i zaobljenim čelom, a oko promjera 19-23% dužine glave. Usta su poludonja, mala i nakošena, te gornja usna prekriva donju. Leđa su tamnosive boje, bočne su strane srebrne, a trbuh bijele boje (Slika 3). U bočnoj pruzi nalazi se 44-51 ljuska s redom crnog pigmenta stvarajući mrežasti uzorak, dok su prednje polovice izloženih polja bočnih ljuska bez crnih točaka. Leđna peraja sadrži 8-9½ razgranatih šipčica, dok podrepna peraja sadrži 9-10½ (uobičajeno 10½) razgranatih šipčica (Kottelat i Freyhof, 2007.). Živi uglavnom u jatima u bržim krškim tekućicama te se hrani malenim vodenim beskralješnjacima i njihovim ličinkama. Pretpostavlja se da se tijekom sušnog dijela godine povlači u podzemlje (Ćaleta i sur., 2015.). Odrasle jedinke nastanjuju vode sa sporijim tokom. Bentopelagička je vrsta koja se mrijesti na kamenitoj podlozi u tekućoj vodi od travnja do lipnja (Kottelat i Freyhof, 2007.), a odgovara joj temperatura vode 10-26°C (Baensch i Riehl, 1997.).



Slika 3. Svalić, *S. svallize* (Foto: Perica Mustafić)

Zrmanjski je klen, *S. zrmanjae*, endem jadranskog slijeva i hrvatski endem, a predstavlja uobičajenu vrstu u rijekama Krki i Zrmanji. Unesen je i u Ričicu prepumpavanjem vode iz Zrmanje radi potreba reverzibilne hidroelektrane Velebit (Ćaleta i sur., 2015.). Vrsta je također pripadala rodu *Leuciscus*, ali je preimenovana u rod *Squalius* zbog ustanovljenih razlika (Zardoya i Doadrio, 1999., Bogutskaya, 2002., Sanjur i sur., 2003.). Produženog je i bočno spljoštenog tijela dužine do 28 cm (Ćaleta i sur., 2015.). Leđni je profil pomalo zaokružen. Gornji je profil glave izbočen, a glava je uska s izduženom njuškom i kraćom donjom čeljusti s poludonjim ustima. Oko je promjera 24-28% dužine glave, nešto manje od dužine njuške. Karakteristično je odsudstvo pete infraorbitalne kosti ili je vrlo malena ukoliko postoji. Leđne i podrepne peraje blago su izbočenih ili ravnih rubova (Slika 4). Leđna peraja obično sadrži 8½ dok analna peraja sadrži 9½ razgranatih šipčica. Na bočnoj pruzi nalazi se 44-49 ljusaka. Tijelo je srebrnkaste boje, sa svjetlijim trbuhom i tamnijim leđima. Ljuske iznad bočne pruge odlikuju džepovi s istaknutim crnim trokutastim poljem bez pigmenata na slobodnim rubovima (Kottelat i Freyhof, 2007.). Zrmanjski je klen reofilna vrsta koja živi u krškim tekućicama i njihovim ujezerenim dijelovima. Kao mlade jedinke žive u jatu, a kad odrastu žive solitarno. Hrane se algama, zoobentosom, planktonom, ličinkama vodenih kukaca i sitnim ribama (Mrakovčić i sur., 2006.).



Slika 4. Zrmanjski klen, *S. zrmanjae* (Foto: Perica Mustafić)

Squalius illyricus, odnosno ilirski klen je endem jadranskog slijeva koji živi u slijevu Cetine (akumulacije Peruča i Prančevići, rijeka Ruda) te gornjim i srednjim dijelovima rijeke Krke, uključujući Šareno jezero pokraj Knina, Brljansko jezero i Visovačko jezero. Ime ilirskog klena dolazi od zemlje Ilirije koju su u prošlosti naseljavala ilirska plemena. Ova je

vrsta također nekad pripadala rodu *Leuciscus*, ali je preimenovana u prvotno opisan rod (Kottelat i Freyhof, 2007.). Ilirski je klen prvi put opisan u rijeci Soči u Sloveniji i Italiji (Heckel i Kner, 1858.), ali je točnost tih podataka upitna s obzirom na to da je zadnji nalaz bio pred 150 godina (Kottelat i Freyhof, 2007.). Vrsta je u prošlosti zabilježena i na području Albanije (Crivelli, 1996.). Trenutna je distribucija ograničena na sljevove rijeke Cetine i Krke. Tijelo mu je vretenastog oblika duljine do 40 cm (Ćaleta i sur., 2015.). Glava je uska s tupom njuškom, kraćom donjom čeljusti i poludonjim, razmjerno malim i mesnatim usnama. Promjer oka je 18-34% HL u manjih jedinki (dužina tijela: 9-15 cm), a 16-18% u većih jedinki (iznad 25 cm dužine tijela). U bočnoj pruzi nalazi se 46-54 ljuske sa širokim crnim mrljama na džepovima uz vidljivu pigmentaciju na slobodnim rubovima (nejasno kod mladih jedinki). Zaobljene prsne peraje okrenute su unatrag. Leđna peraja sadrži 8½ razgranatih šipčica, dok je podrepna peraja sa 8-9½ razgranatih šipčica. Peraje su žute do crne boje (Kottelat i Freyhof, 2007.). Leđa su tamnije boje, trbuh je srebrnobijele, a bočne su strane metalnosrebrne boje (Slika 5). Bentopelagička je vrsta koja živi u čistim i brzim krškim rijekama te jezerima temperature vode 5-25°C (Baensch i Riehl, 1997.). Ilirski se klen hrani raznim biljnim i životinjskim vrstama, a mrijesti se od početka svibnja sve do kraja lipnja (Mrakovčić i sur., 2006.).



Slika 5. Ilirski klen, *S. illyricus* (Foto: Perica Mustafić)

Ime vrste *S. tenellus* potječe od latinskog *tenerum* što znači elegantan, nježan, a u Hrvatskoj se zbog svojih sitnih ljusaka naziva sitnoljuskavim klenom, te predstavlja endem jadranskog slijeva (Slika 6). Duljina tijela mu doseže i do 40 cm (Ćaleta i sur., 2015.). Od

drugih se klenova razlikuje po najvećem broju ljusaka u bočnoj pruzi (76-85) te završnim ustima. Sitnoljuskavi klen naseljava spore tekućice i jezera, te ulazi u podzemne vode tijekom zime ili suše (Kottelat i Freyhof, 2007.). Rasprostranjen je na području gornjih dijelova rijeka Cetine i Rude, te krških vodotoka Livanjskog polja, Buškog blata i Mandečkog jezera u BiH. Nije posve sigurno je li obitavao u Cetini i Rudi ranije ili je unesen iz Buškog blata kroz cjevovod hidroelektrane (HE) Orlovac (Ćaleta i sur., 2015.). Mrijesti se od travnja do lipnja. Bentopelagička je vrsta. U jezerima se odrasle jedinke hrane drugim ribama (Freyhof i Kottelat, 2008.).



Slika 6. Sitnoljuskavi klen, *S. tenellus* (Foto: Preuzeto iz Kottelat i Freyhof, 2007.)

Makal ili *S. microlepis* (Slika 7) naseljava jezero Proložac kod Imotskog, sljevna područja rijeke Matice i Neretve te Baćinska jezera (Ćaleta i sur., 2015.). Vrsta je prethodno bila uvrštena u rod *Leuciscus*. Tijelo je vretenasto duljine 20-25 cm, iako može narasti i do 30 cm (Ćaleta i sur., 2015.), dok je maksimalna prijavljena veličina 34 cm (Kottelat i Freyhof, 2007.). Karakteriziraju ga sitne ljuske po kojima je vrsta dobila i ime (lat. *micro* - sitan i *lepis* - ljuska) i slabo uočljiva tamna pruga na bočnoj strani tijela. Usta su završna. Bočna pruga sadrži 67-75 ljusaka. Leđa su tamnosiva, bočne su strane metalnosrebrne, dok je trbuh bijele boje. Peraje su svijetložute boje s 8½ razgranatih šipčica u leđnoj i podrepnoj peraji (Kottelat i Freyhof, 2007.). Jedinke makala žive u sporim vodotokovima i čistim jezerima na području slijeva rijeke Neretve. Bentopelagička je vrsta, a prehranjuje se malim vodenim beskralješnjacima, dok se odrasle jedinke hrane malim ribama (Mrakovčić i sur., 2006.).



Slika 7. Makal, *S. microlepis* (Foto: Perica Mustafić)

Između jadranskih vrsta mala je varijabilnost u glavnim meurističkim osobinama koje se većinom koriste u taksonomskim istraživanjima, kao što su broj šipčica u perajama, broj ljusaka, broj škržnih šipčica i broj kralješaka, što otežava točnu procjenu stvarne raznolikosti ovog roda na osnovi morfologije. Unatoč brojnim istraživanjima, taksonomski status i filogenetički odnosi klenova još su uvijek nerazjašnjeni, a vrste poput *S. tenellus, S. svallize* i *S. janae* upitnog su taksonomskog statusa te su filogenetički odnosi s obzirom na te vrste gotovo potpuno nepoznati (Doadrio i Carmona, 2006., Bogutskaya i Zupančič, 2010., Ćaleta i sur., 2015.).

1.2. Razvoj filogenije

Filogenija je znanstvena disciplina u kojoj se proučavaju srodstveni odnosi vrsta od pojave zajedničkog pretka do danas, temeljem usporedbe sličnosti istraživanih naslijeđenih karakteristika. Pretpostavka je da srodni organizmi često sliče međusobno te da dijele zajedničkoga pretka. Međutim, osim što je sveukupna sličnost među organizmima rezultat naslijeđa od zajedničkog pretka (**homologija**), ona može biti i rezultat sličnog načina života. U tom slučaju određeni dijelovi tijela preuzimaju sličnu funkciju, što rezultira većom sličnosti među organizmima koji nisu srodni (**analogija ili homoplazija**). Jedino su homologne osobine informativne u filogenetičkim istraživanjima. Organizmi koji dijele mnoge naslijeđene homologne osobine grupiraju se zajedno u hijerarhijske jedinice uz pristup **kladistike** ili **filogenetičke sistematike** (Edwards i Cavalli-Sforza, 1964.). Klasični način

procjene srodstvenih odnosa u svrhu taksonomije temelje se na usporedbi morfoloških karakteristika (Linnaeus, 1758.). Te su metode i dalje najzastupljenije među taksonomima. Međutim, različitost organizama ne odražava se samo u fenotipskim karakteristikama, već i na ultrastrukturnim, biokemijskim i molekularnim razinama. U zadnje se vrijeme sve više filogenetičkih istraživanja temelji na molekularnim podacima, kao dodatak morfološkoj procjeni (Lipscomb, 1998.).

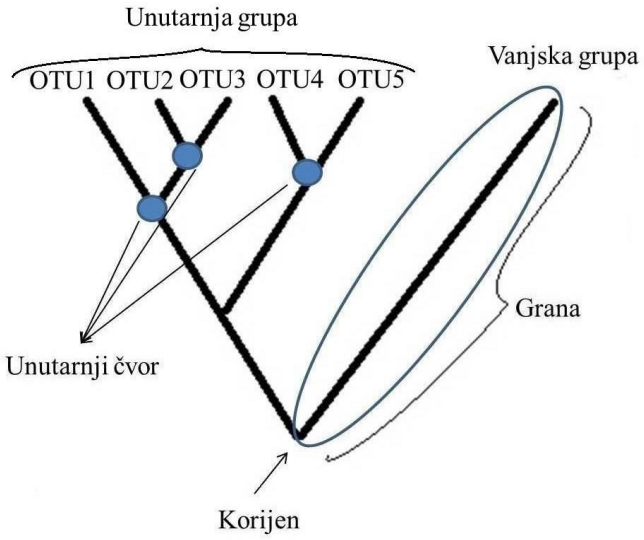
Osim toga, analiza genske raznolikosti unutar vrsta vrlo je važna za razumijevanje evolucijskih procesa na populacijskoj i genskoj razini. Kako bi se dobio uvid u evolucijska zbivanja određene populacije, potrebno je znanje i o populacijskoj dinamici i o povijesnim evolucijskim događajima (Excoffier i Heckel, 2006.). **Filogeografija** je znanstvena disciplina koja analizira geografsku rasprostranjenost genskih linija (Avise, 2000.). Obrasci distribucije genskih linija nastaju pod djelovanjem evolucijskih sila, poput prirodne selekcije. Trenutne metode populacijske genetike mogu dati precizne informacije o demografiji populacije, kao što su širenje taksona i pojave migracija (Templeton i sur., 1995.).

Razvojem tehnologije krajem 80-ih godina prošlog stoljeća omogućen je pristup sve većem broju DNA sekvenca, što omogućava razvoj molekularne filogenije (Delsuc i sur., 2005.). **Molekularna filogenija**, poznata i kao **filogenetika** ili **molekularna sistematika**, znanstvena je disciplina koja proučava evolucijske odnose gena i drugih bioloških makromolekula analizom mutacija (točkaste mutacije, insercije, delecije), pod uvjetom da su istraživane sekvence homologne. Mutacije koje se prenose na potomstvo, a koegzistiraju s izvornom genskom sekvencom, rezultiraju genskim polimorfizmom (Vandamme, 2009.). Uspoređivanjem sličnosti sekvenca (količina identičnih nukleotida u odnosu na dužinu sekvence) donosi se zaključak o genealogiji gena sve do najbližeg predačkog ili ancestralnog gena, s obzirom na to da se izvorni geni još uvijek mogu nalaziti u populaciji. Razlike unutar sekvenca utječu na gensku divergenciju kao posljedicu molekularne evolucije tijekom vremena. Genska divergencija posljedično uzrokuje specijaciju, odnosno stvaranje nove vrste (Patwardhan i sur., 2014.). Međutim, filogenija zaključena na temelju genskih sekvenca isključivo opisuje evoluciju tog određenog gena. Stoga, evolucija određene sekvence ne mora nužno odgovarati evolucijskom putu istraživane vrste (Pamilo i Nei, 1988.). Istraživana sekvenca može evoluirati puno brže ili sporije u odnosu na druge gene u genomu ili može imati drugačiju evolucijsku prošlost od ostatka genoma zahvaljujući događajima poput horizontalnog prijenosa gena, hibridizacije, rekombinacije itd. Prema tome, evolucija neke vrste rezultat je kombinirane evolucije višestrukih gena u genomu (Xiong, 2006.). Tako, u filogenetičkom smislu, prema informativnosti, gene razlikujemo na ortologne i paralogne.

Ortolozi uzrokuju odvojenu evoluciju zbog specijacije i filogenetički su informativni na razini vrste, dok paralozi, kao rezultat duplikacijskih događaja, otkrivaju evoluciju genske obitelji, a ne vrste (Harrison i Langdale, 2006.). Stoga, konstruiranje filogenetičkog stabla zahtijeva analizu većeg broja gena kako bi se smanjile pogreške u filogenetičkoj interpretaciji (Galtier i Gouy, 1995.).

Srodstveni odnosi između istraživanih taksonomskih jedinica prikazuju se filogenetičkim stablom u obliku razgranatog dijagrama. Na filogenetičkom stablu način grananja prikazuje razvoj evolucijskih linija vrsta koje nastaju procesom specijacije. Svako mjesto grananja, ili unutarnji čvor, predstavlja događaj divergencije dviju vrsta, odnosno događaj specijacije koja potencijalno započinje novu filogenetičku liniju. Na svakom čvoru prikazan je hipotetski najbliži zajednički predak od kojeg su potekle sve vrste na granama koje izlaze iz čvora. Vanjski, završni čvorovi prikazuju istraživane taksonomske jedinice, odnosno operacijske taksonomske jedinice (eng. operational taxonomic unit; OTU) u filogenetičkom smislu, jer zapravo proizlaze iz genskih sekvenca (Nipperess, 2016., Mysara i sur., 2017.). Uzorak grananja na stablu predstavlja topologiju stabla, prikazujući razgranate hijerarhijske srodstvene odnose među taksonima. Kako bi se prikazao smjer evolucijskog procesa, filogenetička se stabla obično ukorjenjuju. U tom slučaju korijen prikazuje položaj posljednjeg zajedničkog pretka od kojeg su svi organizmi na stablu evoluirali, a određuje se na temelju fosilnih podataka ili, češće, dodavanjem jedne ili više vanjskih grupa (eng. outgroup). Vanjska grupa nije dio ispitivanog uzorka, a od ostalih ima najstariju sekvencu te je srodstveno najudaljeniji takson u odnosu na sve ostale u tzv. unutarnjoj grupi (eng. ingroup) u stablu (Slika 8). Nasuprot tome, neukorijenjena stabla prikazuju relativne odnose među organizmima, bez informacija o zajedničkom pretku (Lipscomb, 1998., Vandamme, 2009.).

Tri su glavna tipa srodstvenih odnosa koja se mogu prepoznati na stablu: monofilija, parafilija i polifilija (Hennig, 1966.). U monofiletičkoj grupi, svi taksoni dijele jedinstvenog zajedničkog pretka. Ukoliko taksoni dijele više zajedničkih predaka, grupa se naziva parafiletičkom. Polifiletičke skupine nastaju konvergentnom evolucijom, kada zajednička karakteristika koja podržava grupiranje skupine nedostaje u najbližem zajedničkom pretku (Kitching i sur., 1998.).



Slika 8. Sastavni dijelovi filogenetičkog stabla

Dihotomija je tip račvanja grana na samo dvije razvojne linije potomaka. Ukoliko iz čvora izlazi više od dviju grana (**multifurkacijski čvor**), takvo se grananje naziva **politomijom**, što može biti rezultat radijacije, istovremenog razvijanja višestrukih evolucijskih linija. Pojava politomije može upućivati i na nerazriješenu filogeniju u kojoj se točan redoslijed grananja ne može precizno ustanoviti (Xiong, 2006.). Filogenetička stabla mogu se prikazivati kao **kladogram** ili **filogram**. U kladogramu se sestrinske grupe nalaze na istoj udaljenosti od roditeljske vrste, a onaj sestrinski takson koji je zadržao više pleziomorfnih (primitivnih) obilježja uvijek je orijentiran lijevo od roditeljskog. Duljine grana nisu proporcionalne s brojem evolucijskih promjena i nemaju filogenetičko značenje. Za razliku od kladograma, filogrami su filogenetička stabla u kojima je duljina grana proporcionalna broju evolucijskih promjena i vremenu divergencije filogenetičkih linija. Jedino filogrami imaju filogenetičko značenje. Vrste koje dijele nedavnog zajedničkog pretka u bližem su srodstvu od vrsta koje dijele davnijeg pretka (Lipscomb, 1998.).

Razvojem tehnologije se u svrhu filogenetičke rekonstrukcije uz morfološke karakteristike sve više koriste molekularne značajke. Molekularni su biljezi specifični nukleotidni sljedovi mitohondrijskog (mtDNA) ili jezgrinog (nDNA) genoma (kodirajuće i nekodirajuće regije) koji su korisni za otkrivanje filogenetičkih odnosa između srodnih skupina organizama. U svrhu filogenetičke rekonstrukcije najčešće se koriste biljezi mtDNA iz više razloga. Lako umnažajući mtDNA pojavljuje se u višestrukim kopijama u stanici, a genski mu je sadržaj bez introna s vrlo rijetkim pojavama duplikacije ili delecije, dok su intergenske nekodirajuće regije vrlo kratke (Wolstenholme, 1992., Meyer, 1993., Gissi i sur., 2008.). Istovremeno, mtDNA je vrlo varijabilan zbog povećane mutacijske stope u odnosu na

nDNA dajući informaciju o populacijskoj prošlosti kroz kraće vremenske periode (Galtier i sur., 2009.). Mitohondrijski se DNA nasljeđuje klonalno po majčinoj liniji, što znači da se, iz perspektive populacijske genetike, ponaša kao jedan jedini nerekombinirajući lokus (Avise, 1991.). To bi značilo da sva nukleotidna mjesta na mtDNA dijele zajedničku genealogiju, čime se značajno pojednostavljuje prikaz i analiza podataka unutar istraživanih OTU. Tako se povijest mtDNA unutar vrste može prikazati jednim stablom koje prikazuje izvore i geografska kretanja majčinskih razvojnih linija (Avise i sur., 1987.). Sve nabrojane karakteristike predstavljaju prednost u filogenetičkom istraživanju zbog toga što homologija u mitohondrijskim genskim sekvencama najvjerojatnije predstavlja ortologiju - sličnost stvorenu specijacijom, prije nego paralogiju - sličnost stvorenu genskom duplikacijom (Kumazawa i sur., 2004.). Međutim, populacijska su istraživanja na životinjskom mtDNA pokazala pojave koje upućuju na rekombinacijske događaje, što ukazuje na potreban oprez kod interpretacije genealogija mtDNA unutar vrste (Ladoukakis i Zouros, 2001., Hoarau i sur., 2002., Andolfatto i sur., 2003., Gantenbein i sur., 2005., Ciborowski i sur., 2007., Ujvari i sur., 2007.).

U usporedbi s nDNA, mtDNA 5-10 puta brže akumulira promjene u sekvenci, što dovodi do bržeg zasićenja razlika u sekvencama, a to pak otežava procjenu vremenskog okvira u kojem se promjena dogodila (Brown i sur., 1982., Irwin i sur., 1991.). Direktna posljedica višestrukih supstitucija može se prikazati kao efekt homoplazije (Xiong, 2006.). Višestruke supstitucije na istim mjestima otežavaju preciznost procjene vremena divergencije filogenetičkih razvojnih linija. U tom slučaju u obzir treba uzeti i broj onih supstitucija koje su trenutno sakrivene saturacijom, što zahtijeva korištenje odgovarajućeg modela nukleotidne evolucije (Arbogast i sur., 2002.). Suprotno od mtDNA, analize jezgrinih gena obuhvaćaju informaciju i o patrilinearnom nasljeđivanju te pokazuju brojne prednosti kod procjene vremena divergencije unutar bliskih srodnika zbog višestrukih izvora varijacija (poput rekombinacijskih događaja). Međutim, one predstavljaju problem u analizi zbog manje brzine nakupljanja mutacija (Arbogast i sur., 2002.). Današnja se istraživanja temelje na kombiniranoj analizi nekoliko jezgrinih (He i sur., 2008.) i mitohondrijskih genskih biljega u svrhu razjašnjavanja kompleksnih odnosa unutar istraživanih taksona, odnosno OTU-a. Geni iz jezgre pokazuju puno veću konzistentnost u zadržavanju istih nukleotida (indeks retencije), dok mitohondrijski geni nude više informativnih mjesta za parsimoniju (Perea i sur., 2010.).

U ovom istraživanju koristili su se podaci iz sekvenca gena za mitohondrijski citokrom *b* (*cyt b*), jezgrinih gena za rodopsin (*rhod*), gena za aktivaciju rekombinacije (*rag1*, eng. recombination activating gene) te prvog introna jezgrinog gena za ribosomalni protein S7

(S7). Dosadašnja su istraživanja pokazala da su stope supstitucija mitohondrijskog *cyt b* gena dovoljno informativne za korištenje u istraživanju filogenetičkih odnosa unutar roda *Squalius* na razini vrste i populacije (Brito i sur., 1997., Durand i sur., 1999., Zardoya i Doadrio, 1999., Doadrio i Carmona, 2003., Sanjur i sur., 2003., Doadrio i Carmona 2006., Perea i sur., 2010., Buj i sur., 2015a.). Prvi intron jezgrinog gena za ribosomalni protein S7 i *rag1* gen već su korišteni za filogenetičku rekonstrukciju mediteranskih vrsta klenova (Perea i sur., 2010.). Analiza gena za rodopsin nedavno se pokazala korisnom u razjašnjavanju taksonomskih konflikata donoseći dodatne informacije (Behrens-Chapuis i sur., 2015.).

Tragovi evolucije u obliku genskih mutacija ostaju na određenim dijelovima genske sekvence, što omogućava identifikaciju zajedničkog porijekla uspoređenih sekvenca. Dijelovi sekvence koji su važni za bitne funkcionalne i strukturne uloge imaju tendenciju očuvanja putem prirodne selekcije. Ostali dijelovi sekvence koji su manje važni za funkciju organizma, mnogo brže nakupljaju mutacije. Za usporedbu sekvenca, nukleotidne pozicije moraju biti poravnate. S obzirom da se svaki filogenetički zaključak donosi na temelju višestrukog sravnjenja, precizno sravnjivanje sekvenca jedan je od najvažnijih koraka u pripremi filogenetičkog procesa. Sravnjivanjem se pronalazi najbolje uparenje dviju analiziranih sekvenca s maksimalnim podudaranjem nukleotidnih pozicija.

Odabir evolucijskog modela

Evolucijski modeli koriste se za opisivanje procesa nastanka genske varijacije kroz fiksirane mutacije te čine temelj za analizu evolucije na molekularnoj razini. Način na koji su se mutacije događale ne može biti sigurno utvrđen, ali se mogu pretpostaviti određeni modeli koji opisuju način na koji je došlo do mutacijskih događaja. Tako se zna da se zbog steričkih uvjeta češće događaju zamjene između nukleotidnih baza jednake kemijske prirode (tranzicije) nego između baza različite kemijske prirode (transverzije) (Kimura, 1980.). Osim toga, poznato je da stopa mutacije varira s obzirom na poziciju u sekvenci zbog toga što na različite pozicije mogu utjecati različiti evolucijski procesi. Naime, u kodirajućim genskim regijama zamjena trećeg kodona najčešće nema utjecaja na završnu strukturu polipeptidnog lanca - istoznačne mutacije, pa će se mutacije tu brže nakupljati u odnosu na prvi i drugi kodon, gdje mutacije dovode do promjene aminokiselinskog sastava - neistoznačne mutacije (Strimmer i von Haeseler, 2009.).

Pri odabiru evolucijskog modela uzimaju se u obzir različite frekvencije nukleotida koje se pojavljuju kao posljedica fizikalno-kemijskih karakteristika nukleotida (Felsenstein, 1981.). Osim toga koriste se još i parametri poput broja supstitucijskih tipova ili razreda, te

varijacija u brzini supstitucije između nukleotidnih mjesta (Tavaré, 1986.). Najčešće korišten model je općeniti reverzibilni model (eng. generalised time reversible; GTR), koji pretpostavlja različite frekvencije nukleotidnih baza te različite stope mutacija ovisno o vrsti nukleotida u zamjeni, dok su drugi samo specifični slučajevi tog istog modela (Xiong, 2006.). Velik je izazov dobiti pouzdanu procjenu broja supstitucijskih promjena zbog zasićenosti određenih pozicija višestrukim supstitucijama, na kojima je nemoguće utvrditi točan broj i vrstu supstitucija koje su izbrisane novim mutacijama (Arbogast i sur., 2002.).

S obzirom da se filogenetički zaključak na kraju donosi iz posteriornih vjerojatnosti koje se temelje na zajedničkim vjerojatnostima stabala izračunatih prema modelu nukleotidne evolucije, vrlo je važno odrediti dobar supstitucijski model koji će uz primijećeni broj supstitucija dati precizniju informaciju o brzini molekularne evolucije u određenoj genskoj regiji (Arbogast i sur., 2002.). Testiranje najboljih modela u odnosu na empirijske podatke istraživanih sekvenca provodi se testom odnosa vjerojatnosti (eng. likelihood ratio test; LRT) ili informacijskih kriterija (Arbogast i sur., 2002.). Informacijskim se kriterijima uspoređuju svi evolucijski modeli međusobno, uz dodavanje kaznenih bodova funkcijom broja parametara u modelu. Što je veći broj parametara, odnosno što je kompleksniji evolucijski model, to su veći kazneni bodovi. Modeli se uspoređuju na temelju podataka o frekvencijama nukleotidnih baza, odnosa tranzicija/transverzija, jednakosti tranzicijskih stopa, postojanja nepromjenjivih pozicija i odnosa homogenosti između pozicija (Posada, 2009.). Dva su uobičajena informacijska kriterija - Akaikeov (AIC; Akaike, 1974.) i Bayesov informacijski kriterij (BIC; Schwarz, 1974.).

Osnovni principi filogenetičkih metoda

Prilikom filogenetičke rekonstrukcije koristi se više metoda za dobivanje stabla kako bi se donio što točniji filogenetički zaključak. Metode se razlikuju ovisno o tome koriste li diskretna stanja značajki (diskretne metode) ili matrice udaljenosti dobivenih iz različitosti sekvenca (metode distance). Kod molekularnih istraživanja skup diskretnih značajki predstavljaju nukleotidne baze u sekvenci (ili aminokiselinski slijed u proteinima). Nezavisno se uspoređuje stanje svake značajke unutar sravnjenih nukleotidnih sekvenca, pri čemu se broje mutacijski događaji. Na taj se način izbjegava gubitak informacija dobiven pretvaranjem zatečenih stanja u udaljenosti koje se inače koriste u metodama distance. To očuvanje informacije znači da se dinamika evolucije može proučavati kod svake značajke, odnosno evolucijske jedinice (nukleotida). Najčešće korištene diskretne metode jesu metoda najveće parsimonije (eng. maximum parsimony; MP), metoda najveće vjerojatnosti (eng. maximum

likelihood; ML) te Bayesova metoda (BAY). Za razliku od diskretnih metoda, metode distance pretvaraju količinu razlika u stanjima značajki u matrice udaljenosti. Računanje se tada vrši na način da je udaljenost između dva taksona jednaka zbroju svih dužina grana koje ih povezuju. Prava evolucijska udaljenost iz uočenih distanca računa se nakon korekcije uz pomoć evolucijskog modela (Xiong, 2006.). Stablo se na temelju udaljenosti pravi uz pomoć grupirajućih ili optimizirajućih algoritama. Grupirajući algoritmi započinju stvaranje stabla s najsličnijim sekvencama. Nasuprot tome, optimizirajući algoritmi uspoređuju mnogo topologija različitih stabala i odabiru onu topologiju koja najbolje odgovara procijenjenim udaljenostima u stablu i aktualnim evolucijskim udaljenostima. Pretraživanje topologija stabala odvija se heuristički iz razloga što se jednostavno ne mogu pretražiti sve moguće topologije stabala i zbog brzine pretrage. Zbog toga se najbolje stablo traži *ad hoc* pregledom, što nije jamstvo da će se najbolje stablo i pronaći. Tehnika se zasniva na početnoj procjeni stabla na kojem se vrše male perturbacije između grana kako bi se dobila susjedna stabla. Ako je jedno od susjednih stabala bolje, onda se ono uzima u obzir za daljnje perturbacije. Konačno se dolazi do stabla koje se ne može više poboljšati te koje predstavlja lokalni optimum iz prostora stabala. Pri tome se koriste algoritmi UPGMA (eng. unweighted pair group method using arithmetic average) i susjednog združivanja (eng. neighbour joining) (Xiong, 2006.). U mnogo su se slučajeva diskretne metode pokazale točnijima od metoda distance, koje se često koriste samo za izradu pokaznog, inicijalnog stabla, dok se za konstrukciju konsenzusnog stabla više koriste diskretne metode (Harrison i Langdale, 2006.).

Metodu najveće parsimonije (MP) prvi su predstavili Edwards i Cavalli-Sforza (1963.), a temelji se na principu Occamove britve (eng. Occam's razor; po filozofu i skolastičaru Williamu Occamu iz 13. st.) prema kojoj je najjednostavnije objašnjenje ono koje je najvjerojatnije ispravno. Ovom se metodom koristi algoritam koji za svaku danu topologiju stabla računa najmanji broj nukleotidnih supstitucija potrebnih za objašnjavanje uočene distribucije značajki, što konačno predstavlja dužinu stabla (Lipscomb, 1998.). To potvrđuje i činjenica da se evolucijske promjene događaju relativno rijetko unutar određenog vremenskog perioda. U slučaju kada više različitih teorija ima jednaku mogućnost predviđanja, uvodi se što manje pretpostavki, eliminirajući one koje ne pridonose predviđanjima teorije, i na taj se način u svaku filogenetičku liniju uključuje najmanji broj homoplazija (Xiong, 2006.). Parsimonijsko se stablo kreira iscrpnim pretraživanjem svih mogućih topologija inicijalnog stabla, obično produkta zadnje iteracije algoritma (Lipscomb, 1998.). Naposljetku, konsenzusno stablo prikazuje zajedničke informacije o odnosima između taksona proizašlih iz jednako parsimonijskih stabala. Kako bi se uštedjelo vrijeme pretraživanja, koriste se samo

informativne pozicije s najvećom filogenetičkom informacijom. Te se pozicije nazivaju **informativnim mjestima**, koja moraju sadržavati najmanje dvije različite značajke od kojih se svaka pojavljuje najmanje dva puta. Druga se mjesta nazivaju neinformativnim ili konstantnim mjestima, a sadrže samo jedno različito mjesto. S obzirom da samo informativne značajke pridonose konstrukciji MP stabala, za pouzdano dobiveno stablo važno je koristiti puno informativnih značajki (Xiong, 2006.). Ukoliko je udio homoplazije velik, pouzdanost stabla je upitna bez obzira na količinu korištenih informativnih značajki. Osim dužine stabla, za opisivanje MP stabla, odnosno količine homoplazije, koristi se nekoliko deskriptivnih statističkih indeksa:

1. **Indeks konzistencije (CI)** je mjera koja pokazuje relativnu količinu homoplazije na stablu (Kluge i Farris, 1969.), a prikazan je sljedećim izrazom:

$$\mathrm{CI} = \frac{\text{min. očekivani uk. br. promjena}}{\text{dužina stabla}} \times 100 .$$

Ukoliko je CI > 0, to znači da se značajka u potpunosti slaže sa stablom te da je uočeni broj koraka jednak najmanjem mogućem, odnosno u tom slučaju nema homoplazije. Ukoliko postoji neslaganje značajke i stabla, CI se izražava kao negativan broj, a takve značajke ukazuju na postojanje homoplazije.

2. **Indeks homoplazije (HI)** označava mjeru za stupanj homoplazije, a računa se sljedećim izrazom:

$$\mathrm{HI} = 1 - \mathrm{CI}.$$

3. **Retencijski indeks (RI)** iz skupa podataka mjeri količinu očekivane sinapomorfije (stečenih osobina od predaka koje dijele članovi monofiletičke skupine) koja je zadržana u filogenetičkom stablu. Ovaj se indeks još može shvatiti kao udio taksona čija stanja nisu homoplastična. Formula za izračun glasi:

$$\mathrm{RI} = (G - S) / (G - M),$$

gdje G predstavlja najveći broj supstitucija značajke za dano stablo, M je najmanji mogući broj koraka, a S predstavlja uočeni broj koraka (Farris, 1989.).

4. **Indeks reskalirane konzistencije (RC)** računa se zbog lakšeg uklapanja značajki u stablo, zbog čega je potrebna mjera koja se približava 0 kada se značajke počinju uklapati u stablo. Indeks konzistencije nema to svojstvo, nego se linearno reskalira s retencijskim indeksom homoplazije, kako je prikazano izrazom (Farris, 1989.):

$$\mathrm{RC} = \mathrm{CI} \times \mathrm{RI}.$$

U usporedbi s MP-om, metoda najveće vjerojatnosti (eng. maximum likelihood; ML) složenija je i statistički snažnija metoda zbog toga što pretražuje svaku moguću topologiju stabla te uzima u obzir svaku poziciju u poravnanju, a ne samo informativna mjesta (kao u slučaju MP metode). S obzirom na to da se uzima informacija cijele sekvence, ML može dati točnija, odnosno vjerodostojnija stabla. Kao i kod MP metode, prilikom ML analize stabla se ocjenjuju na temelju skupa podataka te se odabire stablo s najboljom ocjenom (Bryant i sur., 2005.). Metoda najveće vjerojatnosti je statistička, diskretna metoda koja koristi probabilističke modele kojima se opisuje kako su nastali uočeni podaci, odnosno utvrđuje se vjerojatnost uočavanja podataka uz specifične vrijednosti parametara modela. Unaprijed se smatra kako je evolucijska prošlost s većom vjerojatnosti postizanja primijećenog stanja točnija od one s nižom vjerojatnosti. Stanje svake značajke prikazano je na stablu, a vjerojatnost distribucije stanja značajki računa se uz pomoć evolucijskog modela i duljina grana. Dalje se množe vjerojatnosti svih značajki zajedno pa se negativno logaritmiraju (zbog premalih dobivenih vrijednosti) i zbrajaju. Konačan zbroj predstavlja vjerojatnost podataka prikazanih na stablu, odnosno vjerojatnost evolucije ancestralne sekvence do unutarnjeg čvora i eventualno do sekvence od interesa. Kod ML metode primjenjuje se stohastički model u kojem se proces evolucije opisuje kao nasumičan, a ne kao usmjeren proces (iako je poznat početni uvjet, postoji nekoliko smjerova kojim proces može evoluirati). Rezultat ML analize je konsenzusno stablo koje najvjerojatnije odražava trenutni evolucijski proces. Međutim, odabir nestvarnog evolucijskog modela može dati netočno stablo (Xiong, 2006.).

Budući da filogenetička stabla prikazuju odnose ograničenog uzorka, a ne cjelokupne populacije, dobiveni odnosi ne moraju prikazivati stvarne evolucijske odnose. Naime, evolucija je rezultat mnogih čimbenika pa se ne događa linearno. Prema tome prikaz evolucije u obliku stabla gdje se grane dihotomski račvaju, ne odgovara stvarnim događajima u prirodi. Tradicionalne metode MP i ML tako mogu prikazati preveliku pouzdanost u rezultirajućim odnosima na filogenetičkom stablu u odnosu na stvarni set podataka (Excoffier i Smouse, 1994., Bandelt i sur., 1995.). Zbog toga se pouzdanost pojedinih grananja u filogenetičkom stablu nakon MP i ML analize utvrđuje statističkom metodom samopodržanja (eng. bootstrap) za empirijsko određivanje varijabilnosti parametara (Lipscomb, 1998.). Samopodržano se uzorkovanje temelji na perturbaciji originalnih sekvenca kroz poremećeni skup podataka (Efron i Gong, 1983.). Tako se iz originalnog stvara izmišljeni skup podataka. Pregrupiranje podataka vrši se pomoću nasumičnog odabira i zamjene grana (eng. branch and bound). Taj se postupak ponavlja nekoliko stotina ili tisuća puta. Pouzdanost stabla utvrđuje se u nepromijenjenoj topologiji stabla nakon izvršenih perturbacija. Vrijednost samopodržanja

zapravo je postotak pojavljivanja iste grupe nakon što se pojedina značajka zamjeni drugom iz skupa podataka (Felsenstein, 1985.). Ukoliko se procesom utvrde različita stabla, pretpostavlja se da je prvotna topologija proizišla iz slabog filogenetičkog signala. Time se utvrđuje ispravnost stabla, ali i ukazuje na dosljednost i stabilnost individualnih klada unutar stabla (Xiong, 2006.).

Bayesova metoda (BAY) za kreiranje filogenetičkog stabla koristi funkciju vjerojatnosti te predstavlja noviju varijantu ML metode. Temelji se na distribucijama vjerojatnosti kako bi se opisale sve moguće nesigurnosti, uključujući i parametre modela. Filogenetički se zaključak donosi iz uzoraka posteriorne distribucije skupa dobivenih stabala u odnosu na uočene podatke (Larget i Simon, 1999.). Metoda koristi Bayesov teorem koji računa posteriornu distribuciju parametara prema uočenim podacima i evolucijskom modelu. Njime se objašnjava kolika je vjerojatnost da su trenutno uočeni podaci došli iz određenih topologija stabala. Tako se uspoređuje posteriorna vjerojatnost stabla sa stvarnim podacima i prvotna vjerojatnost stabla s evolucijskim modelom. Posteriorna je vjerojatnost definirana kao vjerojatnost događaja procijenjena na temelju umnoška prvotne vjerojatnosti i vjerodostojnosti (Nascimento i sur., 2017.). Posteriorna se vjerojatnost računa pomoću Markovljevog lanca i Monte Carlo metode (eng. Markov chain Monte Carlo; MCMC) (Hastings, 1970., Metropolis i sur., 1953., Larget i Simon, 1999.). Monte Carlo metode oponašaju slučajne procese u prirodi gdje se pokušavaju predvidjeti svi mogući ishodi i vjerojatni događaji unutar okvira zadanog procesa. Markovljev lanac je algoritam ponavljajućeg nasumičnog uzorkovanja iz distribucije posteriornih vjerojatnosti filogenetičkih stabala, te se ponaša kao sustav lanaca nezavisnih događaja, prilikom čega se ono što se događa u budućnosti koristi za opisivanje trenutnog stanja sustava (Tierney, 1994.). Prilikom MCMC simulacije predlaže se novo stanje Markovljevog lanca uz nasumičnu distribuciju vjerojatnosti (stohastički), zatim se računa vjerojatnost da je novo stanje točno te se predlaže nova nasumična varijabla. Ako je njezina vrijednost manja od vjerojatnosti prihvaćanja, novo se stanje prihvaća te se status lanca ažurira. Osobitost Markovljevog lanca jest to što je vjerojatnost kondicionalne distribucije sustava u sljedećem koraku ovisna samo o trenutnom stanju sustava, dok se prošla stanja sustava ne pamte. Ovaj se proces ponavlja tisuću ili milijun puta. Algoritam češće posjećuje one vrijednosti parametra s većom posteriornom vjerojatnosti nego one s manjom posteriornom vjerojatnosti. Količina vremena tijekom „posjete“ svakom stablu kroz tijek lanca predstavlja aproksimaciju njegove posteriorne vjerojatnosti (Huelsenbeck i Ronquist, 2001.). Posteriorna se vjerojatnost i-tog filogenetičkog

stabla $f(\tau_i \mid X)$ uvjetovanog stvarnim skupom sravnjenih DNA sekvenca (X) računa Bayesovom jednadžbom:

$$f\left(\tau_i \middle| X\right) = \frac{f\left(X \middle| \tau_i\right) f\left(\tau_i\right)}{\sum_{j=1}^{B_{(s)}} f\left(X \middle| \tau_j\right) f\left(\tau_j\right)},$$

gdje je prvotna vjerojatnost označena kao $f(\tau_i)$. Posteriorna je vjerojatnost stabla zapravo pokazatelj točnosti kreiranog stabla τ_i. Tijekom simulacije traže se sve veći rezultati vjerodostojnosti prilikom pretraživanja topologija stabala. Stablo s najvećom posteriornom vjerojatnosti odabire se za konsenzusno stablo (Huelsenbeck i Ronquist, 2001.). Za razliku od ML metode, BAY metoda može podnijeti velik skup podataka, te potražuje skup najboljih stabala pa ima bolju mogućnost za preciznije pogađanje stvarnog stabla. Na konsenzusnom se stablu svakom čvoru dodjeljuju posteriorne vjerojatnosti u vidu statističke podrške. Bayesova metoda ne zahtijeva evaluaciju u vidu samopodržanja zbog toga što MCMC model već uključuje tisuće ili milijune koraka ponovljenih uzorkovanja. U usporedbi s rezultatima metode samopodržanja Bayesove su vjerojatnosti veće zato što se većina stabala uzorkuje oko manjeg broja optimalnih stabala (Xiong, 2006.).

Filogenetičke mreže

Tradicionalne metode poput MP i ML metode sklone su pogreškama u procjeni genealoških odnosa između gena na populacijskoj razini (Sneath, 1975.). Populacijske su genealogije često višestruko razgranate jer su odnosi jednog gena unutar vrste, osim naslijeđa, rezultat i spolne reprodukcije, malobrojnih mutacija i rekombinacija. Osim navedenih razloga, umreženi prikaz može biti i rezultat koegzistencije ancestralnih sekvenca (haplotip jednak posljednjem zajedničkom pretku) i sekvenca potomaka (Posada i Crandall, 2001.). Naime, u prirodnim populacijama većina je haplotipova identična kopija nastala DNA replikacijom. Ukoliko te kopije mutiraju do novog haplotipa, ti će haplotipovi ostati u populaciji te će se uzorkovati zajedno s ancestralnim sekvencama (Posada i Crandall, 2001.). Za razliku od tradicionalnih metoda, filogenetičke mreže u obzir uzimaju događaje rekombinacije, hibridizacije, horizontalnog prijenosa gena i genske duplikacije retikularno prikazujući događaje koji se ne mogu prikazati u obliku stabla (Clement i sur., 2000.). Detekcija navedenih događaja osobito je važna kod analize jezgrinog DNA (Huson i Scornavacca, 2010.). Filogenetičke se mreže temelje na matricama udaljenosti razlika između haplotipova te su vrlo korisne prilikom razrješavanja konflikata uzrokovanih nemogućnostima točnih prikazivanja odnosa na stablu ili kod krivo pretpostavljenih evolucijskih modela (Huson i

Bryant, 2006.). Rezultat rekonstrukcije je neukorijenjena mreža u kojima su čvorovi, koji predstavljaju različite haplotipove, spojeni linijama s najsličnijim haplotipovima. Za izradu mreže haplotipova koriste se algoritmi poput udruživanja medijanskih vektora (eng. median-joining; MJ) ili metoda statističke parsimonije (eng. statistical parsimony) (Templeton i sur., 1992.).

Metoda MJ temelji se na zbroju razlika značajki između sekvenca. Unaprijed je određeno da rekombinacije nema, stoga je metoda najviše pogodna za analizu mtDNA. Izrada filogenetičke mreže putem MJ metode započinje s minimalnim grananjima stabala unutar jedinstvene mreže. Nakon toga se parsimonijski dodaje po nekoliko konsenzusnih sekvenca koje predstavljaju medijanske vektore koji pokazuju veliku vjerojatnost pojavljivanja na granajućim čvorovima u MP stablu uzimajući isključivo triplete sekvenca od kojih je jedna povezana s dvjema ostalim u mreži tijekom trajanja procesa. Iz biološke perspektive ti medijanski vektori predstavljaju posrednike koji nedostaju (izumrle neuzorkovane ili izumrle ancestralne sekvence). Nakon svakog kruga medijanske generacije proces započinje sa sve većim setom sekvenca, sve dok se više ne mogu stvarati novi medijanski vektori (Bandelt i sur., 1999.).

Za donošenje zaključka o genealogiji gena na razini populacije kod manjeg broja divergencija (Georgiadis i sur., 1994., Routman i sur., 1994., Gerber i Templeton, 1996., Hedin, 1997., Schaal i sur., 1998., Vilá i sur., 1999., Gómez-Zurita i sur., 2000.) koristi se algoritam statističke parsimonije (TCS - Templeton Crandall Sing metoda; Templeton i sur., 1992.). Računalni program TCS sekvence pretvara u haplotipove računajući frekvencije haplotipova u uzorku. Zatim se procjenjuje najveći broj razlika između haplotipova uz statističku pouzdanost od 95% (parsimonijska granica povezivanja). Nakon prvotne procjene povezuju se haplotipovi koji se razlikuju u jednoj, dvjema, pa trima promjenama itd., sve dok se svi haplotipovi ne uvrste u mrežu ili dok se ne dosegne parsimonijska granica povezivanja (Posada i Crandall, 2001.). U ovom se programu koristi stohastički koalescentni pristup prema kojem postoji direktna povezanost između zastupljenosti i starosti haplotipova (Watterson i Guess, 1977., Donnelly i Tavaré, 1986.). Prema koalescentnom pristupu najčešće su zastupljeni oni haplotipovi koji su najduže u populaciji, dok su rijetke varijante najvjerojatnije rezultat nedavnih mutacija (Watterson i Guess, 1977., Donnelly i Tavaré, 1986., Crandall i Templeton, 1993.). Metoda statističke parsimonije temelji se na ovih pet pretpostavki (Posada i Crandall, 2001.):

- Stariji aleli imaju veću vjerojatnost da postanu unutarnji haplotipovi (haplotipovi s više od jedne mutacijske veze) u odnosu na mlađe haplotipove.
- Stariji će aleli u prosjeku biti šire geografski rasprostranjeni.
- Učestaliji haplotipovi pokazuju tendenciju prema većem broju mutacijskih veza.
- Haplotipovi predstavljeni samo jednom sekvencom u uzorku (singletoni) češće će biti povezani s nesingletonima nego s drugim singletonima.
- Singletoni će češće biti povezani s haplotipovima iz iste populacije nego s haplotipovima različitih populacija.

Ove pretpostavke podrazumijevaju neutralnu evoluciju i povezanost populacija, a u slučaju selekcije ne moraju biti točne (Crandall i Templeton, 1993.). U kombinaciji s tradicionalnim metodama, metoda statističke parsimonije omogućuje utvrđivanje odnosa među organizmima sa širim rasponom divergencije i filogeografske prošlosti koja je utjecala na raznolikost organizama (Clement i sur., 2000.).

1.3. Polazna hipoteza

Polazne su hipoteze ovog istraživanja sljedeće:

1. Na evolucijsku prošlost klenova najviše su utjecali geološki događaji.

2. Filogenetički odnosi klenova jadranskog slijeva odgovaraju geografskom obrascu.

3. Postojeća taksonomija dobro odražava bioraznolikost vrsta roda *Squalius* u rijekama jadranskog slijeva na području Hrvatske i BiH.

Ovim će se istraživanjem po prvi put koristiti i jezgrini i mitohondrijski biljezi za procjenu glavnih povijesnih događaja koji su rezultirali današnjom rasprostranjenosti i filogenetičkim odnosima vrsta roda *Squalius* rijeka jadranskog slijeva Hrvatske i BiH. Osim toga, pokušat će se odgovoriti na pitanje o evolucijskoj prošlosti pojedinih svojti na temelju geoloških događaja koji se poklapaju s vremenima njihovih divergencija i rasprostranjenosti filogenetičkih linija. Nadalje, utvrđivanjem genske različitosti i uvidom u fenomene introgresija i hibridizacije produbit će se razumijevanje mehanizama i puteva evolucijskog nastanka i širenja svojti. Otkrivanjem struktura i povezanosti populacija omogućit će se produbljivanje našeg općeg znanja o biologiji i ekologiji ove skupine riba koje je potrebno za prepoznavanje evolucijski značajnih jedinica kao konzervacijskih prioriteta.

1.4. Svrha, cilj i opseg rada

Svrha ovog istraživanja bila je pokušati objasniti mehanizme i puteve evolucijskog nastajanja i širenja pojedinih svojti jadranskih klenova Hrvatske i BiH, te otkriti važnost različitih geoloških događaja, ali i mogućih lokalnih okolnosti i događaja odgovornih za trenutnu distribuciju i raznolikost istraživanog roda *Squalius*. Osim toga, istraživanjem trenutne genske raznolikosti i polimorfizama između vrsta omogućuje se uvid u demografsku prošlost pojedinih vrsta, što može biti korisno u razotkrivanju kompleksne geološke povijesti mediteranske regije. Kako bi se pokušalo odgovoriti na to pitanje, postavljeni su sljedeći ciljevi:

- utvrđivanje srodstvenih odnosa analizom mitohondrijskih i jezgrinih genskih biljega
- utvrđivanje područja rasprostranjenosti pojedinih vrsta i genskih linija
- određivanje unutarvrsne i međuvrsne raznolikosti.

Određivanjem evolucijskih puteva srodnih i geografski bliskih vrsta, s obzirom na geološke događaje, omogućit će se predviđanje budućih reakcija vrsta na promijenjene uvjete. Naime, cilj je ovog istraživanja bio odgovoriti na pitanje je li isto geografsko područje sa sličnim geološkim događajima utjecalo na sličan evolucijski smjer i sadašnji genski polimorfizam geografski bliskih i srodnih vrsta ili su njihove evolucijske prošlosti različite pod utjecajem različitih evolucijskih sila, što može biti vrlo važno za buduća predviđanja o budućnosti vrste i donošenje konzervacijskih strategija. Razjašnjavanje evolucijskih puteva endemskih vrsta pridonijet će poznavanju paleogeografije ovog područja. Otkrivanje strukture i povezanosti populacija omogućit će prepoznavanje evolucijski značajnih jedinica kao konzervacijskih prioriteta. Dobiveni podaci iz ovog istraživanja bit će korisni u taksonomskim istraživanjima, a mogu pomoći i u razjašnjavanju taksonomskih položaja pojedinih populacija. Naime, tek nakon točnog određivanja vrsta i područja njihove rasprostranjenosti te odnosa s drugim vrstama, moguće je donositi konačne zaključke o ugroženosti njihovih populacija i predlagati adekvatne mjere zaštite. Kako je većina klenova endemično s ograničenom distribucijom na jednu rijeku, pojedini slijev ili više lokaliteta na manjem području (Ćaleta i sur., 2015.), ovakva su istraživanja bitna za produbljivanje našeg saznanja o ovoj skupini riba, kao i za djelotvornu zaštitu ugroženih populacija.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Problemi u dosadašnjem određivanju taksonomske pripadnosti unutar skupine klenova

Određivanje taksonomske pripadnosti i sistematski položaj klenova roda *Squalius* te geografske rasprostranjenosti pojedinih vrsta još se uvijek razmatra. Taksonomski status klenova mijenjao se u mediteranskom području u nekoliko navrata tijekom zadnjih godina. Mnoge su vrste današnjeg roda *Squalius* do nedavno pripadale rodu *Leuciscus* (Doadrio i Carmona, 1998., Zardoya i Doadrio, 1999.), međutim filogenetička su istraživanja pokazala da nisu u bliskom srodstvu s tipičnim predstavnikom roda *Leuciscus* (Briolay i sur., 1997., Gilles i sur., 1998.).

Na području jadranskog slijeva u Hrvatskoj i BiH u prošlosti je zabilježeno više istih vrsta pod različitim imenima zbog upotrebe raznih sinonima ili krive identifikacije vrsta. U Istri je zabilježeno mnogo različitih vrsta i podvrsta klenova u prošlosti. Tako su zabilježeni *S. cavedanus* (Osapska reka, Rižana; Heckel i Kner, 1858.), *S. cephalus* (Badaševica; Porečnik, 1958.), *S. squalus* (cijelo područje Istre; Kottelat i Freyhof, 2007., Zupančič i sur., 2010a.), *L. cephalus cabeda* (Rižana, Pazinčica, Mirna, Badaševica; Gridelli, 1936., Leiner i sur., 1995.), *L. cephalus albus* (jezero Čepić; Gridelli, 1936., Leiner i sur., 1995.; Mirna, Pazinčica, Raša, Boljunšćica, Letaj; Leiner i sur., 1995.; Dragonja s Pinjevcem; Povž i Sket, 1990., Leiner i sur., 1995., Povž, 2002.; jezero Butoniga; Leiner i sur., 1995., Mrakovčić i sur., 2000.), *L. cephalus* (Mirna, Boljunšćica; Povž i Sket, 1990., Leiner i sur., 1995.), *L. leuciscus* (Pazinčica, Mirna; Leiner i sur., 1995.) te *L. cavedanus* (Mirna, Pazinčica; Mrakovčić i sur., 2006.). Leiner i Popović u Istri prijavljuju i vrstu *L. svallize* (Mirna, Fojba-Pazinčica, Raša, Boljunšćica, Letaj i Rakov potok; Leiner i Popović, 1984.), što se kasnije ponovo potvrđuje (Leiner i sur., 1995.). Bogutskaya i Zupančič to kasnije opovrgavaju pretpostavljajući da se zapravo radi o vrsti *L. zrmanjae* ili *L. illyricus* jer se smatra da je područje raširenosti *L. svallize* ograničeno na sljevove Neretve, Trebišnjice i Matice, uključujući područja Hutovog blata, Popovog polja (Kapetanović i Vuković, 1968.) i Jablaničkog jezera (Bogutskaya i Zupančič, 1999.). Veenvliet i Veenvliet (2006.) opisuju klenove iz Dragonje kao *S. cavedanus*, dok Zupančič (2008., 2009.) smatra da se radi o još neopisanoj vrsti s isključivim obitavanjem u Dragonji koju Bogutskaya i Zupančič (2010.) nazivaju *S. janae*. Zupančič i sur. 2010. g. potvrđuju status nove vrste proširujući distribuciju na područje rijeka Boljunšćice i Pazinčice te Čepić polja u Istri (Zupančič i sur., 2010a.).

U Krki, Cetini i Soči pronađena je vrsta *S. illyricus* (Heckel i Kner, 1858., Vuković i Ivanović, 1971., Mrakovčić i sur., 1995., Bogutskaya i Zupančič, 1999.). Iako se kasnije potvrđuje pronalazak *S. illyricus* u Soči (Bogutskaya i Zupančič, 1999.), distribucija *S. illyricus* na tom području upitnog je statusa jer nema nedavnih pronalazaka te vrste u sjevernom dijelu jadranskog slijeva (Ćaleta i sur., 2015.). U Zrmanji je opisana podvrsta *S. svallize zrmanjae* (Karaman, 1928.), dok su kasnije jedinke iz Zrmanje opisane kao podvrste *L. svallize svallize* (Zrmanja, Krka, Neretva i Trebinje) i *L. svallize zrmanjae* (Zrmanja blizu grada Obrovca) (Vuković i Ivanović, 1971.). Heckel i Kner (1858.) objavljuju nalaz *S. albus* iz Krke i *S. svallize* iz Neretve i jezera blizu Vrgorca. Cjelokupni *L. cephalus* kompleks prema morfološkim i meurističkim karakteristikama revidiraju Bianco i Knežević (1987.) i potvrđuju obitavanje *L. svallize* u Neretvi i Trebišnjici, ali ne i u Krki gdje su smatrali da su pronašli većinu jedinki vrste *L. cephalus* i još jednu nepoznatu vrstu koja je najsličnija vrsti *L. svallize*. Jedinke iz porječja Cetine opisali su kao vrstu *L. illyricus* upitnog statusa podvrste ili lokalnog ekofenotipa hladnih voda vrste *L. cephalus*. Nepoznatu vrstu iz Krke koju su opisali Bianco i Knežević (1987.), Kottelat (1997.) proglašava kao *L. zrmanjae* uz potrebu opisa neotipa. Bogutskaya i Zupančič (1999.) neotipove iz Zrmanje (u donjem i srednjem dijelu toka) i donjeg toka Krke ponovo opisuju kao *L. zrmanjae*, ali uz status endema Hrvatske koji se pojavljuje samo u Zrmanji i Krki (upitan nalaz iz Cetine). U Zrmanji žive kao jedini predstavnik roda, dok u Krki simpatrijski obitavaju s *L. cephalus* i *L illyricus* te su često pogrešno bili proglašavani kao *L. svallize* (Katurić, 1887., Kolombatović, 1907., Vuković i Ivanović, 1971., Vuković, 1982., Mrakovčić i Mišetić, 1989., Mrakovčić i sur., 1995.), koji uopće ne obitava u Krki (Bogutskaya i Zupančič, 1999.). Prema današnjoj taksonomiji zabilježena vrsta *L. zrmanjae* odgovara vrsti *S. zrmanjae*, a raširena je na području Zrmanje i Krke te rijeke Ričice (Ćaleta i sur., 2015.). U literaturi se spominje i postojanje treće vrste u rijeci Krki kao *L. cephalus* var. *albus* (Seeley, 1886.), pa onda kao *S. albus* (Kolombatović, 1886.). Steindachner (1882.) opisuje *L. cephalus* iz Trebišnjice, Neretve i Krke, koja je kasnije opisana kao *L. cephalus cavedanus* u Neretvi (Karaman, 1928.). Za vrstu *S. svallize* areal rasprostranjenosti još uvijek je nejasan (Mrakovčić i sur., 2006.). Naime, prethodno je vrsta zabilježena u Istri i jezerima blizu Vrgorca (Heckel i Kner, 1858., Kosić, 1903.), ali se areal u Hrvatskoj i BiH kasnije ograničava isključivo na područje Neretve, Trebišnjice i Ljute (Kottelat i Freyhof, 2007.). Osim na području Hrvatske i BiH areal rasprostranjenosti *S. svallize* prostire se na području i Albanije (Mrakovčić i sur., 2006.). Na području Neretve, Matice, Prološkog blata i Ričice opisan je i *S. microlepis*, dok je na području rijeke Cetine,

Livanjskog polja te Buškog i Mandečkog jezera u BiH pronađena vrsta *S. tenellus* (Kottelat i Freyhof, 2007.).

2.2. Dosadašnja istraživanja filogenije i filogeografije roda Squalius

Prva molekularna istraživanja koja su obuhvaćala rod *Squalius* temeljila su se na mitohondrijskim biljezima (*cyt b* i prva podjedinica citokrom c oksidaze, *COI*), često u svrhu filogenetičke rekonstrukcije većih skupina šaranki, a upućivala su na parafiletičko porijeklo europskih klenova (Briolay i sur., 1997., Brito i sur., 1997., Gilles i sur., 1998., Durand i sur., 1999., Zardoya i Doadrio, 1999., Doadrio i Carmona, 2003., Sanjur i sur., 2003., Doadrio i Carmona, 2006., Lucentini i sur., 2014.). Unutar europskih i azijskih predstavnika roda *Squalius* izdvajaju se tri razvojne linije (Doadrio i Carmona, 2003., Sanjur i sur., 2003., Doadrio i Carmona, 2006.), što je kasnije potvrđeno i analizom jezgrinih biljega (*rag1* i S7; Perea i sur., 2010., Perea i sur., 2016.). Prva je mediteranska grupa koju čine malene vrste iz južne Španjolske, središnje Italije, južne Grčke i Balkana, dok je druga euroazijska grupa većih jedinki koja je široko rasprostranjena u srednjoistočnoj Europi, Aziji i na sjeveru mediteranskog područja, a treća je Paratetis grupa koja obuhvaća malene vrste iz okolice Crnog mora i Anatolije (Doadrio i Carmona, 2003., Sanjur i sur., 2003.). Kasnijim se istraživanjima kombiniranom analizom mitohondrijskih (*cyt b, COI*) i jezgrinih (*rag1* i S7) biljega potvrđuje odvajanje roda *Squalius* na dvije jasno razdvojene filogenetičke grupe - mediteransku i „*S. cephalus*“ grupu, dok se treća, Paratetis grupa, odvaja sa šest slabo poznatih i međusobno nesrodnih vrsta roda *Petroleuciscus*. Istraživanja na temelju analize *cyt b* (Doadrio i Carmona, 2006.) i *COI* (Lucentini i sur., 2014.) pokazala su geografsko strukturiranje mediteranske grupe na pirenejsku, talijansko-jadransku i grčku podgrupu. Jadranskoj grupi pripadaju istraživane vrste u ovom istraživanju, a to su vrste *S. illyricus*, *S. microlepis, S. svallize*, *S. tenellus* i *S. zrmanjae*. Unutar *S. cephalus* grupe izdvajaju se dvije filogenetičke grupe, prva sa srednjoeuropskim i mediteranskim vrstama, dok je druga s anatolijskim i kavkaskim vrstama, među kojima se nalazi i vrsta *S. squalus* (Perea i sur., 2010.).

Bez obzira na uključivanje jezgrinih molekularnih biljega u analize, odnosi unutar grupa nisu se potpuno razriješili. Filogenetički odnosi pokazuju bazalne politomije, pogotovo u slučaju *S. cephalus* kompleksa, čime je raznolikost ove grupe podcijenjena, što zahtijeva taksonomsku reviziju (Durand i sur., 2000., Perea i sur., 2010.). Nerazriješeni odnosi objašnjavaju se razdvajanjem ancestralnih zajedničkih populacija vrsta *Squalius* na višestruke razvojne linije u kratkom vremenskom periodu (Doadrio i Carmona, 2003.).

Uočeno je da evolucijski procesi poput hibridizacije i nepotpunog razvrstavanja linija mogu dovesti do razilaženja dobivenih rezultata između mitohondrijskih i jezgrinih molekularnih podataka (Perea i sur., 2016.). Nepotpuno razvrstavanje linija događa se ukoliko se divergencija filogenetičkih linija ne odvija u isto vrijeme kad i specijacija (Maddison, 1997.). Prema tome genska stabla ne moraju nužno prikazivati stvarne odnose između taksona, zato što su se različiti geni razdvojili u različito vrijeme (Degnan i Rosenberg, 2009., Edwards i Bensch, 2009., Rosenberg, 2013.). Osim toga, zna se da će mitohondrijski genomi prije dovršiti svoje razdvajanje linija, nego genomi iz jezgre (Ballard i Whitlock, 2004., Chan i Levin, 2005., Currat i sur., 2008., Zink i Barraclough, 2008.). Nepotpuno razvrstavanje linija do sada je primijećeno kod klenova unutar vrsta *S. lucumonis, S. zrmanjae* (iz Krke) i *S. ghigii* (Durand i sur., 2000.). Ti se podaci slažu s pojavom hibridizacije, koja se treba potvrditi (Durand i sur., 2000.).

2.3. Porijeklo potporodice Leuciscinae na mediteranskom području

Vrlo kompleksna paleogeografija mediteranske regije - s putujućim otočnim lancima, fragmentiranim tektonskim pojasima i drugim tektonskim događajima, odrazila se na umrežen biogeografski model evolucije klenova. Glavni procesi zaslužni za veliku raznolikost vrsta u mediteranskoj regiji posljedica su geoloških i klimatskih promjena koje su mijenjale to područje, pogotovo tijekom kenozoika (Sanjur i sur., 2003.).

Tri su biogeografske hipoteze koje pokušavaju objasniti porijeklo i raznolikost predstavnika europske ihtiofaune, a koje se ne moraju međusobno nužno isključivati (Bănărescu, 1989., 1992.). Prva hipoteza poznatija kao „model sjevernog širenja“ (eng. north dispersal model) opisuje širenje azijskih predstavnika prema središnjoj Europi sjevernom rutom nakon uzdizanja Urala u oligocenu, dok se širenje prema jugu Europe nastavilo do pliocena (Bănărescu, 1989., 1992.). Tijekom interglacijalnih i postglacijalnih razdoblja središnja se europska ihtiofauna izmijenila s dunavskom (Bănărescu, 1992.). Druga se hipoteza odnosi na tzv. „Lago-Mare“ disperzijski model koji pretpostavlja širenje azijskih predstavnika tijekom jezerske faze Sredozemnog mora (zadnja faza mesinske krize saliniteta, MSC) tijekom pliocena (prije 5,5 milijuna godina; mya) (Bianco, 1990.). U toj se fazi Sredozemno more gotovo isušilo, međutim mediteranski se bazen ponovo napunio slatkom vodom Sarmatskog mora (nastalo raspadom Paratetisa) (Hsü i sur., 1977.), što je uzrokovalo disperziju vrsta u okolici i visoku razinu endemizma (Bianco, 1990.). Nakon otvaranja Gibraltarskih vrata mediteranski se bazen napunio morskom vodom (Krijgsman i sur., 1999.), što dovodi do izolacije novonastalih slatkovodnih populacija tijekom intenzivnih vikarijantnih

događaja (Ketmaier i sur., 2004.). Treća hipoteza uključuje disperziju leuciscina kroz međukontinentalne kopnene mostove tijekom ranog pliocena, kada se oblikovala sadašnja sjevernoafrička obala (Doadrio, 1990.). Sve tri hipoteze podrazumijevaju azijsko porijeklo zbog sličnosti pronađenih među vrstama Bliskog istoka i Mediterana (Tsigenopoulos i Berrebi, 2000., Durand i sur., 2002., Sanjur i sur., 2003., Wang i sur., 2007.). Smatra se da je Bliski istok važno područje izmjene slatkovodne ihtiofaune u kojoj su se našli preci azijskih i, kasnije, mediteranskih vrsta tijekom postupnog zatvaranja Tetis mora (Berg, 1949., Coad, 1987., Coad, 1996., Durand i sur., 2002.), a neki ga prepoznaju i kao izvor porijekla nekih leuciscina (Durand i sur., 1999., Durand i sur., 2000., Saitoh i sur., 2011.). Najstariji fosilni ostaci leuciscina nađeni su u središnjoj Anatoliji iz doba prijelaza iz oligocena u miocen (Krijgsman i sur., 1996., Theocharopoulos, 2000.), sugerirajući azijsko porijeklo, što potvrđuje i velika raznolikost rodova i vrsta na tom području, posebice na području južne i jugoistočne Azije (Perea i sur., 2010.). Blisku srodnost starih razvojnih linija u Anatoliji i na balkanskom području (Economidis i Bănărescu, 1991.) moguće je objasniti pojavom velike balkansko-anatolijsko-iranske kopnene mase koja je razdvojila Tetis i Paratetis mora u ranom oligocenu, prije 33 milijuna godina (Rögl, 1999., Perea i sur., 2010.).

Mediteranski su leuciscini najvjerojatnije višestruko kolonizirali mediteransko područje u periodu od oligocena do pliocena (35-1,7 mya), prateći hidrogeografske i geološke događaje u prošlosti europskog područja (Economidis i Bănărescu, 1991.). Višestruka kolonizacija mediteranskog područja potvrdila se i prema istraživanjima mitohondrijskih i jezgrinih biljega (*cyt b*, *rag1* i S7), uz model opuštenog molekularnog sata (0,2% divergencija po liniji na milijun godina za kombinirani set svih istraživanih gena zajedno (Perea i sur., 2010.). Prema navedenom istraživanju razdvajanje glavnih mediteranskih razvojnih linija leuciscina zbilo se u oligocenu, a rezultati upućuju na inicijalnu europsku kolonizaciju klenova iz jugozapadne Azije preko balkansko-anatolijske-iranske kopnene mase koja je razdvajala mora Tetis i Paratetis početkom ranog oligocena. Novouspostavljene morske veze fragmentiraju tu kopnenu masu na velike balkanske i anatolijske otoke (28 mya; Rögl, 1999.), što je najvjerojatnije imalo utjecaja na razdvajanje starih balkansko-anatolijskih razvojnih linija na prijelazu ranog u kasni oligocen (Perea i sur., 2010.). Krajem kasnog oligocena primijećena je brza diverzifikacija vrsta, kada se razvila polovica svih razvojnih linija leuciscina. Budući da nema fosilnih europskih ostataka iz tog vremena, pretpostavlja se da se to dogodilo na balkansko-anatolijsko-iranskom krškom području koje je zbog specifičnog reljefa ubrzalo geografsku izolaciju i specijacijski proces jer u to vrijeme nije bilo zabilježenih geodinamičkih događaja na tom području (Perea i sur., 2010.). Uzdizanje Alpa i zatvaranje

slovenskog koridora, dotadašnje morske poveznice između Tetisa i Paratetisa (još uvijek razdvojenih balkansko-anatolijskom kopnenom masom), praćeno uzdizanjem istočnih Alpi s posljedičnim rotacijama malih tektonskih ploča te uzdizanjem sedimenta u panonsko-karpatsko-dinarskom kraju tijekom ranog i srednjeg miocena (20-12 mya; Rögl, 1999.) uzrokovalo je novo razdvajanje leuciscinskih linija do današnjih rodova (Perea i sur., 2010.).

Posebno su istraživani klenovi s Pirenejskog poluotoka (Portugal, Španjolska). Prema fosilnim ostacima leuciscini su na ovo područje došli na prijelazu iz kasnog oligocena u rani miocen (Cabrera i Gaudant, 1985., de la Peña, 1995.). Među istraživanim pirenejskim vrstama pronađene su dvije razvojne linije, što upućuje na višestruki kolonizacijski događaj (najmanje dvije kolonizacije) na ovo područje (Sanjur i sur., 2003.), a što se potvrđuje i kasnije na kombiniranoj analizi mitohondrijskih i jezgrinih biljega (Perea i sur., 2010.). Današnja pirenejska ihtiofauna nastala je u miocenu nakon izolacije pirenejskih slatkovodnih vrsta od europskih, što je posljedica uzdizanja Pireneja (Perea i sur., 2010.). Prema istraživanjima mitohondrijskog *cyt b* biljega za rod *Squalius* uz molekularni sat od 0,76% divergencija sekvenca na milijun godina (izračunato za europske ciprinide; Zardoya i Doadrio, 1998.), razdvajanje sjevernih i mediteranskih linija dogodilo se u periodu kasnog miocena (7 mya), puno prije Lago-Mare faze (Sanjur i sur., 2003.). Takve rezultate pokazuje i kombinirana analiza seta mitohondrijskih i jezgrinih biljega, koji pokazuju pojavu glavnih mediteranskih linija leuciscina i njihovu diverzifikaciju u oligocenu, također prije Lago-Mare faze (Perea i sur., 2010.). Prema tome se odbacuje druga hipoteza širenja leuciscina, dok se ne isključuje inicijalni model sjevernog širenja nakon kojeg slijedi postupna kolonizacija mediteranske regije (Perea i sur., 2010.). Postoji više istraživanja koja ne ukazuju na masivnu disperziju i specijaciju tijekom mesinskog perioda za vrste rodova *Squalius* i *Chondrostoma* (Doadrio i Carmona, 2003., Doadrio i Carmona, 2004., Robalo i sur., 2007.). Iako nije bitno utjecala na razdvajanje velikih filogenetičkih linija unutar klenova, jezerska faza Sredozemnog mora utjecala je na lokalne disperzijske događaje, a nestanak vodenih površina ubrzao je izolaciju populacija (Sanjur i sur., 2003.). Nakon mesinske krize, na početku pliocena (5,3 mya) povećava se vlažnost u mediteranskoj regiji (Haywood i sur., 2000.), što je dovelo do nastanka novih slatkovodnih staništa koja su mogla potaknuti daljnju kolonizaciju i širenje leuciscina na Mediteran, uz daljnju diverzifikaciju (Perea i sur., 2010.).

Paleogeografija balkanskog i anatolijskog područja slična je zbog dugotrajne povezanosti i izolacije od ostatka Europe tijekom oligocena i miocena (Perea i sur., 2010.). Na prijelazu ranog u srednji miocen na Balkanskom su poluotoku, a posebice dalmatinskom području, postojali veliki jezerski sustavi (npr. dinarski jezerski sustav, 17-15 mya;

Harzhauser i Mandic, 2008.) čija su fragmentacija i nestanak utjecali na izolaciju i specijacijske događaje. Nadalje, u balkanskoj regiji dolazi do uzdizanja Dinarida zbog tektonskih promjena (Pavelić i Belak, 2008.), što je moglo utjecati na izolaciju dalmatinskih vrsta rodova *Chondrostoma*, *Squalius* i *Telestes* (Perea i sur., 2010.). Uočena sličnost ihtiofaune sjeverne Italije i sjevernih rijeka Balkanskog poluotoka (Šlechtová i sur., 2004., Perdices i sur., 2008., Perea i sur., 2010.) objašnjava se nedavnim širenjem vrsta rijekom Po i pritocima tijekom zadnjeg glacijalnog maksimuma (LGM) zbog spuštanja morske razine (Waelbrock i sur., 2002.). To je moglo dovesti do izmjene mnogih slatkovodnih vrsta između talijanskog i balkanskog sjevernog područja. Teorija objašnjava trenutnu raširenost više vrsta, među kojima je i vrsta *S. squalus* (Perea i sur., 2010.).

2.4. Hibridizacija i hibridogeneza u klenova

Kod slatkovodnih riba česta je pojava hibridizacije zahvaljujući vanjskoj oplodnji, slabim izolacijskim mehanizmima, neujednačenoj brojnosti dvaju hibrida, kompeticiji za ograničena staništa za mrijest te smanjenoj kompleksnosti staništa. Pojava hibridizacije česta je unutar rodova šaranki (Scribner i sur., 2001.), a općenito se često javlja nakon promjene demografskih uvjeta (Excoffier i sur., 2009., Mastrantonio i sur., 2016.). Kod leuciscina je F1 hibridna generacija često fertilna (Yakovlev i sur., 2000.), stoga je za očekivati češće hibridizacije između rodova uz pojavu introgresije. Najčešće dolazi do mitohondrijske introgresije, odnosno prijenosa mitohondrijskog genoma iz jedne vrste u drugu putem hibridizacije, a može doći i do potpune zamjene mtDNA jedne vrste drugom, odnosno fiksacije (Nevado i sur., 2009., Choleva i sur., 2014., Perea i sur., 2016.). Mitohondrijski se DNA lakše introducira u vidu introgresije u odnosu na jezgrin DNA, zbog isključivog maternalnog nasljeđivanja i manje efektivne veličine populacije (Choleva i sur., 2014.). Moguća je introgresija i jezgrinog genoma koja se ponaša neovisno o introgresiji mtDNA, a ne mora se nužno pojaviti niti nakon masivne introgresije mtDNA (Nevado i sur., 2009., Choleva i sur., 2014., Patten i sur., 2015., Mitchell i sur., 2016.).

Introgresivna je hibridizacija zabilježena unutar mediteranske grupe, točnije između pirenejskog *S. alburnoides* kompleksa (Portugal, Španjolska) koji pripada jednom od najkompleksnijih poliploidnih hibridogenetskih sistema poznatih u svijetu kralješnjaka (Collares-Pereira i Coelho, 2010., Boto i sur., 2011.), a sastoji se od hibridogenetskog hibrida *S. alburnoides* te dviju roditeljskih vrsta - *S. pyrenaicus* (južni portugalski sljevovi) i *S. carolitertii* (sjeverni portugalski sljevovi). *Squalius alburnoides* kompleks čine diploidne (2n=50) i poliploidne (3n=75 i 4n=100) jedinke obaju spolova i različitih jezgrinih genoma

(Pala i sur., 2009.). U prirodi prevladavaju triploidne jedinke koje se održavaju razmnožavanjem s diploidnim roditeljskim jedinkama. Razmnožavaju se aseksualnim hemiklonskim nasljeđivanjem ili tzv. hibridogenezom, prilikom koje se u gamete prenosi samo jedna roditeljska kopija genoma. Drugi se genom odbacuje prije mejoze, a nadoknađuje se križanjem hibrida s roditeljskom vrstom koja sadrži upravo taj genom. *Squalius alburnoides* jedna je od rijetkih aseksualnih vrsta kralješnjaka koja uključuje hibridne i fertilne ženke i mužjake (Durand i sur., 2000., Alves i sur., 2002.). Na istom području Pirenejskog poluotoka primijećena je masivna introgresija *S. aradensis* genoma u jedinkama vrste *S. alburnoides* (Sousa-Santos i sur., 2006.).Također je dokazana hibridizacija između vrsta *Squalius* koje pripadaju različitim velikim filogenetičkim grupama. Tako je npr. u središnjoj Italiji zabilježena hibridizacija između vrsta *S. lucumonis* (mediteranska) i *S. squalus* (*S. cephalus* grupa) (Gigliarelli i sur., 2013.). Također je zabilježena jednosmjerna introgresija cjelokupnog mitohondrijskog genoma vrste *S. keadicus* u dvjema populacijama *S. peloponensis* u Grčkoj (Perea i sur., 2016.). Osim što pripadaju dvjema različitim velikim filogenetičkim grupama (*S. peloponensis* pripada *S. cephalus* grupi, dok je *S. keadicus* dio mediteranske grupe), te su dvije vrste alopatrijske, a izolirane su još od srednjeg miocena (Sanjur i sur., 2003., Perea i sur., 2010.). Kod mediteranske vrste *S. keadicus* pronađen je i mtDNA koji ne odgovara onom od klenova (Durand i sur., 2000.).

Hibridizacija između vrsta različitih rodova potvrđena je analizom sekvenca *cyt b* gena kod vrste *Scardinius dergle* Heckel & Kner, 1858, gdje je pronađena sekvenca haplotipa vrste *S. svallize*. Introgresija mtDNA najvjerojatnije se dogodila u Buškom blatu kao posljedica izgradnje brane 1962. g., koja je vjerojatno zarobila obje vrste u jezeru ispod brane (Freyhof i sur., 2005.). Primorski klen (*S. cephalus* grupa) često formira hibride s vrstama *Alburnus arborella* Bonaparte, 1841 i *A. albidus* Costa, 1838 (Freyhof, 2011b.). Slično, na Pirenejskom poluotoku primijećena je i hibridizacija između invazivne vrste *Alburnus alburnus* Linnaeus, 1758 i nativnih endemičnih vrsta *S. pyrenacus* i *S. alburnoides* (Almodóvar i sur., 2012.).

2.5. Stupanj ugroženosti i zaštita klenova u Hrvatskoj

U Crvenu knjigu slatkovodnih riba Hrvatske uvršteno je 60 % slatkovodne ihtiofaune u Hrvatskoj (Mrakovčić i sur., 2006.). Slatkovodne su ribe vrlo osjetljive na promjene staništa, zbog čega danas predstavljaju jednu od najugroženijih skupina kralješnjaka, a kao glavni problem ističe se ograničen životni prostor uz vrlo ograničenu sposobnost prelaska između riječnih sljevova. Rijeke predstavljaju otvorene povezane sustave, danas često prekinute i necjelovite s promijenjenim tokom, što uzrokuje nestanak staništa te onemogućuje

migracije od izvora prema ušću ili obrnuto, a od presudne je važnosti za opstanak vrsta. Promjene u sastavu populacije, smanjenje brojnosti i genske raznolikosti između vrsta ukazuje na značajnu i često dugotrajnu promjenu jednog ili više čimbenika. Najveći utjecaj na ihtiofaunu u Hrvatskoj vrši čovjek degradacijom staništa, melioracijama i regulacijama vodotokova, onečišćenjem, unosom alohtonih i prenesenih vrsta, ribarstvom, turizmom i klimatskim promjenama (Ćaleta i sur., 2015.).

Rijeke jadranskog slijeva obiluju vodom u jesenjem i proljetnom razdoblju, ali ljeti mogu sasvim presušiti. Istarske se rijeke ističu relativno malim brojem riba i endema zbog dugotrajnog onečišćenja uzrokovanog antropogenim utjecajem, zbog melioracije, unosa vrsta te siromaštva trajnih vodotokova. Područje Like bogato je stenoendemima, vrstama koje žive na vrlo malom području. Dalmacija se izdvaja kao posebna ihtiološka regija koja zbog velikog broja endema predstavlja izrazito zanimljivo područje hrvatske i europske ihtiofaune, što je čini značajnim dijelom europske sveukupne bioraznolikosti. Dalmatinska je regija trenutno pod utjecajem brzih promjena zbog antropogenog utjecaja pa predstavlja posebno područje od interesa. U primorskom dijelu Hrvatske, s naglaskom na Dalmaciju, prevelika su iscrpljivanja krških izvora, što bi u skorijoj budućnosti moglo ugroziti opstanak 16 endemskih slatkovodnih riba krških vodotokova (Mrakovčić i sur., 2006.).

U Direktivi o staništima iz 1992. g. na popis životinjskih i biljnih vrsta od interesa za zajednicu čije očuvanje zahtijeva određivanje posebnih područja očuvanja uvrštene su vrste *S. microlepis* i *S. svallize* (Direktiva vijeća o očuvanju prirodnih staništa i divlje faune i flore, 92/43/EEZ, Prilog II). Nadalje, Bernskom konvencijom (Zakon o potvrđivanju konvencije o zaštiti europskih divljih vrsta i prirodnih staništa, Dodatak III, NN 6/2000) u Hrvatskoj su zaštićene vrste *S. svallize*, *S. microlepis* i *S. illyricus*. Za većinu *Squalius* vrsta populacijski je trend nepoznat, izuzev vrsta *S. zrmanjae* i *S. janae* sa stabilnim populacijskim trendom (Crivelli, 2006c., Freyhof, 2011a.). Kategorija ugroženosti vrsta *Squalius* i stupanj njihove zaštite prikazani su u Tablici 3.

Kategoriji najmanjeg stupnja zabrinutosti (LC) pripada vrsta *S. squalus* (Freyhof, 2011b.), dok joj regionalni status nije poznat (Kottelat i Freyhof, 2007.).

Vrsta *S. janae* je u kategoriji osjetljivih vrsta u Hrvatskoj s trenutno stabilnim populacijskim trendom. Lokalno je vrsta zastupljena u velikom broju, te za sada nema dokaza da se veličina populacije smanjuje. Iako trenutno ne postoji dokazana prijetnja za opstanak vrste, unos novih ribljih vrsta zajedno s povećanim periodom suša uslijed klimatskih promjena predstavljaju stvarnu potencijalnu prijetnju za ovu vrstu. Trenutno za ovu vrstu ne postoje određeni konzervacijski planovi (Freyhof, 2011a.).

Vrsta *S. microlepis* pripada kategoriji ugroženih vrsta. Vrlo je osjetljiva na promjene uvjeta staništa koji se mijenjaju zbog klimatskih promjena, onečišćenja krških vodotokova i ostalih, antropogenih utjecaja poput ujezerivanja, melioracije i slično te unosa alohtonih vrsta. Izrazit je pad brojnosti makla primijećen u Prološkom blatu i Ričini zbog pretjeranog broja babuški, šarana i grgeča. Osim toga, ima manju vrijednost u prehrani stanovništva (Ćaleta i sur., 2015.). Zbog toga je u posljednjih trideset godina primijećeno znatno smanjivanje njegove populacije, a trenutni je populacijski trend nepoznat (Mrakovčić i sur., 2006., Crivelli, 2006a.).

U Hrvatskoj vrsta *S. illyricus* pripada kategoriji gotovo ugroženih vrsta zbog prilično uskog areala uzrokovanih pogoršanjem stanišnih uvjeta u Cetini i Krki, unosa alohtonih vrsta riba i onečišćenja staništa. Trenutno je populacijski status vrste nepoznat, ali smatra se da se populacija ne smanjuje zadnjih 10-ak godina (Crivelli, 2006b.). Do sada je za zaštitne mjere predloženo stvaranje ihtioloških rezervata na područjima obitavanja vrste te sprječavanje unosa alohtonih vrsta, kao i sprječavanje regulacije i pregrađivanja vodotokova, posebno za rijeku Cetinu (Mrakovčić i sur., 2006.).

Vrsta *S. zrmanjae* spada u kategoriju gotovo ugroženih vrsta (Crivelli, 2006c.). Smatralo se da vrstu ugrožavaju višestruki čimbenici poput onečišćenja vodotokova, gradnje akumulacijskih jezera, turizma, krivolova i unosa alohtonih vrsta radi sportskog ribolova (Mrakovčić i sur., 2006.), međutim trenutno je vrsta stabilnog populacijskog trenda bez poznatih trenutnih prijetnji za vrstu (Crivelli, 2006c.).

Vrsta *S. svallize* također pripada kategoriji osjetljivih vrsta u Hrvatskoj čiji je trenutni populacijski trend nepoznat (Crivelli, 2006d.). Do sada su primjećivane ekstremne fluktuacije broja subpopulacija zbog ograničenog areala, gubitka staništa i kontinuiranog zagađivanja staništa. Svalić je izuzetno osjetljiv na ljudske aktivnosti pa bi vrlo brzo mogao postati kritično ugroženom ili čak izumrlom vrstom (Mrakovčić i sur., 2006.). Osim toga, prijetnju za opstanak vrste predstavlja i unos egzotičnih vrsta riba (Crivelli, 2006d.).

Sitnoljuskavi klen, *S. tenellus*, spada u kategoriju ugroženih vrsta. Nepoznatog je populacijskog trenda s vrlo uskim područjem rasprostranjenosti. Najveća su mu prijetnja isušivanja koja će se učestalije događati zbog klimatskih promjena. Za ovu vrstu konzervacijski su planovi potrebni u vidu očuvanja i obnove staništa, te rukovanja istim (Freyhof i Kottelat, 2008.).

Potrebno je naglasiti da je u zadnje vrijeme, zbog brze promjene specijaliziranih staništa na koje su endemi prilagođeni, upitan opstanak prirodnog rasporeda vrsta (Ćaleta i sur., 2015.).

Tablica 3. Status istraživanih vrsta roda *Squalius* prema kategorijama ugroženosti i stupnju zaštite
Značenje kratica: IUCN (eng. International Union for Conservation of Nature) - Međunarodni savez za očuvanje prirode; LC - najmanje zabrinjavajuća; NT - gotovo ugrožena; VU - osjetljiva; EN - ugrožena; CR - kritično ugrožena vrsta

Vrsta	**IUCN (IUCN, 2019.)**	**Crvena knjiga HR (Mrakovčić i sur., 2006.)**	**Pravilnik o strogo zaštićenim vrstama (NN 144/13, 73/16)**
S. janae	VU (Freyhof, 2011a.)	Nije na popisu	Nije zaštićena
S. squalus	LC (Freyhof, 2011b.)	Nije na popisu	Nije zaštićena
S. svallize	VU (Crivelli, 2006d.)	VU	Nije zaštićena
S. zrmanjae	NT (Crivelli, 2006c.)	VU	Strogo zaštićene populacije iz Krupe i dijela Zrmanje u PP Velebit
S. illyricus	NT (Crivelli, 2006b.)	VU	Nije zaštićena
S. tenellus	EN (Freyhof i Kottelat, 2008.)	Nije na popisu	Nije zaštićena
S. microlepis	EN (Crivelli, 2006a.)	CR	Strogo zaštićena vrsta

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Područje istraživanja

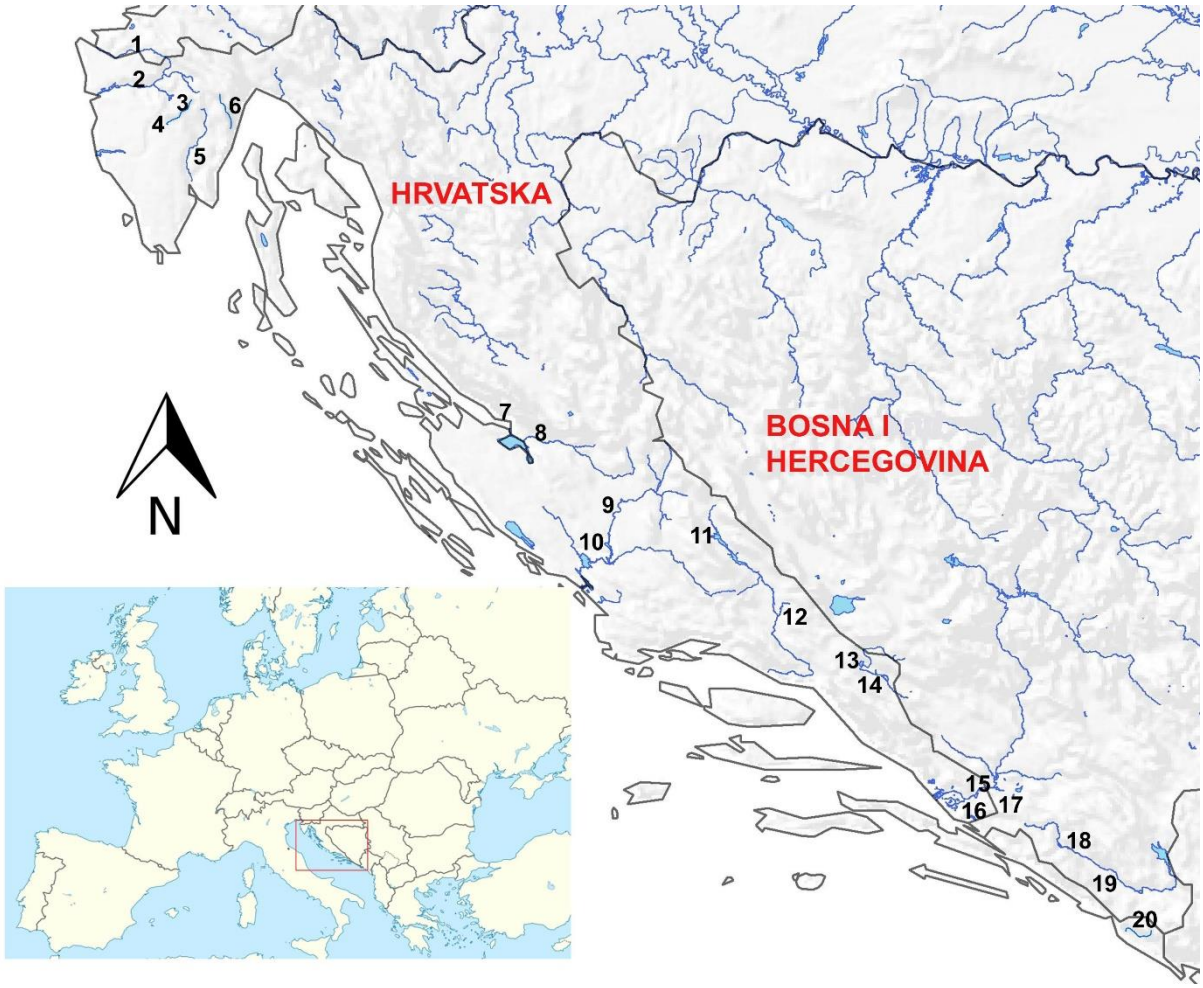
Jadranski slijev zauzima 32% površine Hrvatske. Karakteriziraju ga riječne doline, kanjoni u kršu, velika krška polja s rijekama ponornicama te bogate bočate vode ušća velikih rijeka. Obilježja rijeka jadranskog slijeva jesu izoliranost i kratka duljina površinskih vodotokova te česta povezanost sustavima podzemnih voda kroz koje dolaze značajne količine vode. Iako nadzemni dijelovi mogu potpuno presušiti tijekom ljeta, podzemni sustavi vodotoka i rezervoara u tim razdobljima ribama omogućuju preživljavanje. Rijeke jadranskog slijeva siromašnije su vodom, većeg su pada i imaju malo pritoka u usporedbi s dugim rijekama crnomorskog slijeva (Riđanović, 1983.).

Primorsko-istarski bazen čine rijeka Soča te istarski, kvarnerski i gorsko-kotarski vodotokovi. Istarski je poluotok geološki vrlo heterogeno područje koje se izmjenično sastoji od vapnenca i trošnih pješčanih flišnih područja. Prilikom jakih kiša fliš erodira te se ispire u vodotokove. Poluotok čini hidrogeološku cjelinu s prirodno odvojenim sljevovima rijeka Dragonje, Mirne, Raše i Boljunšćice te slijevom zapadne i južne obale Istre. Slijev Raše i Boljunšćice čini dio središnjeg istarskog flišnog bazena koji se većinom drenira preko Pazinčice prema izvorima u desnu obalu rijeke Raše i priobalnog izvora Blaž u Raškom zaljevu. Područje krških karbonatnih stijena s kojeg dijelom voda otječe prema istočnoj strani Istarskog poluotoka te dijelom prema krajnjem jugu, čini slijev zapadne i južne Istre (Šafarek i Šolić, 2011.). Ihtiofauna istarskih rijeka nije nikada bila sustavno proučavana. Brojne su endemske vrste ugrožene zbog presušivanja vodotokova, utjecaja unesenih stranih vrsta riba, industrijskog onečišćenja i poljoprivrede. Zbog svega navedenoga, za ljetnih se mjeseci događaju pomori riba (Mrakovčić i sur., 2006.). Najmanji je protok vode u razdoblju od srpnja do rujna, a najveći u siječnju (Mirna), prosincu (Lika) i travnju (Rječina i Gacka). Uočena je tendencija sniženja minimalnih godišnjih vodostaja (Plan upravljanja vodnim područjima, Dodatak II, NN 66/2016).

U dalmatinski bazen ubrajaju se rijeke Zrmanja, Krka i Cetina i njihove pritoke, dok se u hercegovački bazen ubrajaju Neretva i njezini pritoci. Najniži su vodostaji od kolovoza do listopada kada dio manjih vodotokova presušuje, dok su najveći protoci zabilježeni u travnju, a rjeđe u siječnju i prosincu. Nisu uočene sustavne promjene minimalnih godišnjih vodostaja, ali je uočeno sniženje najviših i srednjih godišnjih vodostaja na Neretvi (Metković), Cetini (Han) i Matici (Dusina) (Plan upravljanja vodnim područjima, Dodatak II, NN 66/2016). Ovakvi specifični ekološki i stanišni uvjeti, uz zanimljivu geološku prošlost, čine ovo

područje središtem bioraznolikosti, uz izuzetno bogatstvo endemskih vrsta. Zrmanja, Neretva i Kupa plovne su rijeke.

Ovim su istraživanjem obuhvaćene rijeke jadranskog slijeva, a uzorkovanje je vršeno na sljedećim lokalitetima: Dragonja (DR), Mirna (MI), Borutski potok (BP), Pazinčica (PA), Raša (RŠ), Boljunšćica (BO), Ričica (Lika - LI), Zrmanja (ZR), Krka (KR), Visovac - Krka (VS), Vinalić - Cetina (VI), Ruda (RU), Prološko blato (PB), Vrljika (VR), Neretva (NE), Metković - Neretva (ME) i Ljuta (LJU). Osim na navedenim lokalitetima u Hrvatskoj, uzorci su prikupljani i na lokalitetima u BiH: Hutovo blato (HB), Trebišnjica (TR) i Ravno/Popovo polje (RA) (Slika 9).



Slika 9. Istraživani lokaliteti u Hrvatskoj i BiH
1 - Dragonja, 2 - Mirna, 3 - Borutski potok, 4 - Pazinčica, 5 - Raša, 6 - Boljunšćica, 7 - Ričica (Lika), 8 - Zrmanja, 9 - Krka, 10 - Visovac/Krka, 11 - Vinalić/Cetina, 12 - Ruda, 13 - Prološko blato, 14 - Vrljika, 15 - Neretva, 16 - Metković/Neretva, 17 - Hutovo blato (BiH), 18 - Trebišnjica (BiH), 19 - Ravno/Popovo polje (BiH), 20 - Ljuta

Na ovaj je način obuhvaćen cjelokupan ili što veći dio areala svih istraživanih vrsta, a za vrste predstavljene s većim brojem populacija uzorkovalo se na većem broju lokaliteta. Radi dostupnosti materijala i snažnijeg utvrđivanja filogenetičkih odnosa uvršteni su i dostupni uzorci iz rijeke Drave iz crnomorskog slijeva. Lokaliteti su izabrani na temelju prethodnih istraživanja i literaturnih podataka o vrstama iz roda *Squalius*. Ukoliko je bilo moguće, na pojedinom je lokalitetu uzeto 12-15 uzoraka, međutim veličina uzorka na nekim je lokalitetima bila ograničena smanjenom dostupnošću.

Rijeka Dragonja teče uz sjevernu granicu spoja tršćanskog i pazinskog flišnog bazena, a okružena je planinama - sjeveroistočno Ćićarijom i istočno Učkom. Nastaje spajanjem nekoliko potoka u Sloveniji kod naselja Popeter te se proteže na području sjeverozapadne Istre, a ulijeva se u Jadransko more u Piranskom zaljevu. Sveukupna slivna površina Dragonje iznosi 141 km^2, dok je dužina toka 26 km, od kojih je 12 km u Hrvatskoj. Rijeka je nastala spajanjem lijevog i desnog toka, koji se spajaju kod Škrlina, a nazivaju je još i Rokava. Lijevi tok ili Velika Rokava nastaje spajanjem više potoka u flišnom području kod Gračišća, dok desni tok, Mala Rokava ili Pinjevec izvire podno Kocjančića. Dalje se Dragonja proteže po široj dolini nizvodno uz rub bujskog krasa te se ulijeva u Savudrijsku valu Piranskog zaljeva. Dragonja ima brojne pritoke, od kojih je 18 desnih (najvažniji je Pinjevec) i 13 lijevih (najvažnija je Argila). Drugi su pritoci bujičnog karaktera. Ljeti često presušuje, a za vrijeme većih kiša poplavljuje okolno područje. U donjem toku, ispod bujske ploče višestruki jaki i stalni izvori napajaju Dragonju. Donji je tok rijeke preusmjeren u umjetno korito potoka Sv. Odorik (Šafarek i Šolić, 2011.). Dragonja je duboko urezana u mekanu flišnu podlogu, a karakteriziraju je mnogobrojni brzaci, virovi, meandri, šljunčare i slapovi kaskadnog tipa uslijed intenzivnijeg trošenja mekanih laporastih slojeva u odnosu na čvršće slojeve pješčenjaka (Slika 10). Donji je tok velika naplavna ravnica melioriranih poljoprivrednih površina, gdje je Dragonja regulirana i preusmjerena u umjetno korito. Područje uz rijeku je nenaseljeno. U rijeci prevladava karakteristično vodeno raslinje, dok na većim šljunčarama raste i vegetacija tipična za krške travnjake većih visina (Bertoša i Matijašić, 2005.).

Ribe su lovljene u donjem dijelu toka, 5 km uzvodno od ušća, kod graničnog prijelaza Požane (Mlini), gdje još uvijek prevladava slatka voda.



Slika 10. Dragonja (Foto: preuzeto iz Bogutskaya i Zupančič, 2010.)

Slijev Mirne proteže se površinom od 541 km^2 u zapadnom i središnjem dijelu Istre te obuhvaća planinsko područje Ćićarije na sjeveru. S dužinom od 53 km, Mirna je najduža površinska rijeka u Istri. Izvire u jugozapadnom dijelu ćićarijskog pobrđa, podno Huma, a u Jadransko se more ulijeva blizu Novigrada. Na izvorištu rijeka stvara slapove preko kaskada, nakon čega pada u jezerce te nastavlja u gornji, kanjonski dio toka spuštajući se 11 km do doline u podnožju Buzeta. Dalje je vrlo blagog pada pa je rijeka za vrijeme srednjeg vodostaja mirna, po čemu je vjerojatno dobila i naziv. Na izlasku iz kanjona u Mirnu utječe Draga s kojom zajedno prolazi kroz Buzetsku dolinu (Slika 11). Nizvodno od Buzeta Mirna se širi u riječnu naplavnu ravnicu kraj Istarskih toplica te nakon Motovunske šume teče gotovo ravnim kanalom sve do ušća kod Novigrada. Gornji je dio vodotoka reguliranog korita zbog poplavljivanja područja (Šafarek i Šolić, 2011.). S desne strane pritječu bujični pritoci Draga i Rečica (kod mosta u Buzetu), iza Kamenih vrata duža rječica Bračana (8 km), u podnožju Grožnjana i Brtonigle vodotokovi Belišica i Mulac te desetak povremenih bujičnih tokova. Lijevi su pritoci uglavnom manji bujični protoci, a vodu donosi i vrlo razgranati slijev vodotoka Butonige (danas ujezeren u umjetnu vodoopskrbnu akumulaciju). Postoje i podzemni vodotokovi, od kojih su važni Sv. Ivan u Buzetu i najveći krški izvor Istarskog poluotoka - Gradole kod mosta Ponte Portona. Značajan dovod vode podzemnim putem dolazi i iz izvora Bulaž s karbonatnog područja između Istarskih toplica i Savudrije.

Podzemni je dovod vode uvjetovan tektonskim pukotinskim sustavima u vapnenačkim naslagama i vrlo složenom navlačnom građom Ćićarije, ljuskave strukture, što čini podjednaku veličinu površinskog i podzemnog slijeva. Upravo zbog toga, za vrijeme kiša dolazi do nepredvidivih velikih poplava (Bertoša i Matijašić, 2005.).

Ribe su lovljene nizvodno kod utoka Butonige u Mirnu.

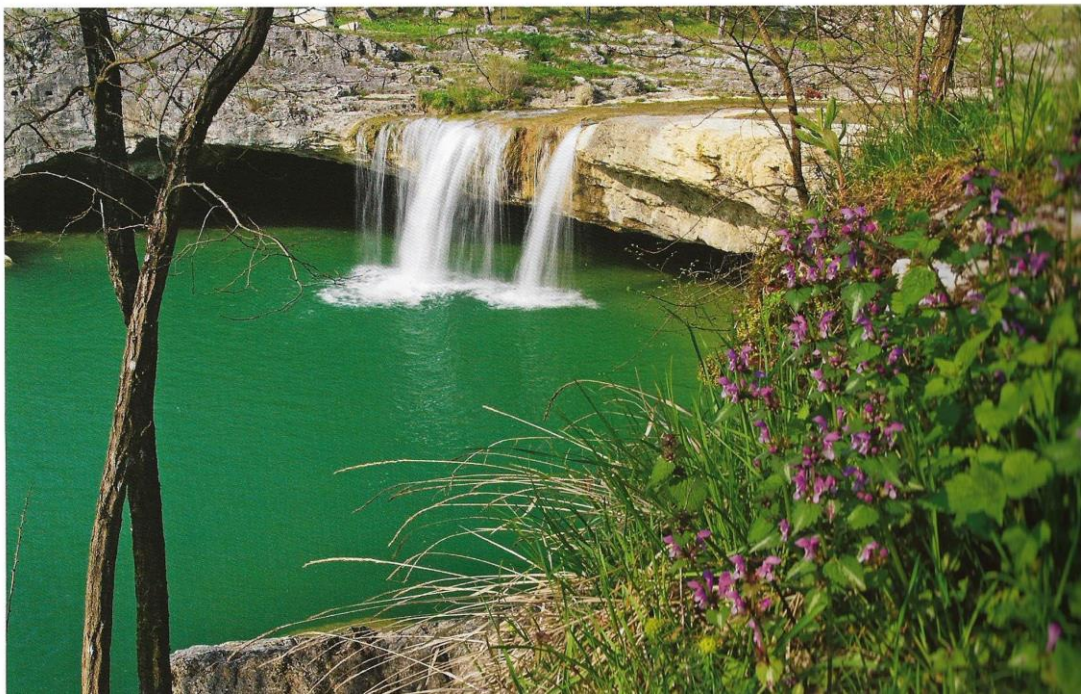


Slika 11. Kanalizirani dio rijeke Mirne (Foto: Zoran Marčić)

Pazinčica (Pazinski potok, Potok ili Fojba) je najduža istarska ponornica sa stalnim vodotokom (Slika 12), smještena u središtu Istre. Dužina je glavnog vodotoka do točke poniranja oko 18 km uz pad od samo 35-50 m. Izvorište joj je na južnim padinama Učke, iz triju potoka u zaleđu Boruta. Potoci Lipa, Rakov i Borutski potok kod Cerovlja se spajaju u jednu rječicu. Pazinčica ima nekoliko (uglavnom) stalnih nadzemnih pritoka koji teku kroz fliš: Brestovicu, Toplicu, Lipu, Rakov potok i Frnežar te brojne povremene bujične pritoke. Ponire u Pazinskoj jami na kontaktu vodonepropusne flišne podloge i vodopropusnih vapnenaca, nakon čega se ponovo pojavljuje na izvorima uz dolinu Raše. U geološkoj prošlosti Pazinčica je nadzemno otjecala u Jadransko more kod Limske drage, pa je Limski kanal zapravo potopljeno ušće Pazinčice (Šafarek i Šolić, 2011.). Zbog sve više plastičnog i drugog teško razgradivog antropogenog otpada, poniranje naplavljene vode sporije je u

odnosu na druge krške ponornice. Kemijsko onečišćenje rijeke uzrokovano je različitim uljima i mazutom. Dio Pazinčice kod Cerovlja uređenog je korita zbog poljoprivredne obrade okolnih područja. Područje je ponekad poplavljeno pa se planira dizanje brane i iskorištavanje akumulacije za elektroenergetske potrebe (Bertoša i Matijašić, 2005.).

Ribe su lovljene kod mjesta Slavčići i blizu mjesta Borut.



Slika 12. Slap Zarečki krov na Pazinčici (Foto: Preuzeto iz Šafarek i Šolić, 2011.)

Raša izvire u Čepićkom polju između slijeva ponornica Pazinčice i Boljunšćice, a dugačka je 23 km (Slika 13). Porječje Raše iznosi 279 km^2, a nekada je uključivalo i rijeku Boljunšćicu, no nakon regulacija vodotoka i izgradnje brane isušeno je i meliorirano nekadašnje jezero na Čepićkom polju koje je povezivalo Rašu s Boljunšćicom (Plan upravljanja vodnim područjima, Dodatak II, NN 66/2016). Najsjeverniji izvor je Posterski potok koji izvire 300 m ispod Paza. Tok se širi u dolini Rakita na 25 m nadmorske visine, nakon čega Raša zaprima vode povremenih pritoka s fliškog područja - Tupaljskog potoka (izvire istočno od Gračišća) i Posterskog potoka. Nakon toga slijedi kanjonski dio rijeke usječen u vapnence, gdje se i s desne i s lijeve strane ulijeva nekoliko povremenih pritoka. U Jadransko more Raša utječe u Raškom zaljevu, gdje plimni val utječe na pojavu bočate vode u donjem dijelu toka (Božičević i Matijašić, 2005.). Rijeka Raša donosi velike količine sedimenta iz flišne unutrašnjosti Istre kojim zatrpava svoje ušće. Cijeli je tok Raše danas melioriran pa se to područje koristi za poljodjelstvo (Šafarek i Šolić, 2011.).

Ribe su lovljene kod mjesta Šilci (Barišići) u blizini Potpićna.



Slika 13. Rijeka Raša (Foto: Perica Mustafić)

Rijeka Boljunšćica (ili Boljunčica) smještena je u sjevernoistočnom dijelu unutrašnje Istre (Slika 14). To je mala rijeka povremenog vodotoka. Porječje zauzima površinu od 230 km^2, dok dužina glavnog vodotoka iznosi 33 km (Plan upravljanja vodnim područjem, Dodatak II, NN 66/2016). Glavni je dotok vode iz Lupoglava i zapadnih obronaka planine Učke koji se spajaju kod Boljunskog polja. Izvori vodotokova su na 360 i 930 m nadmorske visine, a najniža je točka na području Čepićkog polja, iz kojeg se rijeka prokopanim tunelom ulijeva u Plominski zaljev. Boljunšćica je nekada utjecala u rijeku Rašu preko Čepićkog jezera. Kod Letaja je 1970. g. izgrađena betonska brana te je stvorena akumulacija (Božičević, 2005.).

Ribe su lovljene ispod Boljuna.



Slika 14. Rijeka Boljunšćica (Foto: Perica Mustafić)

U sjeverozapadnom dijelu Dalmacije, s površinom od 1379 km^2, nalazi se slijev Zrmanje. Rijeka Zrmanja dugačka je 69 km te vijugavo prolazi kroz polja i kanjone. Izvire iz vrela jedinstvena oblika u južnom dijelu Like podno planine Poštak, na nadmorskoj visini od 325 m. Od izvora do Kravljeg mosta ima stalan tok nakon čega započinje zona poniranja kroz manja krška polja i brojne kanjone te prolazi kroz Mokro polje, Ervenik i Žegarsko polje. U zapadnom kraju Mokrog polja velike količine vode nestaju u podzemlju, što u ljetnim mjesecima rezultira izrazito niskim vodostajem, pa i potpunim presušivanjem korita rijeke. Nakon prolaska kroz polja, podno Paninog kuka u Zrmanju se ulijeva Krupa, najznačajniji pritok. Dalje se tok Zrmanje nastavlja jugozapadno sve do Novigradskog mora, gdje se 12 km nizvodno od Obrovca ulijeva u Jadransko more. Ljeti, u vrijeme niskog vodostaja more može doći čak uzvodno od Obrovca. Najveći dio vode dolazi iz planine Poštak, ali znatan priljev dolazi iz vrela i pritoka te iz voda koje poniru na rubovima polja kod Gračaca. U slijevu Zrmanje tlo se uglavnom sastoji od vapnenca i dolomita. Najveće su količine vode u kasnu jesen, zimi i u proljeće. U srednjem dijelu tijekom ljeta Zrmanja presuši, dok se donji tok opskrbljuje vodom iz pritoka. U geološkoj je prošlosti Zrmanja nadzemno otjecala u Krku (Božičević, 1992.), s kojom je danas podzemno povezana na njezinom središnjem dijelu, pa govorimo o zajedničkoj ihtiocenozi tih rijeka (Mrakovčić i sur., 2006.). Na rijeci je sredinom

prošlog stoljeća sagrađena reverzibilna hidroelektrana Velebit. Kroz čeličnu se cijev voda pušta iz hidroakumulacijskog jezera Ričica i ulijeva se u akumulaciju na Zrmanji. U ovom se dijelu ulijeva i rječica Dobarnica (Božičević, 1992.). Ihtiofauna rijeke Zrmanje i pritoka slabo je istražena, a polovica pronađenih vrsta pripada endemima. Krivolov i sve veći razvoj turizma ugrožavaju obitavajuće vrste, a dodatnu prijetnju predstavlja planirana izgradnja novih akumulacija (Mrakovčić i sur., 2006.).

Ribe su lovljene u Zrmanji kod mjesta Ogari, na kraju kanjonskog dijela rijeke (Slika 15), te u jezeru Štikada u koji se ulijevaju sve okolne vode s kojima je rijeka povezana kanalom rijeke Ričice kod Gračaca i podzemnim tunelom rijeke Otuče.



Slika 15. Rijeka Zrmanja (Foto: Zoran Marčić)

Slijev rijeke Krke prostire se površinom od 2657 km^2 na teritoriju Hrvatske i BiH. Krka je dugačka 72,5 km, od čega je 49 km slatkovodni, a 23 km bočati vodotok. Rijeka Krka smještena je u Dalmaciji na području Šibensko-kninske županije, a okružena je planinskim masivima Velebita, Dinare, Svilaje i Mosora. Glavni izvor Krke nalazi se u podnožju Dinare, u blizini Knina ispod slapa Topoljskog buka, kojim se rijeka Krčić ulijeva u Krku. Dalje prolazi kroz Kninsko, Petrovo i Kosovo polje - gdje se ulijevaju značajni pritoci Kosovčica i Orašnica. Nizvodno od Kninskog polja ulijeva se najizdašniji pritok Butišnica (39 km), a kod

Skradinskog buka utječe rijeka Čikola (s Vrbom - 37,8 km). Nizvodno od Skradinskog buka tok je Krke pod utjecajem mora s bočatim izvorima. Najveći izvori podzemnih tokova jesu Miljacka i Jaruga u kanjonskom dijelu toka Krke, te Torak u kanjonu rijeke Čikole. Kroz podzemni izvor Miljacke Krka dobiva vodu od porječja Zrmanje, što ljeti u uvjetima niskog vodostaja uzrokuje presušivanje dijela toka rijeke Zrmanje (od Mokrog polja do vrela Crnog bunara). U potopljenom dijelu ušća ulijeva se Guduča. Dio vode dolazi podzemnim putem iz dinarskog zaleđa BiH (Grohovo polje). Na izlazu iz polja Krka ulazi u kanjon gdje nakupljene sedrene barijere stvaraju brojne kaskade na kojima se formiralo više velikih slapišta, od kojih je najpoznatiji Skradinski buk. Izdizanje slapova, Visovačkog jezera i ostalih nakupina vode u kanjonskim dijelovima uzrokovalo je stvaranje sedrenih naslaga u postwürmskom razdoblju, koje se nastavlja i danas. Dio toka Krke od Knina do Skradina proglašen je nacionalnim parkom i pripada svjetskoj prirodnoj baštini pod zaštitom UNESCO-a (United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization). Skradinski buk usporava tok rijeke stvarajući Visovačko jezero, gdje se razvila prava močvarna vegetacija (Slika 16). Na kraju Visovačkog jezera u Krku se ulijeva rijeka Čikola. Poslije Skradinskog buka kanjon se sužava do Skradina pa se opet širi u Prokljansko jezero iz kojeg se nastavlja kanjonom. Krka se u Jadransko more ulijeva kod Šibenika. Ušće se proteže od Šibenika do Prokljanskog jezera, a nastalo je nakon otapanja ledenog pokrova u würmskom periodu u pleistocenu, kada je došlo do podizanja morske razine i potapanja današnje jadranske obale (Šafarek i Šolić, 2011.). Prirodni i krški fenomen rijeke Krke čini sedam sedrenih slapova - Bilušića buk (22,4 m), Brljan ili Ćorića buk (oko 22 m), Manojlovac (32 m), Rošnjak (8 m), Miljacka (24 m), Roški slap (22,5 m) i najpoznatiji Skradinski buk (47,5 m), koji se s dužinom od 800 m i širinom 200 do 300 m smatra najvećim sedrenim slapištem u Europi. Od svih slapova, jedino se Bilušića buk ne iskorištava za hidroenergiju. Na rijeci je sagrađeno pet hidroelektrana - HE Jaruga ispod Skradinskog buka (danas dio Nacionalnog parka Krka), HE Miljacka 15 km nizvodno od Knina, HE Golubić na pritoci Butišnici, MHE (mala hidroelektrana) Roški slap na položaju Roškog slapa i MHE Krčić u blizini Knina (Šafarek i Šolić, 2011.). Ihtiofauna rijeke Krke slabo je istražena, a posebno je zanimljiva zbog velikog broja endemskih vrsta. Unesene vrste riba radi sportskog ribolova - poput kalifornijske pastrve, šarana i lipljana, te gambuzije radi suzbijanja komaraca ugrožavaju opstanak endemskih vrsta. Hidroelektrane mijenjaju prirodne uvjete i negativno utječu na populacije riba. Osim toga, otpadne gradske industrijske vode iz Drniša i Knina te marina u Skradinu, unutar nacionalnog parka, dodatno ugrožavaju populacije riba (Mrakovčić i sur., 2006.).

Uzorci su prikupljani u močvarnom području kod manastira Krka i u jezeru Visovac.



Slika 16. Jezero Visovac (Foto: Zoran Marčić)

Slijev rijeke Cetine pokriva površinu od ukupno 4145 km^2. S dužinom od 104 km, Cetina je smještena u središnjem dijelu krškog priobalnog dijela Hrvatske. Glavni izvor Cetine, Modro oko Glavaševa vrela (vrelo Cetine ili Milaševo jezero) nikada ne presušuje, a smješten je na jugozapadnim obroncima Dinare, u blizini Vrlike na 382 m nadmorske visine (Barić i sur., 2000.). U gornjem dijelu toka Cetina teče kroz više spojenih krških polja - Cetinsko, Koljansko, Ribaričko, Hrvatačko i Sinjsko polje. Glavninu vode rijeka dobiva u središnjem dijelu Cetinskog polja iz brojnih vrela smještenih na sjeverozapadnom dijelu polja (Štambuk-Giljanović, 2002.). Koljansko i Ribaričko polje potopljeni su ogromnom akumulacijom Peruča, koja je potopila preko 20 km rijeke i okolnih predjela. Prirodni se tok vraća na ulasku u Hrvatačko polje, gdje je Cetina izložena naglim oscilacijama vodostaja, ovisno o propuštanju vode kroz branu Peruča. U Sinjskom su polju usječeni mnogi melioracijski kanali s močvarnim obilježjima. Od Trilja rijeka prelazi u kanjonsko područje. Prvi je dio kanjona znatno izmijenjen zbog izgradnje hidroelektrane Đale i akumulacije Prančevići, dok se nešto uzvodnije vraća u svoj prirodni tok. Nakon toga se rijeka proširuje kod naselja Blato na Cetini (Slika 17), nakon čega se opet nastavlja u kanjonu. Kanjon Cetine proglašen je značajnim krajobrazom 2017. g. (NN 4/2017). Nakon slapa Gubavice tok se smiruje u riječnoj dolini prema ušću u gradu Omišu. Rijeka je slabo razvedena, s manjim

brojem pritoka - Rumin, te južnije Grab i Ruda. Južniji su pritoci glavna veza s Livanjskim i Duvanjskim poljem te Buškim blatom, a dijelom i Kupreškim i Glamočkim poljem u BiH. Zbog nagiba terena s kojeg oborine mogu pritjecati u Cetinu, znatan dio vode utječe podzemnim putem iz snažnih i stalnih vrela koja donose vodu iz visokih polja BiH, zbog čega rijeka nikad ne presušuje. Cetina ponire i napaja krške izvore u priobalju (Jadro, Žrnovnica, Studenac, vrulja Duboka) (Šafarek i Šolić, 2011.). Zbog povezanosti vodenih sustava te miješanja slatke i slane vode kod ušća, Cetina obiluje bogatom ihtiofaunom, od kojih je većina endemskih vrsta (Mrakovčić i sur., 2001.). Zbog znatne količine vode Cetina je pogodna za hidroenergetsko iskorištavanje. Izgradnja hidroelektrana na Cetini započinje krajem 19. st., od kada je izgrađeno pet hidroelektrana - HE Kraljevac, HE Peruča, HE Zakučac, HE Orlovac, HE Đale, što je u potpunosti promijenilo prirodno otjecanje voda i poremetilo vodni režim te je utjecalo na degradaciju krajobraza, podizanje razine podzemnih voda (Sinjsko polje), pojavu klizišta na obali i isušenje donjega toka iza brane Prančevići. Prirodna su korita potopljena, a promijenjena je i obala na ušću. Zbog toga Cetina više nema svoj prirodni tok, kao ni raspored flore i faune. Promjene uvjeta staništa osiromašile su riblji fond i mnoge populacije biljaka i drugih životinja. Osim toga, spriječena je uzvodna i nizvodna migracija riba, a ponegdje se gubi povezanost s podzemnim dijelom toka. Posljedice nisu sustavno istraživane, ali je primijećen porast ciprinidnih u odnosu na salmonidne vrste (Miletić, 2014.). Unos vrsta, dijelom radi sportskog ribolova, dodatno povećava opasnost za autohtonu ihtiofaunu Cetine. Poseban problem predstavlja babuška (*Carassius gibelio* Bloch, 1782) koja remeti strukturu endemskih populacija riba (Popović, 1985., Duplić, 2008.).

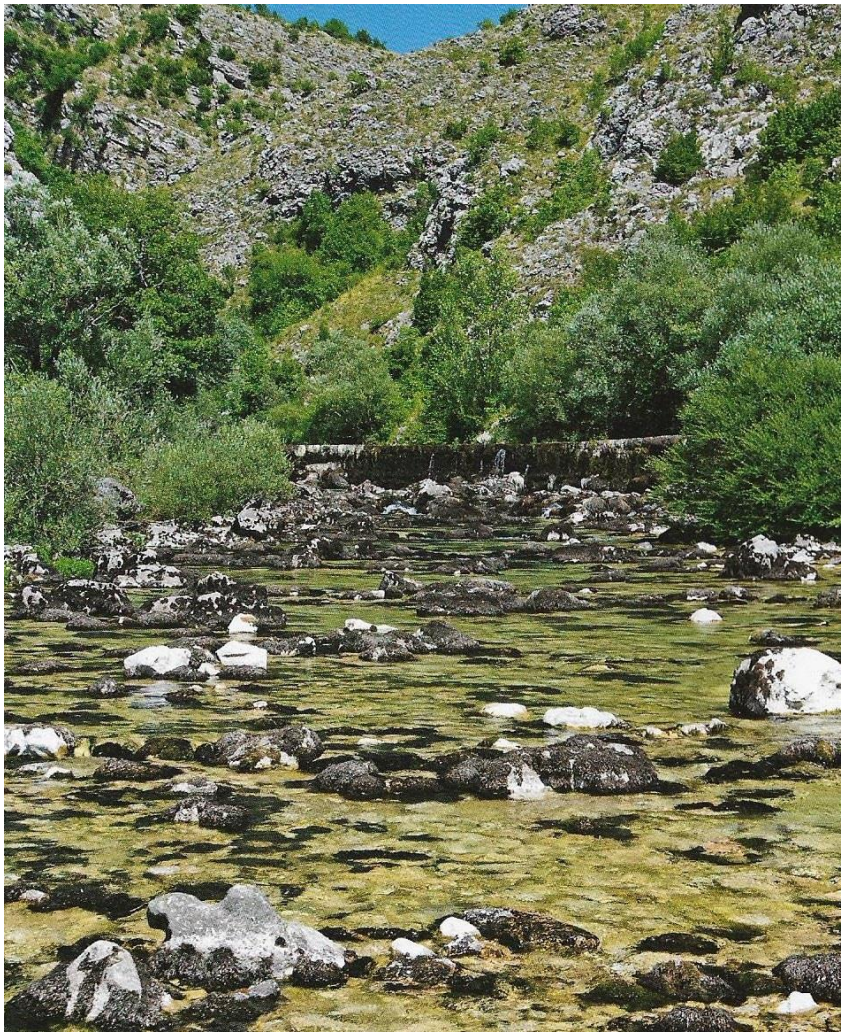
Uzorci su prikupljani u gornjem toku rijeke kod sela Vinalić, prije Peručkog jezera.



Slika 17. Postaja Blato na Cetini (Foto: Siniša Vajdić)

Rijeka Ruda smještena je u Sinjskom polju (Slika 18). Izvire kod mjesta Ruda, a u Cetinu se ulijeva na južnom kraju Sinjskog polja, sjeverno od grada Trilja. S lijeve strane pritječe rječica Grab s kojom se Ruda ulijeva u Cetinu. To je glavna poveznica Cetine s visokim bosanskohercegovačkim poljima, odakle Cetina prima većinu svoje vode. S desne strane utječe rječica Ovrlja. Izvorišni kanjonski dio rijeke proglašen je značajnim krajobrazom Republike Hrvatske 2002. g . U izvorišnom dijelu rijeke smještena je hidroelektrana Orlovac (Šafarek i Šolić, 2011.).

Uzorkovanje je vršeno nizvodno od HE Orlovac.



Slika 18. Ruda, važan pritok Cetine (Foto: preuzeto iz Šafarek i Šolić, 2011.)

Sjeverozapadni se dio tipično krškoga Imotskoga polja, smještenog u srednjem dijelu Dalmatinske zagore, u zaleđu Biokovske kose na oko 250 m nadmorske visine, povremeno pretvara u jezero. Na tom se poplavnom području stalno zadržava jezero Prološko blato, zaštićeno kao značajan krajolik 1971. g. (Bralić, 1995.). Prološko je blato podzemnim vodama povezano s Buškim blatom u BiH (Šafarek i Šolić, 2011.).

Vrljika predstavlja najvažniji vodotok Imotskog polja. Izvire iz snažnog vrela Opačac, a od Kamenmosta teče kao rijeka Matica. Tipična je ponornica krških polja koja ponire na kraju polja i ponovno se pojavljuje u BiH kao rijeka Tihaljina koja se preko Trebižata ulijeva u Neretvu. Dužina rijeke iznosi 70 km. U Vrljiku se ulijeva kanal Sija iz Prološkog blata, te lijevi pritoci Šipovača, Grudska rijeka i Vrljika-Glavina (Štambuk-Giljanović, 1998.). Izvorište rijeke Vrljike do mosta na Perinuši proglašeno je 1971. g. posebnim ihtiološkim rezervatom.

Sakupljanje jedinki roda *Squalius* izvršeno je u Prološkom blatu i Vrljici kod Runovića (Slika 19 i Slika 20).



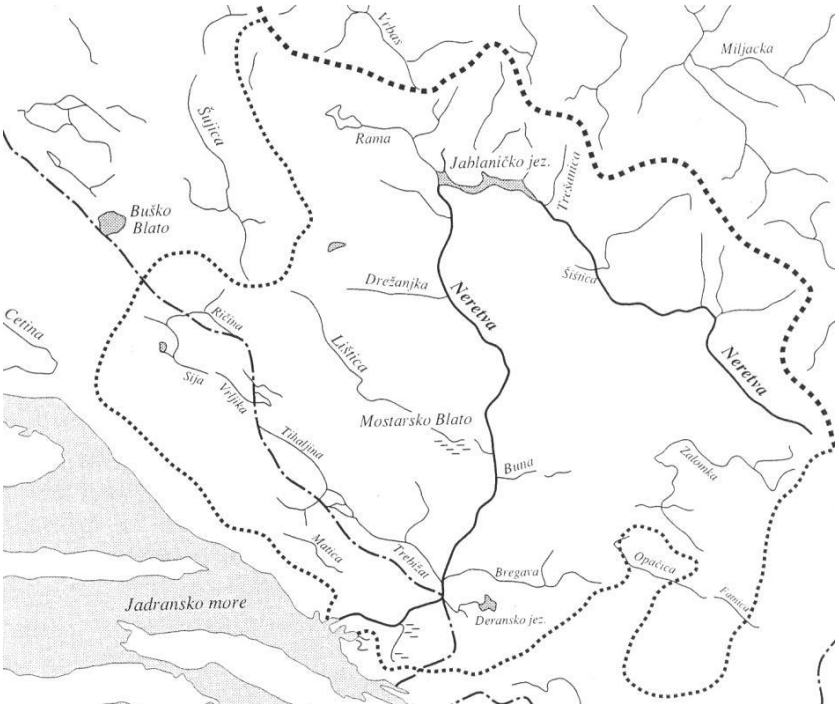
Slika 19. Prološko blato u Imotskom polju (Foto: Marko Ćaleta)



Slika 20. Rijeka Vrljika (Foto: Zoran Marčić)

Porječje rijeke Neretve zauzima ukupnu površinu od 10520 km^2, a najvećim se dijelom prostire u BiH, dok samo 280 km^2 pripada Hrvatskoj. Neretva je najduža rijeka jadranskog slijeva i primorskoga krškog područja. Dužina rijeke iznosi 215 km, od čega samo 22 km protječe južnom Hrvatskom u kojoj rijeka tvori široku deltu ulijevajući se u more. Oko 2600 ha površine pod zaštitom je kao poseban ihtiološki i ornitološki rezervat (Štambuk-Giljanović, 1998.). Izvor se nalazi u BiH na 1095 m nadmorske visine, ispod planina Zelengore i Lebršnik. U svom planinskom dijelu Neretva teče kanjonom. U Hrvatskoj teče kroz aluvijalnu dolinu s gornjim tokom do Konjica, srednjim do Počitelja, te donjim tokom od Počitelja - poznatim pod nazivom Donja Neretva (Štambuk-Giljanović, 1998.). Kod Opuzena se Neretva račva u 12 rukavaca, od kojih je najveći Mala Neretva, gdje čini prostranu deltu s kojom utječe u Neretvanski kanal (Bolić, 1992.). U svom donjem toku Neretva je tipična nizinska rijeka s vijugavim tokom, te zaostalim rukavcima i jezerima. Manji se pritoci spajaju u gornjem dijelu toka, gdje velika planinska rijeka usporava svoj tok i nakon što primi pritoke (Repešnicu, Šišticu, Rakitnicu, Konjičku bijelu i Konjičku ljutu s desne strane, te Lađanicu, Župski krupac, Bukovicu i Bijelu s lijeve strane) postaje tipična rijeka ravničarskog tipa. Nakon prolaza kroz grad Konjic Neretva prima pritok Trešanicu s kojim se širi u Jablaničko jezero, u koje dolaze vode iz Neretvice, Bašćice, Rame, Kraljuščice i drugih. Nizvodno od Jablanice, kod Drežnice prima Drežanku s kojom stvara Salakovačko jezero, a na putu do ušća rijeka prima još pritoke Mostarsku bijelu prije Mostara s kojom se širi u Mostarsko jezero, te Bunu nakon prolaza kroz grad. U donjem se dijelu Neretve ulijevaju manji pritok Bregava i veliki pritoci Trebižat i Trebišnjica. Trebižat donosi vodu posuške Ričine, imotske Suvaje i Vrljike i ljubuške Tihaljine i Mlade, od koje se jedan dio odvaja prema Rastočkom polju, a odatle podzemno izvire u Vrgorskom polju u kojem prikuplja vodu s kojom se zajedno slijeva u Baćinska jezera. Trebišnjica prima vodu iz Ravnog polja te se djelomično ocjeđuje u Neretvu. Nizvodno, Neretva prima Krupu koja istječe iz Deranskog jezera Hutovog blata i od te točke rijeka je plovna (Štambuk-Giljanović, 1998.). Nizvodno od Metkovića Neretva prima vodu iz pritoka Norin i Matica kod Opuzena (Slika 21).

Površina slijeva donjeg toka Neretve zauzima 5581 km^2 (Bolić, 1992.). Tu se nalaze i aluvijalna područja, od kojih su najveća Baćinska jezera. Velik se broj izvora nalazi na kontaktu aluvijalne doline i vapnenačkog oboda. Izvori su posljedica podzemnih tokova u kršu koji uglavnom donose vodu iz hercegovačkog porječja Neretve, a djelomično iz Vrgorskog polja. Zbog nepovoljnih hidrografskih prilika na cijelom području ljeti je mali dotok vode iz izvora (Štambuk-Giljanović, 1998.).



Slika 21. Geografski položaj slijeva Neretve (preuzeto iz Štambuk-Giljanović, 1998.)

Delta Neretve uvrštena je u Ramsarski popis svjetski značajnih močvarnih područja 1993. g. Močvarna su područja u ovom kraju prirodno očuvana i vrlo važna za biološku i krajobraznu raznolikost, ali i vrlo osjetljiva zbog izuzetnog antropogenog utjecaja. Preobrazba močvarnih područja u poljoprivredna područja utjecala je na degradaciju voda, šuma i cjelokupne bioraznolikosti toga kraja. Tako je sredinom 20. st. polovica ovog područja meliorirana, a potpuno su degradirana Donjoneretvanska blatija, dotadašnje najveće močvarno područje hrvatskog primorja, stanište mnogobrojnim ribama i pticama (Mrakovčić i sur., 2006.). Osim toga, pretjerani lov i ribolov, često bez ikakve kontrole i uz korištenje svih raspoloživih sredstava, ima negativan učinak na ihtiofaunu ovog područja, što se očituje u smanjenim populacijama ili čak nestanku pojedinih vrsta. Dodatni problem predstavlja i pet izgrađenih hidroelektrana na području BiH, čija je posljedica djelovanja poremećaj vodnog režima. Gradske i industrijske otpadne vode te industrija aluminija u Mostaru dodatno ugrožavaju i smanjuju kvalitetu staništa. Ovo je područje vrlo važno stanište za rast riblje mlađi, kao i za migracije anadromnih i katadromnih riba (Mrakovčić i sur., 2002.). U Neretvi živi 18 endema jadranskog slijeva i tri hrvatska endema. Zbog promjene prirodnih staništa i regulacija vodotokova većina bi endemskih vrsta mogla nestati (Mrakovčić i sur., 2006.).

Uzorci su prikupljani u blizini grada Metkovića i kod utoka Krupe u Neretvu koja donosi vode iz Hutovog blata (Slika 22). Na postaji u Metkoviću obala je betonirana, a dno je muljevito s nešto pijeska i šljunka i dosta vodenog bilja.



Slika 22. Rijeka Neretva (Foto: Zoran Marčić)

Na jugu Hercegovine, u donjem dijelu toka Neretve, smjestilo se malo i plitko močvarno područje Hutovog blata (Slika 23). To je tipična močvara submediteranskog tipa, otvorenog sustava jezera i potoka, s bujnom vegetacijom trščaka i vlažnih livada. Područje je močvare, zbog svojih prirodnih specifičnosti i velike bioraznolikosti i ljepote, 1995. g. proglašeno parkom prirode, a 2001. g. upisano je u Ramsarsku konvenciju kao močvarno područje od međunarodnog značaja. Osim toga, jedno je od najvažnijih zimovališta ptica. Hutovo blato zauzima površinu od oko 74 km^2 , s nadmorskom visinom od 1 do 143 m. Izdvojene su dvije geomorfološke cjeline - Deransko ili Gornje blato i Svitavsko ili Donje blato. Gornje blato čini pet manjih jezera međusobno povezanih jarugama - Deran, Orah, Drijen, Jelim i Škrka. Donje blato ili Svitavsko jezero umjetna je akumulacija nastala krajem 70-ih godina 20. stoljeća izgradnjom reverzibilne hidroelektrane Čapljina. Većina je jezera i potoka plitko (1-5 m) i s muljevitim dnom, a nalaze se ispod površine mora (kriptodepresije). Najdublje je jezero Jelim, s dubinom do 17 m. Površinske se vode i krške ponornice slijevaju u udoline i depresije te osiguravaju visoku razinu podzemne vode koja utječe na pojavu stalnih izvora i vrela (preuzeto sa službene internet-stranice parka: http://hutovo-blato.ba/o-parku/). Rijeka Krupa čini glavni vodotok Hutova blata te odnosi vodu iz Gornjeg i Donjeg blata u rijeku Neretvu. Dužina rijeke Krupe iznosi 9 km, dok je prosječna dubina do 5 m.

Krupa ne izvire nego istječe iz Deranskog jezera. Specifičnost je rijeke Krupe tok u oba smjera, od „izvora“ prema ušću i obrnuto, zbog visoke razine i velikog protoka vode kada rijeka Neretva potisne Krupu.

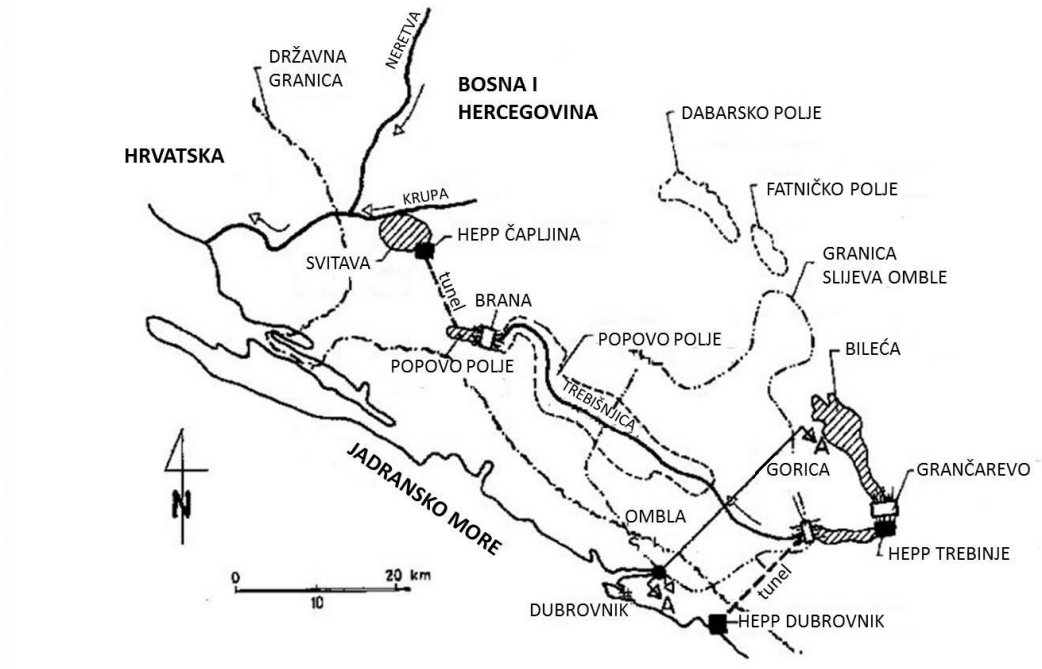
Vode su Hutovog blata preko rijeka Krupe i Neretve povezane s Jadranskim morem. Znatno isušivanje tla prije 60-ak godina i pretvaranje donjeg dijela Močvare (Svitave) u akumulaciju imalo je značajan negativan utjecaj na ihtiofaunu Hutovog blata. Urbanizacija, turizam, poljoprivreda i planirani hidrološki zahvati predstavljaju prijetnju očuvanja bioraznolikosti. Unos alohtonih vrsta zbog povećanja ekonomske vrijednosti močvare i okolnih voda prijeti ugrožavanju autohtonih ribljih populacija i ekosustava u cjelini (Glamuzina i sur., 2001.). Od klenova u Hutovom blatu živi endemski svalić, *S. svallize,* kao rezidentna vrsta s 2,47% zastupljenosti (Tutman i sur., 2012.), dok se rjeđe mogu naći i migratorni *S. cephalus* i *S.* sp. o kojem nema podataka (Zupančič, 2008.).



Slika 23. Kanal u Hutovom blatu (Foto: A. Šedivá)

Trebišnjica je ponornica na području BiH, Crne Gore i Hrvatske, gdje se ulijeva u Neretvu u donjem dijelu toka. Rijeka Trebišnjica predstavlja složen sustav površinskih i podzemnih tokova (Slika 24) ukupne dužine od 187 km, od čega je nadzemni dio toka dugačak 96,5 km. Rijeka potječe iz toka Mušnice koja prolazi kroz jezero Klinje i dalje kroz naselja, te iz toka Gračanice koja teče kroz Gatačko polje, nakon čega se spaja s Mušnicom

blizu Srđevića te se kratko pojavljuje u Fatničkom polju, pod imenom Fatnička rijeka. Poslije 30 km podzemnog toka Trebišnjica se u svojem srednjem toku ponovo pojavljuje kod Bileće, gdje izvire jakim vrelom na 398 m nadmorske visine. Nakon prolaza kroz Trebinjsko polje ponovno ponire u naselju Gorica. Nastavlja dalje kroz grad i sela do najvećeg balkanskog krškog polja - Ravnog (Popova) polja na nadmorskoj visini od 220 do 240 m. Nakon Ravnog polja rijeka se pojavljuje u tri toka - u Čapljini kod donjeg toka Neretve, zatim teče kao serija podvodnih voda i izvora (vrulja) u blizini Slanog u Hrvatskoj te tok kod pećine Gruž blizu Dubrovnika. U srednjem i donjem dijelu toka nalaze se dva akumulacijska jezera, Bilećko i Goričko jezero. Trebišnjica se podzemno povezuje s Omblom s kojom utječe u Jadransko more u blizini Dubrovnika (Glamuzina i sur., 2011.).



Slika 24. Geografski položaj (i današnji izgled) rijeke Trebišnjice (preuzeto iz Bonacci, 2004.)

Na Trebišnjici su od sedam planiranih izgrađene četiri hidroelektrane - HE Trebinje I, HE Trebinje II, PHE Čapljina i HE Dubrovnik. Izgradnja hidroelektrana izazvala je promjene prirodnog režima voda ovog područja, nakon čega je Trebišnjica izgubila status najduže rijeke ponornice na svijetu. Radi očuvanja vode od poniranja i razlijevanja, 1978. g. betonirano je 67 km riječnog korita (od Trebinja do sjeverozapadnog kraja Ravnog polja u blizini Hutova), pri čemu je rijeka izgubila oko 10 km svoje dužine, zbog čega su nestali mnogi ponori. Regulacija Trebišnjice, zbog razvijene poljoprivrede na oranicama Ravnog polja, utjecala je

na gubitak bujičnog karaktera toka rijeke te na izravnavanje korita. Tome su najviše pridonijeli izgradnja brane Grančarevo i Bilećke akumulacije (Božičević, 1992.).

Uzorci su prikupljani na kanaliziranom dijelu rijeke i u Ravnom (Popovom) polju (Slika 25 i Slika 26).



Slika 25. Kanalizirani tok rijeke Trebišnjice (Foto: L. Pialek)



Slika 26. Ravno polje kroz koje prolazi rijeka Trebišnjica (Foto: I Trklja)

Ljuta je najjužnija hrvatska rijeka ponornica, a teče u Konavlima u Dubrovačko-neretvanskoj županiji. Izvorište joj se nalazi u Konavoskim brdima, u blizini istoimenog sela, a povezano je s ponorima Trebišnjice na području Ravnog polja. U Konavoskom polju spaja se s Konavočicom s kojom zajedno i ponire (Šafarek i Šolić, 2011.). Čitavo područje rijeke Ljute 1975. g. ulazi u registar posebno zaštićenih objekata prirode (današnji zaštićeni krajobraz) (Rješenje Republičkog zavoda za zaštitu prirode, reg. broj 353; Službeni glasnik br. 6/1975.).

Uzorkovanje je vršeno kod utoka Konavočice u Ljutu (Slika 27).



Slika 27. Rijeka Ljuta (Foto: Perica Mustafić)

3.2. Prikupljanje uzoraka

Uzorci su prikupljani metodom elektroribolova radi preživljavanja riba bez trajnih posljedica i uz vrlo brz povratak u prirodno stanište, što je pogodno za istraživanje endemskih i ugroženih vrsta. Osim toga, metoda je vrlo efikasna i slabije selektivnosti s obzirom na veličinu jedinki, a u kratkom se vremenu ulovi zadovoljavajući i reprezentativan uzorak. Manja selektivnost omogućuje zastupljenost predstavnika obaju spolova i svih starosnih

skupina. Na taj se način uzima znatno manji uzorak, što je osobito važno za ulov endemičnih i ugroženih vrsta.

Metoda elektroribolova provodi se uz pomoć električnog polja kako bi se ulovile ribe (Snyder, 2003.). Elektroribolovni sustav sastoji se od izvora struje, pretvarača i elektroda. Izvor struje proizvodi dvofaznu ili trofaznu izmjeničnu struju, koja se pretvaračem pretvara u istosmjernu struju. Elektrodama se provodi strujni tok kroz vodu, stvarajući električno polje koje mora biti dovoljno jako kako bi kod riba izazvalo željeni odgovor, a da ne dođe do ozljede. Dva su tipa elektroda - pozitivna anoda koja izgleda kao obruč s mrežom na koji se nastavlja dugi ebonitni štap pomoću koje se love ribe, te negativna katoda koja se uranja u vodu. Ribe koje se nađu unutar električnog polja privremeno se umrtve zbog pojave galvanotaksije i nekontrolirane mišićne konvulzije zbog koje se ribe počnu kretati prema anodi. Jačina električnog polja određena je funkcijom omjera provodljivosti vode i efektivne električne provodljivosti ribe (Kolz i Reynolds, 1989.). Na učinkovitost elektroribolova utječu razni čimbenici - biološki (struktura ihtiocenoze, gustoća populacija, veličina jedinki, dobna struktura, ekologija, ponašanje životinja), fizikalni (električna provodljivost vode, kvaliteta vode, prozirnost), tehnički (ljudski faktor, znanje, iskustvo ljudi koji vrše ulov, veličina broda, kvaliteta opreme, građa i smještaj anoda), stanišni (brzina vode, dubina, supstrat dna), vremenski (doba dana) i sezonski (temperatura vode, vremenski uvjeti, visina vodostaja). Iako elektroribolov može ostaviti štetne posljedice u vidu ozljeda, stresa ili rijetko smrti, većina ihtiologa smatra i dalje da je ova metoda najdjelotvornija i s najmanjim posljedicama za ribe (Snyder, 2003.). Za prikupljanje uzoraka za ovo istraživanje korištena je istosmjerna struja, prema smjernicama Europske unije (CEN dokument, 2003.). Elektroribolov je izvršen uz pomoć Hans Grassl elektroagregata snage 2,5 i 7,5 kW. Ovisno o dostupnosti i lokalitetu, elektroribolov se vršio iz čamca ili s obale.

Broj riba ulovljenih na pojedinoj postaji i uključenih u filogenetičke analize prikazan je u Tablici 4. Osim vrsta iz rijeka jadranskog slijeva, u filogenetičku su analizu uključeni i dodatni uzorci iz Drave koji su nam bili dostupni, kako bismo povećali filogenetičku razlučivost. Za potrebe ovog istraživanja jedinkama se uzimao komadić prsne peraje koji se do daljnje obrade pohranjivao u 99%-tni alkohol.

Tablica 4. Broj jedinki ulovljenih na pojedinoj postaji
Naveden je i broj jedinki za koje su dobivene i analizirane potpune sekvence gena za citokrom *b* (*cyt b*), rodopsin (*rhod*), prvi intron gena za ribosomalni protein S7 (S7) i gena za aktivaciju rekombinacije (*rag1*). Za različite filogenetičke analize ponegdje su korištene iste jedinke.

R. br.	**Lokalitet**	**Porječje/ polje**	**Datum ulova**	**Uk. br. jedinki po postaji**	**Broj jedinki za filogenetičke analize**			
					cyt b	***rhod***	***rag1***	**S7**
1.	Dragonja	Dragonja	16.06.2014.	14	5	3	4	-
2.	Mirna	Mirna	16.06.2014.	13	6	1	1	-
3.	Borutski potok	Pazinčica	16.06.2014.	10	9	3	3	-
4.	Pazinčica	Pazinčica	16.06.2014.	10	8	5	3	-
5.	Raša	Raša	16.06.2014.	5	3	-	-	-
6.	Boljunšćica	Boljunšćica	16.06.2014.	10	8	-	-	-
7.	Ričica	Zrmanja	12.03.2015.	2	2	-	-	-
8.	Zrmanja	Zrmanja	12.03.2015.	16	4	2	1	1
9.	Krka	Krka	23.05.2014.	8	8	6	7	1
10.	Visovac	Krka	28.07.2014., 29.07.2014.	22	9	-	-	1
11.	Vinalić	Cetina	23.05.2014., 18.04.2015.	17	8	-	-	1
12.	Ruda	Cetina	12.04.2015.	4	1	2	1	-
13.	Prološko blato	Imotsko polje	10.02.2014.	2	2	1	1	-
14.	Vrljika	Imotsko polje	10.02.2014.	10	2	1	1	-
15.	utok Krupe u Neretvu	Neretva	18.09.2014.	16	9	5	4	-
16.	Metković	Neretva	18.09.2014.	5	4	4	5	2
17.	Hutovo blato	Neretva	18.09.2014.	5	4	-	-	-
18.	Trebišnjica	Trebišnjica	29.06.2010.	10	10	10	8	-
19.	Ravno polje	Trebišnjica	19.09.2010.	10	8	7	6	3
20.	utok Konavočice u Ljutu	Ljuta	18.09.2014.	22	17	14	13	4
21.	Drava	Dunav	02.09.2015.	6	6	6	2	-

3.3. Popis korištenih kemikalija, setova reagensa, puferskih otopina i laboratorijske opreme

Kemikalije

- etilni alkohol, 99%
- agaroza
- etidijev bromid, 0,5 mg/ml
- voda oslobođena od nukleaza (Water, nuclease free, ThermoScientific i RNase-free Water, Qiagen)

Reakcijske smjese

- DNeasy® Blood & Tissue Kit; Qiagen
- enzim za razgradnju proteina - proteinaza K (Thermo Fisher Scientific)
- mješavina za PCR - Dream Taq Green PCR Master Mix (2x) (Thermo Fisher Scientific; sadrži DreamTaq DNA polimerazu, DreamTaq Green pufer, dNTP-ove te $MgCl_2$) i HotStarTaq® plus Master Mix, 3x (Qiagen; sadrži HotStarTaq Plus DNA polimerazu, pufer za PCR QIAGEN te dNTP-ove)
- boja CoralLoad concentrate, 10x (Qiagen)
- DNA standard (O'GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder, Fermentas, 0,1 μg/μl)

Puferske otopine

- pufer za razdvajanje nukleinskih kiselina (TAE, Tris-Acetate-EDTA)
- pufer za liziranje stanica (ATL Buffer)
- pufer za pročišćavanje DNA (AL Buffer)
- puferi za ispiranje (AW1Buffer i AW2 Buffer)
- pufer za eluciju (AE Buffer)

Laboratorijska oprema

- tubice za mikrocentrifugu - DNeasy Mini Spin columns (Qiagen)
- mikrocentrifuga (Mini Spin Plus, Eppendorf)
- miješalica (Vortex Mixer Sat, Stuart)
- vodena kupelj (Shel Lab)
- dodatna oprema za elektroforezu - kalup za izlijevanje gela, češalj

- uređaj za PCR (Mastercycler Personal i Taq Plus Mastercycler nexus GX2, Eppendorf)
- uređaj za vodoravnu elektroforezu u agaroznom gelu (Bio Rad)
- UV transluminator (Bio Rad)
- fotoaparat Camedia C-4000 Zoom

3.4. Izolacija DNA

Za izolaciju DNA korišteni su dijelovi prsne peraje veličine do 1 cm, čuvane u 99%-tnu alkoholu. Za izolaciju ukupne genomske DNA korišten je standardni ekstrakcijski pribor (DNeasy® Blood & Tissue Kit; Qiagen), a postupak je pratio upute proizvođača. Metoda izolacije ukupnog genomskog DNA temelji se na optimalnom vezivanju DNA na membranu tubice za mikrocentrifugu uz pomoć prilagođenih pufera. Nakon toga slijedi centrifugiranje tijekom kojeg se centrifugirani DNA selektivno veže na membranu tubice za mikrocentrifugu, dok sve ostale nečistoće prolaze kroz membranu. Tako se lizat nakuplja, a kontaminati se ispiru u dva navrata te se DNA naposljetku otapa u elucijskom puferu.

Za izvođenje ove metode komadići se peraje prvo prebace u Eppendorf tubicu u koju se potom dodaje 180 µl pufera za liziranje stanica i 20 µl enzima za razgradnju proteina, uz dobro miješanje u miješalici. Uzorci se liziraju preko noći u vodenoj kupelji na 56°C. Nakon inkubacije dobro promiješanom uzorku dodaje se 200 µl pufera za pročišćavanje DNA, nakon čega slijedi inkubacija od 10 min na 56°C. Nakon toga dodaje se 200 µl etanola uz ponovno miješanje. Cijeli se sadržaj pipetira na tubice za mikrocentrifugu koje se nalaze unutar kolekcijskih tubica od 2 ml. Prva se centrifuga odvija jednu minutu na 8 000 okretaja u minuti, rpm (eng. rounds per minute). Nakon centrifuge se tubica za mikrocentrifugu prebaci u novu kolekcijsku tubu. Ispiranje se započinje dodatkom 500 µl prvog pufera za pročišćavanje, prethodno razrijeđenog s etanolom, nakon čega se centrifugiranje odvija tijekom jedne minute na 8 000 rpm. Nakon centrifuge dodaje se nova kolekcijska tuba, gdje slijedi novo ispiranje s 500 µl drugog pufera za pročišćavanje (također razrijeđenog u etanolu), nakon čega slijedi treća centrifuga od 3 min na 14 000 rpm. Nakon centrifuge se sadržaj iz tubica za mikrocentrifugu prebacuje u Eppendorf tubice te se dodaje 150 µl elucijskog pufera, nakon čega slijedi inkubacija od 5 min na sobnoj temperaturi. Sadržaj se ponovo iscentrifugira 1 min na 8 000 rpm. Sadržaj izoliranog DNA čuva se na -20°C.

3.5. Umnažanje fragmenata DNA lančanom reakcijom polimeraze (PCR)

Lančanom reakcijom polimeraze (eng. polymerase chain reaction; PCR) omogućava se sinteza velikog broja kopija DNA sekvence od interesa na temelju hibridizacije specifičnih oligonukleotida s početka sekvence, tzv. početnica. Ovom su metodom umnoženi fragmenti DNA mitohondrijskog gena za citokrom *b* (*cyt b*) te jezgrinih gena za rodopsin (*rhod*), gena za aktivaciju rekombinacije (*rag1*) i prvog introna gena za ribosomalni protein S7 (S7). Svi navedeni geni su se do sada pokazali informativnima u filogenetičkim istraživanjima. Citokrom *b* je mitohondrijski protein koji ima važnu ulogu u prijenosu elektrona u respiracijskom lancu. Rodopsin je vidni pigment koji se nalazi u mrežnici oka, a odgovoran je za pretvaranje svjetlosti u električni signal. Gen za aktivaciju rekombinacije (*rag1*) nosi uputu za izgradnju proteinskog RAG kompleksa pomoću kojeg se povećava proteinska varijabilnost unutar limfocita omogućavajući pritom uspješniju imunološku reakciju organizma. Gen za ribosomalni protein S7 se sastoji od nekoliko egzona i introna, a u svojim intronima sadrži kodirajuće regije za neke manje nukleolarne molekule RNA. Ukupan volumen reakcijske smjese za PCR iznosio je 25 µl, a sastojao se od 12,5 µl mješavine za PCR, 1 µl uzvodnih i nizvodnih početnica koncentracije 10 pmol/µl, 4 µl DNA te 6,5 µl vode oslobođene od nukleaza.

Setovi početnica koji su korišteni za amplifikaciju genskih regija i njihov oligonukleotidni sastav navedeni su u Tablici 5. Sve su početnice sintetizirane u VBC Genomics Bioscience Research GmbH, Beč, Austrija.

Svaka je PCR reakcija započeta preddentauracijom na visokoj temperaturi, nakon čega slijedi veći broj ciklusa sastavljenih od tri karakteristična koraka - denaturacije kalupa DNA, sparivanja početnica i DNA kalupa te sinteza novih DNA fragmenata. Umnažanje se fragmenata DNA razlikovalo u temperaturi i dužini trajanja pojedinih koraka, ovisno o istraživanoj regiji, kako je navedeno u Tablici 5. Reakcija se odvijala u uređaju za PCR, a uvjeti za reakcije prilagođeni su po dosadašnjem iskustvu.

Tablica 5. Opis početnica i uvjeta u PCR reakciji za svaki gen zasebno te dužina PCR produkta

Gen	**Početnice (izvor)**	**PCR uvjeti**	**Dužina gena (bp)**
cyt b	GluF: 5'AACCACCGTTGTATTCAACTACAA3' ThrR: 5'ACCTCCGATCTTCGGATTACAAGACCG3' (Machordom i Doadrio, 2001.)	Preddenaturacija (94°C / 5 min) 35 ciklusa: - denaturacija (94°C / 1 min) - sparivanja (50°C / 1,15 min) - ekstenzija (72°C / 1,30 min) Završna sinteza (72°C / 10 min)	1140
rhod	Rh193F 5'CNTATGAATAYCCTCAGTACTACC3' Rh1073R 5'CCRCAGCACARCGTGGTGATCATG3' (Chen i sur., 2003.)	Preddenaturacija (95°C / 10 min) 35 ciklusa: - denaturacija (92°C / 1 min) - sparivanja (50°C / 1 min) - ekstenzija (72°C / 1,5 min) Završna sinteza (72°C / 7 min)	810
rag1	RAG3F 5'GGGTGTGTCAGYGAGAAGCA3' (Buj i sur., 2017.) RAG9R 5' GTGTAGAGCCAGTGRTGYTT3' (Perea i sur., 2010.)	„Touchdown PCR“ Preddenaturacija (95°C/ 10 min) 5 ciklusa: - denaturacija (94°C/ 40 s), - sparivanja (60 °C/ 1 min), - ekstenzija (72°C/ 2 min); 35 ciklusa: - denaturacija (95°C/ 40 s), - sparivanja (60°C/ 1 min), - ekstenzija (72°C/ 2 min). Završna sinteza (72°C/ 10 min)	1443
intron gena za S7	S7RPEX1F 5'TGGCCTCTTCCTTGGCCGTC3' S7RPEX2R 5'AACTCGTCTGGCTTTTCGCC3' (Chow i Hazama, 1998.)	Preddenaturacija (95°C / 5 min) 40 ciklusa: - denaturacija (94°C / 1 min), - sparivanja (54°C / 1,30 min) te - ekstenzija (72°C / 2 min). Završna sinteza (72°C / 10 min)	911 s prazni-nama

3.6. Elektroforetsko odjeljivanje umnoženih fragmenata DNA

Metodom gel-elektroforeze razdvajaju se molekule po veličini i naboju, gdje radi lakšeg prolaženja kroz pore agaroznog matriksa brže putuju kraće molekule. Provjera produkata PCR reakcije napravljena je na 1%-tnom agaroznom gelu na volumenu od 4 µl. Za izradu agaroznog gela otapa se 1%-tna gel agaroza u 100 ml pufera za razdvajanje nukleinskih kiselina (TAE pufer). Ukoliko mješavina za PCR nije sadržavala boju za nanošenje, dodatno se dodavala u reakcijsku smjesu. Za određivanje veličine DNA fragmenata korišten je DNA standard (O'GeneRuler^{TM} 50 bp DNA ladder 0,1 µg/µl, Fermentas). Elektroforeza je provedena u TAE puferu na 120 V/cm u trajanju od 30 min. Nakon elektroforeze gel se uranja u vodenu otopinu etidij-bromida (10-15 min) koji ulazi u hidrofobnu unutrašnjost DNA interkalirajući se između dušičnih baza. Cijeli je proces vizualiziran pod UV svjetlom valne duljine 312 nm na UV transluminatoru (Bio Rad) i fotografiran pomoću fotoaparata Camedia C-4000 Zoom.

3.7. Određivanje primarne strukture DNA (sekvenciranje)

Produkti PCR reakcije koji su se nakon elektroforeze uspješno vizualizirali na agaroznom gelu, poslani su na sekvenciranje u servis za sekvenciranje Macrogen Europe (Meibergdreef 39 1105AZ, Amsterdam, Nizozemska, http://www.macrogen.com). Fragmenti DNA čitali su se dvosmjerno uz pomoć uzvodnih i nizvodnih početnica, koje su se također nalazile u produktima PCR reakcije. Razrijeđene su početnice, u koncentraciji od 10 pmol/µl, zajedno s PCR produktima poslane u Macrogen servis.

Dobiveni kromatogrami očitavani su u oba smjera. Eksperimentalno dobivenim sekvencama uklonjeni su loše očitani počeci i krajevi varijabilnih duljina, kako bismo dobili sekvence iste dužine. Sekvence s nejasnim kromatogramima, gdje se nije mogao donijeti zaključak o redoslijedu baza, izbačene su iz analize.

3.8. Računalne analize

Za pripremu sekvenca za filogenetička istraživanja korišteni su sljedeći računalni programi i programski paketi:

- **BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2.5** (Hall, 1999.) – za obradu i višestruko sravnjivanje sekvenca te analizu nukleotidnih mjesta

- **PHASE 2.1.** (Stephens i sur., 2001., Stephens i Scheet, 2005.) – za rekonstrukciju faza s ciljem utvrđivanja najvjerojatnijih jezgrinih haplotipova kod heterozigota. Metoda rekonstrukcije faza podrazumijeva nepoznate haplotipove kao neprimijećene slučajne vrijednosti čija se kondicionalna distribucija procjenjuje s obzirom na poznate podatke o genotipu uz pomoć algoritma Gibbsovog uzorkovanja.

Za filogenetičku rekonstrukciju i određivanje genske raznolikosti korišteni su sljedeći programi:

- **PAUP*** beta 4.0 (Swofford, 2002.) – za izradu filogenetičkog stabla metodom najveće parsimonije
- **MrBayes 3.2.6.** (Ronquist i sur., 2012.) – za izradu filogenetičkih stabala pomoću Bayesove metode
- **FigTree 1.4.3.** i **Adobe Photoshop 7.0** – za uređivanje filogenetičkih stabala
- **TCS 1.21** (Clement i sur., 2000.) – za kreiranje filogenetičkih mreža metodom statističke parsimonije
- **Network 5.0.0.3.** (Fluxus Technology Ltd.) – za izradu filogenetičkih mreža metodom udruživanja medijanskih vektora
- **BEAST 1.8.4**. (Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees) (Drummond i sur., 2012.) – programski paket za određivanje vremena divergencije.

Za analizu genske raznolikosti korišteni su sljedeći računalni programi:

- **DnaSP 5.10** (Librado i Rozas, 2009.) – za određivanje haplotipova, izračun genskih polimorfizama, genske diferencijacije, protoka gena i provedbu testova neutralnosti i rekombinacije
- **MEGA7** (Molecular Evolutionary Genetics Analysis; Kumar i sur., 2016.) – za određivanje genske udaljenosti među jedinkama, određivanje evolucijskog modela i ML metodu
- **SITES** (Hey i Wakeley, 1997.) – za utvrđivanje nukleotidnih mjesta koja predstavljaju dijagnostička mjesta među vrstama, fiksne razlike i dijeljene polimorfizme.

Dodatne sekvence za filogenetičku rekonstrukciju preuzete su s NCBI (National Center for Biotechnology Information) genske baze podataka (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/).

3.9. Filogenetičke analize

Priprema DNA sekvenca za filogenetičke analize

Sekvence istraživanih jedinki i preuzete sekvence iz banke gena višestruko su sravnjene uz pomoć Clustal W heurističkog algoritma (Thompson i sur., 1994.), implementiranog u računalnom programu BioEdit, kako bi se homologni dijelovi sekvenca poredali u iste kolone. Višestruko sravnjivanje sekvenca podrazumijeva traženje maksimalne podudarnosti u redoslijedu nukleotida između više sekvenca, uz pomoć funkcije bodovanja po principu zbroja parova. Koristeći neutralni model (Kimura, 1983.), algoritam konstruira matricu udaljenosti svih N(N-1)/2 parova putem dinamičkog programiranog sravnjivanja, nakon čega se ocjena sličnosti konvertira u evolucijske udaljenosti (Thompson i sur., 1994.). Kako bi se povećala točnost izvedbe metodom susjednog združivanja (eng. neighbour-joining; NJ; Saitou i Nei, 1987.), konstruirano je pokazno stablo (Zhao, 2011.). Algoritam započinje od potpuno nerazriješenog stabla u obliku zvjezdaste mreže, a sastoji se od opetovanih računanja matrica udaljenosti između različitih parova, sve dok se taksoni ne grupiraju u razriješeno stablo (Saitou i Nei, 1987.).

Razlike koje su se pojavile prilikom višestrukog sravnjivanja, posljedica su mutacija u vidu supstitucija koje su se pojavljivale tijekom evolucije. Sve su te razlike dodatno provjerene na kromatogramu za svaku pojedinu sekvencu te su uvažene, izbrisane ili zamijenjene ovisno o jačini signala u slučaju preklapanja dviju baza ili krivog očitanja signala (nema vidljivog signala ili je očitana baza s nižim signalom na istoj poziciji).

Varijante haplotipova jezgrinih gena u heterozigotnih jedinki rekonstruirane su uz pomoć Bayesove statističke metode u računalnom programu PHASE 2.1. Analize jezgrinih biljega provedene su u pet navrata s različitim početnim vrijednostima pseudonasumičnog generatora slučajnih brojeva, uz „burn-in“ period od 100 na 1 000 iteracija. Uzete su u obzir sve sekvence koje su kontinuirano pokazivale veću vjerojatnost.

Prije filogenetičke analize bilo je potrebno utvrditi neutralnost primijećenih mutacija i pojavu rekombinacije kod jezgrinih gena, koje su mogle imati utjecaja na filogenetičku rekonstrukciju. Za oba testa korišten je računalni program DnaSP v5 (Librado i Rozas, 2009.).

Filogenetičkom rekonstrukcijom obuhvaćena su četiri skupa podataka. Za sva četiri istraživana biljega preuzete su dodatne poznate sekvence iz nukleotidne tražilice NCBI baze podataka, u svrhu boljeg razumijevanja filogenetičkih odnosa klenova iz rijeka jadranskog slijeva u odnosu na ostatke poznatih jedinki iz Europe.

Prvi je skup podataka sadržavao 133 sekvence *cyt b* gena istraživanih jedinki (127 iz jadranskog i 6 iz crnomorskog slijeva) i 28 preuzetih NCBI sekvenca. Za vanjsku grupu korištena je *Petroleuciscus smyrnaeus* Boulenger, 1896, za koju je prethodno dokazano da je sestrinska vrsta vrstama roda *Squalius*. Sekvence iz prvog skupa podataka prikazane su u Tablici 6. Istraživane sekvence označene su kodnim imenima. Kodno ime sekvence oznaka je pod kojom je sekvenca analizirana u ovom istraživanju i označena na filogenetičkim stablima. Ime haplotipa dodijeljeno je prema prva tri slova latinskog imena vrste, osim vrsta iz Istre, Trebišnjice, Ljute i Visovca, gdje se očekivao moguć veći broj filogenetičkih linija, za koje je kodno ime sadržavalo prva tri slova lokaliteta i redni broj. Za preuzete sekvence kodno se ime sastoji od imena vrste i rednog broja ukoliko je bilo više jedinki.

Drugi skup podataka obuhvaćao je sve dobivene haplotipove iz sekvenca jezgrinog gena za rodopsin (128 sekvenca iz jadranskog slijeva i 12 crnomorskih sekvenca) od istraživanih 70 jedinki uz preuzete odgovarajuće sekvence iz NCBI banke gena. Kodna imena istraživanih sekvenca dodijeljena su na isti način kao i kod *cyt b* gena, uz dodatak malog slova r ispred kodnog imena za razlikovanje sekvenca gena za rodopsin od ostalih. Za filogenetička istraživanja preuzeto je 29 poznatih sekvenca gena za rodopsin uz vanjske skupine *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758. i *Rutilus rutilus* Linnaeus, 1758. *Cyprinus carpio* pripada istoj porodici, ali različitoj potporodici, dok je *R. rutilus* u istoj porodici i potporodici (Tablica 7).

Treći skup podataka sastojao se od istraživanih sekvenca jezgrinog gena za aktivaciju rekombinacije – *rag1* i poznatih sekvenca preuzetih iz banke gena. Kodno ime sekvence, osim imena vrste ili lokaliteta kojoj haplotip pripada i rednog broja, sadrži i oznaku za *rag1* gen (R). Za analizu jezgrinog *rag1* gena korišteno je 120 sekvenca, od kojih 116 pripada jadranskome slijevu (58 jedinki), dok četiri pripadaju dvjema jedinkama crnomorskog slijeva (Drava). Istraživane jedinke s odgovarajućim haplotipovima, uz 18 dodatnih sekvenca iz banke gena i jednu vanjsku skupinu (*C. carpio),* prikazane su u Tablici 8.

Četvrti je skup podataka sadržavao sekvence prvog introna jezgrinog gena za ribosomalni protein S7 istraživanih vrsta, predstavljenih s nekoliko haplotipova po lokalitetu i poznatih preuzetih sekvenca iz banke gena, uz vrstu *P. smyrnaeus* kao vanjsku skupinu (Tablica 9). Kodno ime sekvence sadrži ime vrste ili lokaliteta kojoj haplotip pripada i redni broj uz oznaku za S7 (S). Za analizu introna gena za S7 korišteno je 26 dobivenih sekvenca i 21 preuzeta sekvenca, uz jednu vanjsku skupinu (*P. smyrnaeus*).

Tablica 6. Sekvence *cyt b* gena korištene u filogenetičkim analizama (prvi skup podataka)
Zvjezdicom su obilježene sekvence dobivene u ovom istraživanju. Značenje kratica: HR - Hrvatska; BiH - Bosna i Hercegovina; ESP - Španjolska; POR - Portugal; ITA - Italija; GER - Njemačka; RUS - Rusija; FRA - Francuska; TUR - Turska

Vrsta	**Rijeka/ jezero (država)**	**Br. sekv.**	**Pristupni br. u banci gena**	**Literatura**	**Kodno ime**
S. svallize	Neretva (HR)	13	*		SVA1, SVA2
	Ravno polje (BiH)	3	*		SVA1
	Hutovo blato (BiH)	4	*		SVA1, SVA3–SVA5
	Trebišnjica (BiH)	2	*		SVA1
S. zrmanjae	Zrmanja (HR)	2	*		ZRM1
	Ričica (HR)	2	*		ZRM1
	Krka (HR)	1	*		ZRM2
S. illyricus	Cetina (HR)	8	*		ILI1, ILI2, ILI5, ILI6
	Visovac, Krka (HR)	4	*		ILI1, ILI3, ILI4
	Krka (HR)	7	*		ILI3, ILI4
	Zrmanja (HR)	2	*		ILI1
	Boljunšćica (HR)	3	*		ILI1
S. microlepis	Prološko blato (HR)	2	*		MIC1, MIC2
	Vrljika (HR)	2	*		MIC1, MIC3
S. tenellus	Ruda (HR)	1	*		TEN1
S. sp.	Trebišnjica (BiH)	4	*		TRE1, TRE2
	Ravno polje (BiH)	1	*		TRE2
S. squalus	Mirna (HR)	6	*		IST1, IST5
	Dragonja (HR)	5	*		IST1, IST2
	Pazinčica (HR)	8	*		IST1
	Boljunšćica (HR)	5	*		IST3, IST4
	Borutski potok (HR)	9	*		IST1
	Raša (HR)	3	*		VIS1, IST1, IST4
	Visovac, Krka (HR)	5	*		VIS1–VIS3
	Ljuta (HR)	17	*		LJUT1–LJUT3
	Trebišnjica (BiH)	4	*		LJUT1, TRE3
	Ravno polje (BiH)	4	*		LJUT1

Tablica 6. - nastavak

S. torgalensis	Mira (ESP)	1	DQ521438	Doadrio i sur., 2007b.	*S. torgalensis*1
	Mira (POR)	1	HM560210	Perea i sur., 2010.	*S. torgalensis*2
S. aradensis	Algibre (POR)	2	HM560179–80	Perea i sur., 2010.	*S. aradensis*1, 2
S. pyrenaicus	Jarama (ESP)	2	JQ436540, JQ436544	Almodóvar i sur., 2012.	*S. pyrenaicus*1, 2
S. lucumonis	Reno, Tiber (ITA)	2	EU856048, EU856077	Marescalchi i sur., neobjavljeni podaci	*S. lucumonis*1, 2
	Arno (ITA)	1	HM560189	Perea i sur., 2010.	*S. lucumonis*3
S. albus	Trasimeno (ITA)	1	AY549460	Freyhof i sur., 2005.	*S. albus*
S. prespensis	Prespansko jezero (GRE)	1	HM560197	Perea i sur., 2010.	*S. prespensis*
S. peloponensis	Alphios, Thiamis (GRE)	2	AF090756–57	Zardoya i Doadrio, 1999.	*S. peloponensis*1, 2
S. vardarensis	Sperchios (GRE)	1	AF090754	Zardoya i Doadrio, 1999.	*S. vardarensis*
S. laietanus	Matarrana (ESP)	2	HM560187–88	Perea i sur., 2010.	*S. laietanus*1, 2
S. orientalis	Rubas (RUS)	1	AF095609	Zardoya i Doadrio, 1999.	*S. orientalis*
S. lepidus	Beyshir, Aksehir (TUR)	2	AJ252811–12	Durand i sur., 2000.	*S. lepidus*1, 2
S. aphipsi	Aphips (RUS)	2	HM560177–78	Perea i sur., 2010.	*S. aphips*i1, 2
S. cephalus	Drava (HR)	6	*		CEP1–CEP4
	Reno (ITA)	1	EU856046	Marescalchi i sur., neobjavljeni podaci	*S. cephalus*1
	Herault (FRA)	1	AY509826	Ketmaier i sur., 2004.	*S. cephalus*2
	Odra (GER)	1	AY549461	Freyhof i sur., 2005.	*S. cephalus*3
	Maturrana (ESP)	1	AF421801	Sanjur i sur., 2003.	*S. cephalus*4
	Cinca (ESP)	1	AF421803	Sanjur i sur., 2003.	*S. cephalus*5
S. keadicus	Miras (GRE)	1	HM560186	Perea i sur., 2010.	*S. keadicus*1
	Evrotas (GRE)	1	AJ252820	Durand i sur., 2000.	*S. keadicus*2
VANJSKA SKUPINA					
Petroleuciscus smyrnaeus	jezero Golcuk (TUR)	1	HM560114	Perea i sur., 2010.	*Petroleuciscus smyrnaeus*

Tablica 7. Prikaz drugog skupa podataka sekvenca gena za rodopsin korištenih u filogenetičkim analizama
Prikazane su istraživane vrste i poznate vrste roda *Squalius* preuzete iz NCBI banke podataka te vanjske skupine. Zvjezdicom su obilježene sekvence dobivene u ovom istraživanju.
Značenje kratica: HR - Hrvatska; BiH - Bosna i Hercegovina; POR - Portugal; ESP - Španjolska; BUG - Bugarska; FRA - Francuska; TUR - Turska; GRU - Gruzija; CAN-Kanada

Vrsta	**Rijeka/ jezero**	**Br. sekv.**	**Pristupni br. u banci gena**	**Literatura**	**Kodno ime**
S. svallize	Neretva (HR)	18	*		rSVA1, rSVA2
	Ljuta (HR)	28	*		rSVA1–rSVA3
	Ravno polje (BiH)	6	*		rSVA1, rSVA2
	Trebišnjica (BiH)	1	*		rSVA2
S. zrmanjae	Krka (HR)	1	*		rZRM1
	Zrmanja (HR)	4	*		rZRM2
S. illyricus	Krka (HR)	10	*		rILI1
	Prološko blato (HR)	1	*		rILI1
S. microlepis	Vrljika (HR)	2	*		rMIC1
	Prološko blato (HR)	1	*		rMIC1
	Ruda (HR)	4	*		rMIC1
S. squalus	Dragonja (HR)	6	*		rSQU1–rSQU4, rDRA1, rDRA2
	Pazinčica (HR)	10	*		rSQU2, rSQU4
	Borutski potok (HR)	6	*		rSQU2, rSQU4
	Mirna (HR)	2	*		rSQU2
	Krka (HR)	1	*		rSQU4
	Trebišnjica (BiH)	19	*		rSQU4
	Ravno polje (BiH)	8	*		rSQU4
S. aradensis	Arade (POR)	1	JN413369	Waap i sur., 2011.	*S. aradensis*1
	Seixe (POR)	1	JN413368	Waap i sur., 2011.	*S. aradensis*2
S. torgalensis	Torgal, Mira (POR)	2	JN413366–67	Waap i sur., 2011.	*S. torgalensis*1, 2
S. laietanus	Ebro (ESP)	2	KC355070–71	Denys i sur., 2013.	*S. laietanus*1, 2

Tablica 7. - nastavak

S. pyrenaicus	Serta, Tejo (POR)	1	JN413358	Waap i sur., 2011.	*S. pyrenaicus*1
	Sado (POR)	1	JN413361	Waap i sur., 2011.	*S. pyrenaicus*2
	Caia (POR)	1	JN413364	Waap i sur., 2011.	*S. pyrenaicus*3
S. carolitertii	Douro (POR)	2	JN413352–53	Waap i sur., 2011.	*S. carolitertii*1, 2
S. cephalus	Drava (HR)	12	*		
	Fakijska (BUG)	1	KU722834	Behrens-Chapuis i sur., 2015.	*S. cephalus*1
	Goljamata (BUG)	1	KU722835	Behrens-Chapuis i sur., 2015.	*S. cephalus*2
	Agly, Torreille (FRA)	1	KC355069	Denys i sur., 2013.	*S. cephalus*3
S. pursakensis	Sakarya (TUR)	1	KU722837	Behrens-Chapuis i sur., 2015.	*S. pursakensis*
S. orientalis	Natanebi (GRU)	1	KU722836	Behrens-Chapuis i sur., 2015.	*S. orientalis*
VANJSKE SKUPINE					
Rutilus rutilus	Adour (FRA)	1	KC355034	Denys i sur., 2013.	*Rutilus rutilus*
Cyprinus carpio	Lac, Saint-Paul, Quebeck (CAN)	1	KX145703	Schoelinck i sur., 2016.	*Cyprinus carpio*

Tablica 8. Treći skup podataka sekvenca jezgrinog gena za aktivaciju rekombinacije (*rag1*) korištenih u filogenetičkim istraživanjima
U tablici se, osim istraživanih vrsta, nalaze i poznate *rag1* sekvence vrsta roda *Squalius* preuzete iz NCBI banke gena te sekvence vanjske skupine. Zvjezdicom su obilježene sekvence dobivene u ovom istraživanju. Značenje kratica: HR - Hrvatska; BiH - Bosna i Hercegovina; SLO - Slovenija; GRE - Grčka; ESP - Španjolska; POR - Portugal; RUS - Rusija

Vrsta	**Rijeka/ jezero**	**Br. sekv.**	**Pristupni broj u banci gena**	**Literatura**	**Kodno ime**
S. svallize	Neretva (HR)	17	*		RSVA1, RSVA2
	Ljuta (HR)	26	*		RSVA1
	Trebišnjica (BiH)	5	*		RSVA3, RSVA4
	Ravno polje (BiH)	6	*		RSVA1
	Neretva, jezero Rama (BiH)	1	HM560458	Perea i sur., 2010.	*S. svallize*
S. zrmanjae	Zrmanja (HR)	1	*		RZRM1
S. illyricus	Prološko blato (HR)	1	*		RILI1
	Krka (HR)	14	*		RILI1
	Vrljika (HR)	2	*		RILI1
	Cetina (HR)	1	HM560447	Perea i sur., 2010.	*S. illyricus*
S. microlepis	Prološko blato (HR)	1	*		RMIC1
	Neretva, jezero Krenica (BiH)	1	HM560450	Perea i sur., 2010.	*S. microlepis*
S. tenellus	Ruda (HR)	2	*		RTEN1
S. squalus	Dragonja (HR)	6	*		RSQU7, RSQU10
	Mirna (HR)	2	*		RSQU7
	Pazinčica (HR)	6	*		RSQU7–RSQU9
	Borutski potok (HR)	6	*		RSQU7
	Trebišnjica (BiH)	11	*		RSQU1–RSQU5
	Ravno polje (BiH)	6	*		RSQU1, RSQU6
	Drava (HR)	2	*		RSQU7, RCEP3
	Vipava, slijev Soče (SLO)	1	HM560456	Perea i sur., 2010.	*S. squalus*
S. cephalus	Drava (HR)	2	*		RCEP1, RCEP2
Nerazriješeni haplotipovi	Zrmanja (HR)	1	*		RZRM2
	Neretva (HR)	1	*		RMET1

Tablica 8. - nastavak

S. peloponensis	Alfios (GRE)	2	KY070501–02	Perea i sur., 2016.	*S. peloponensis*1, 2
S. pyrenaicus	Guadalete (ESP)	1	HM560579	Perea i sur., 2010.	*S. pyrenaicus*
S. malacitanus	Guadiaro (ESP)	1	HM560449	Perea i sur., 2010.	*S. malacitanus*
S. valentinus	Magro, slijev Júcar (ESP)	1	HM560461	Perea i sur., 2010.	*S. valentinus*
S. castellanus	Gallo, slijev Tagus (ESP)	1	HM560448	Perea i sur., 2010.	*S. castellanus*
S. torgalensis	Mira (POR)	1	HM560460	Perea i sur., 2010.	*S. torgalensis*
S. orientalis	Uluchaj (RUS)	2	HM560451–52	Perea i sur., 2010.	*S. orientalis*1, 2
S. carolitertii	Limia (ESP)	1	HM560446	Perea i sur., 2010.	*S. carolitertii*
S. aphipsi	Aphips (RUS)	1	HM560445	Perea i sur., 2010.	*S. aphipsi*
VANJSKA SKUPINA					
Cyprinus carpio	nepoznato	1	KY356488	Hirt i sur., 2017.	*Cyprinus carpio*

Tablica 9. Četvrti skup podataka sekvenca introna jezgrinog gena za S7 korištenih u filogenetičkim analizama
U tablici se, osim istraživanih vrsta, nalaze i poznate sekvence vrsta roda *Squalius* preuzete iz NCBI banke podataka te sekvence vanjske skupine. Zvjezdicom su obilježene sekvence dobivene u ovom istraživanju. Značenje kratica: BiH - Bosna i Hercegovina; HR - Hrvatska; SLO - Slovenija; GRE - Grčka; POR - Portugal; ESP - Španjolska; RUS - Rusija; TUR - Turska

Vrsta	**Rijeka/ jezero**	**Br. sekv.**	**Pristupni broj u banci gena**	**Literatura**	**Kodno ime**
S. svallize	Visovac, Krka (HR)	2	*		SSVA1
	Ljuta (HR)	8	*		SSVA1
	Ravno polje (BiH)	2	*		SSVA2
	Jezero Rama, Neretva (BiH)	1	HM560538	Perea i sur., 2010.	*S. svallize*
S. zrmanjae	Zrmanja (HR)	2	*		SZRM1
S. illyricus	Krka (HR)	2	*		SILI3
	Vinalić, Cetina (HR)	2	*		SILI1, SILI2
	Cetina (HR)	1	HM560530	Perea i sur., 2010.	*S. illyricus*
S. microlepis	Jezero Krenica, Neretva (BiH)	1	HM560532	Perea i sur., 2010.	*S. microlepis*
S. squalus	Neretva (HR)	2	*		SSQU1, SSQU2
	Ravno polje (BiH)	4	*		SSQU1–SSQU3
	Vipava, slijev Soče (SLO)	1	HM560537	Perea i sur., 2010.	*S. squalus*
Nerazriješeni haplotip	Neretva (HR)	2	*		SMET1
S. peloponensis	Miras (GRE)	2	KY070507–08	Perea i sur., 2016.	*S. peloponensis*1, 2
S. keadicus	Evrotas (GRE)	2	HM560572, KY070503	Perea i sur., 2010., Perea i sur., 2016.	*S. keadicus*1, 2
S. pamvoticus	Arachthos (GRE)	2	KY070513–14	Perea i sur., 2016.	*S. pamvoticus*1, 2
S. pyrenaicus	Samarra (POR)	1	KJ138619	Sousa-Santos i sur., 2014.	*S. pyrenaicus*1
	Guadalete (ESP)	1	HM560568	Perea i sur., 2010.	*S. pyrenaicus*2
S. castellanus	Gallo (ESP)	1	HM560565	Perea i sur., 2010.	*S. castellanus*
S. prespensis	Prespansko jezero (GRE)	1	HM560564	Perea i sur., 2010.	*S. prespensis*
S. valentinus	Magro (ESP)	1	HM560541	Perea i sur., 2010.	*S. valentinus*
S. torgalensis	Mira (POR)	1	HM560540	Perea i sur., 2010.	*S. torgalensis*
S. orientalis	Uluchaj (RUS)	2	HM560533–34	Perea i sur., 2010.	*S. orientalis*1, 2

Tablica 9. - nastavak

S. malacitanus	Guadiaro (ESP)	1	HM560531	Perea i sur., 2010.	*S. malacitanus*
S. carolitertii	Limia (ESP)	1	HM560529	Perea i sur., 2010.	*S. carolitertii*
S. aphipsi	Aphips (RUS)	1	HM560528	Perea i sur., 2010.	*S. aphipsi*
VANJSKA SKUPINA					
Petroleuciscus smyrnaeus	Jezero Golcuk (TUR)	1	HM560501	Perea i sur., 2010.	*Petroleuciscus smyrnaeus*

Ispitivanje neutralnosti mutacija i pojave rekombinacije

Za provođenje filogenetičke rekonstrukcije i testova genske raznolikosti potrebno je utvrditi neutralnost istraživanih mutacija. Naime, osim mutacija i nasumičnog drifta, na pojavu polimorfizma u populaciji utječe i selekcija koja može utjecati na krivu filogenetičku rekonstrukciju, pa i na krivu procjenu molekularnog sata. Zbog stalne težnje očuvanja rijetkih alela od izumiranja, u ravnotežnoj su selekciji moguća kreiranja neobičnih stabala s nejasnim granicama između vrsta, unatoč preciznoj rekonstrukciji stabla (Edwards, 2009.). Kako bi se dokazalo da je evolucija istraživanih vrsta nasumičan proces, provelo se više testova neutralnosti zato što različiti evolucijski procesi mogu proizvesti slične genealogije, što remeti interpretaciju testova. S ciljem otkrivanja eventualnih odstupanja od ravnotežnog stanja svakog biljega, provedeni su Tajimin D (Tajima, 1989.) i Fu i Liov test (Fu i Li, 1993.) uz pomoć računalnog programa DnaSP 5.10. (Librado i Rozas, 2009.). Korišteni testovi predstavljaju snažne statističke testove za pretpostavku o neutralnosti mutacija i detekciju selekcije po principu standardnog neutralnog temeljnog načela populacijske genetike, Wright-Fisher modela (Fisher, 1930., Wright, 1931.). Model pretpostavlja panmiktične diploidne populacije konstantne veličine jednakog omjera spolova s nezavisnim i selektivno neutralnim mutacijama koje se po prvi put pojavljuju na uočenom mjestu, bez rekombinacija unutar lokusa. Model se dodatno proširuje u programu DnaSP, gdje se pretpostavlja nepovezanost lokusa, stacionarnost vrsta prilikom uzorkovanja te porijeklo od zajedničkog pretka (Hudson i sur., 1987.). Tajimin test je test populacijske genetike čija je svrha razlikovanje nasumično evoluirajućih sekvenca od onih koje evoluiraju uslijed selekcije, demografskog širenja, kontrakcije populacije ili introgresije. Tajimina D vrijednost izračunata je kao razlika prosječnog broja nukleotidnih razlika između parova sekvenca - k (Fu i Li, 1993.) i ukupnog broja segregirajućih mjesta - S (Watterson, 1975.). Kod neutralne evolucije očekuje se da su te dvije mjere varijabilnosti jednake. Ukoliko je razlika između tih mjera veća od očekivane po standardnom neutralnom modelu, model se odbacuje (Nielsen, 2005.). Tajimina je D vrijednost negativna kod povećanog broja rijetkih varijanti (singletona) koje se pojavljuju uslijed selekcije ili demografskog širenja populacije nakon nedavnog učinka uskog grla (eng. bottleneck effect). Fu i Liov test ukazuje na gensku selekciju i demografske promjene u populaciji. Test se zasniva na usporedbi singletona (mutacija koje se pojavljuju jednom unutar svih istraživanih sekvenca) s prosječnim brojem nukleotidnih razlika između sekvenca (F* vrijednost) ili s ukupnim brojem nukleotidnih varijanti (D* vrijednost). Ukoliko vrijednosti D* i F* nisu statistički značajne, ne može se odbaciti model neutralnosti. Budući da migracija može utjecati na širenje rijetkih alela koji se onda prikazuju u povećanom broju mutacija, ovi

testovi ne moraju nužno ukazivati na pojavu prirodne selekcije (Fu i Li, 1993.). Uz pomoć kondicionalne distribucije frekvencije haplotipova dodatno su izračunate i vrijednosti Fs (jednadžba 1 u Fua, 1997.) i S-statistike (Strobeck, 1987.) koje pomažu u interpretaciji testova neutralnosti. Negativna Fs vrijednost ukazuje na višak nedavnih mutacija uslijed širenja populacije nakon nedavnog učinka uskog grla, odnosno višak rijetkih alela. Velike negativne Fs vrijednosti uzimaju se za dokaz protiv neutralnosti mutacije (Librado i Rozas, 2009.). Strobeckova S-statistika pokazuje je li vjerojatnost uočavanja haplotipova u uzorku jednaka ili manja od očekivane. Višak haplotipova upućuje na ekspanziju, kao i na višak singletona (Strobeck, 1987.). Sve su vrijednosti izračunate i prema broju segregirajućih mjesta - S i prema ukupnom broju mutacija - η (Simonsen i sur., 1995.) ne uključujući mjesta s prazninama (nepoznati nukleotidi).

Kako bi se utvrdilo postojanje tragova rekombinacije, koja je mogla utjecati na filogenetičku rekonstrukciju i testove genske raznolikosti, proveden je test rekombinacije za sve gene. Izračunat je rekombinacijski parametar između susjednih i udaljenih nukleotidnih mjesta za svaki gen - R (Hudson, 1987.), temeljen na varijanci prosječnog broja nukleotidnih razlika između parova sekvenca. Rekombinacijski je parametar između udaljenih mjesta izračunat prema izrazu R=4Nr, gdje r obilježava rekombinacijsku stopu između najudaljenijih nukleotidnih mjesta. Rekombinacijski parametar između susjednih mjesta izračunat je prema izrazu R= R(po genu)/D, gdje parametar D obilježava prosječnu nukleotidnu udaljenost (u parovima baza, bp) analizirane regije. Osim rekombinacijskog parametra, izračunat je i minimalan broj rekombinacijskih događaja u povijesti uzorka, RM (Hudson i Kaplan, 1985.), po principu test-križanja.

Filogenetička rekonstrukcija

Metoda najveće parsimonije napravljena je u računalnom programu PAUP beta 4.0 (Swofford, 2002.). U potrazi za što kraćom topologijom stabla prilikom MP metode korišten je algoritam raščlanjivanja i ponovnog povezivanja stabla (eng. tree bissection and reconnection; TBR), uz 10 nasumičnih stupnjevitih dodavanja s heurističkom izmjenom grana (eng. branch swapping). Algoritam pretražuje topologije lokalnih preslagivanja najbližih susjednih grana u unutarnjem čvoru, te globalnih preslagivanja stabla prepolovljenih na dva „podstabla“ unutar kojih se događa novo preslagivanje grana. Isječeni se dio stabla iznova ukorjenjuje prije nego što se ponovno poveže sa svakom granom. Konsenzusno je stablo doneseno na temelju pravila 50 %-tne većine. Metoda samopodržanja izvedena je na 1 000 replikanata.

Prije provođenja ML metode ustanovljen je najbolji evolucijski model u odnosu na set uočenih podataka za svaki gen zasebno, uz pomoć Bayesovog i Akaikeovog informacijskog kriterija implementiranih u MEGA7 (Kumar i sur., 2016.) računalnom programu. U istom se računalnom programu provela i filogenetička rekonstrukcija ML metodom za svaki set podataka posebno. Pretraga topologija provedena je TBR algoritmom uz nasumičnu izmjenu grana. Za heurističku pretragu napravljeno je pokazno stablo putem metode susjednog združivanja (NJ). Kako bi se potvrdila snaga ML metode, provedena je metoda samopodržanja na 1 000 replikanata.

Bayesov je zaključak izveden uz pomoć računalnog programa MrBayes (Ronquist i sur., 2012.) simulacijom dviju istovremenih, potpuno nezavisnih analiza Markovljevog lanca (MCMC) na 3 000 000 generacija, svaki put započinjući od različitih nasumično odabranih stabala, kako bi se dobila procjena distribucije posteriornih vjerojatnosti. Svaka je analiza simulirana s četiri MCMC lanca uzorkovana svakih 100 generacija. Za uzorkovanje lanaca i kreiranje posteriorne distribucije iz seta nasumičnih varijabli korišten je nasumični algoritam Gibbsova uzorkovanja zbog vrlo dobre prilagođenosti na uzorkovanje iz posteriornih distribucija Bayesove mreže koja je određena kao skup uvjetovanih distribucija. Od četiriju postavljenih lanaca, MrBayes koristi tri „zagrijana“ lanca i jedan „hladni“ lanac koji izmjenjuje stanje sa svakim „zagrijanim“ lancem mijenjajući svoju poziciju kroz kolone lanaca tijekom simulacije. Konsenzusno stablo iz grupe najboljih analiziranih stabala kreirano je uz pravilo 50%-tne većine i izuzeće prvih 25% generacija (burn-in).

Filogenetičke su mreže kreirane pomoću računalnog programa Network (Fluxus Technology Ltd.) metodom združivanja medijana (median-joining, MJ) (Bandelt i sur., 1999.) i pomoću metode statističke parsimonije implementirane u računalnom programu TCS (Clement i sur., 2000.). Statistička se parsimonija izračunala uz 95%-tnu granicu parsimonijskog povezivanja.

Određivanje vremena divergencije

Precizno procjenjivanje vremena divergencije između vrsta potrebno je za razumijevanje povijesne biogeografije i procjenu raznolikosti te otkrivanje uzroka varijacijskih stopa molekularne evolucije. Metode za procjenu vremena specijacijskih događaja rezultiraju stablima čija je dužina grana proporcionalna s vremenom. Dužine grana na stablu računaju se kao produkti stope supstitucija dobivenih iz molekularnih podataka te dužine grana u vremenskim jedinicama (v=rxt). Za određivanje stopa mutacije potrebna je vanjska informacija dobivena od geoloških (fosilnih ili biogeografskih) podataka (Arbogast i

sur., 2002.). Kako bi se olakšalo donošenje zaključka o vremenu divergencije, uobičajeno se pretpostavlja model evolucije koji podrazumijeva konstantnu supstitucijsku stopu kroz vrijeme i evolucijske linije, tzv. molekularni sat (Zuckerkandl i Pauling, 1962.).

Za određivanje vremena divergencije koristio se programski paket BEAST (Bayesian Evolutionary Analysis by Sampling Trees) (Drummond i sur., 2012.). Primjenom Bayesove koalescentne metode procijenjene su posteriorne vjerojatnosti stabala nastalih iz zajedničke vjerojatnosti stabala, dužina grana i modela nukleotidne evolucije uz uključivanje prvotne vjerojatnosti (Arbogast i sur., 2002.). Za kalibraciju se svakom nekalibriranom čvoru dodjeljuje funkcija prvotne vjerojatnosti stabla koja određuje gustoću prvotne vjerojatnosti za svako moguće stablo.

Određivanje vremena divergencije napravljeno je samo prema mitohondrijskom *cyt b* genu jer za taj gen postoji podatak o brzini mutacijske stope, dok se za druge gene nije mogao utvrditi dovoljan broj zajedničkih pouzdanih točaka na stablu za kalibraciju. Korištena je evolucijska stopa od 0.4% divergencije po liniji na milijun godina, izračunata prema fosilnim ostacima potporodice Leuciscinae, među kojima su i fosilni ostaci roda *Squalius* (Perea i sur., 2010.). Stabla su istraživana po Yuleovom modelu specijacije, jednostavnom modelu po kojem svaka vrsta ima jednaku vjerojatnost za specijaciju u bilo kojem trenutku. Model ne podrazumijeva smrt, a diverzifikaciju prikazuje kao stohastični Markovljev proces s parametrom prosječnog broja specijacijskih događaja koji se odvijaju na evolucijskoj liniji po jedinici vremena (Mooers i sur., 2007.). Za izračun marginalnih vjerojatnosti podataka korišten je MCMC algoritam na 20 000 generacija. Ostali su parametri prvotnih distribucija korišteni kako je zadano programom. Evaluacija logaritamske vjerodostojnosti parametara, konvergencije između analiza i izuzeća prvih 25% generacija (burn-in) učinjena je u računalnom programu Tracer 1.6 (Drummond i Rambaut, 2007.). Nakon utvrđene konvergencije, za sve parametre između analiza rekonstruirano je konsenzusno stablo na temelju 50%-tne većine stabala. Najvjerodostojnije stablo dobiveno je uz pomoć programa TreeAnnotator 1.8.4. implementiranog u BEAST programskom paketu (Drummond i Rambaut, 2007.).

Određivanje genskih polimorfizama i diferencijacije

U svrhu molekularne taksonomije određena su nukleotidna mjesta koja predstavljaju dijagnostička mjesta među vrstama (fiksne razlike), odnosno polimorfna nukleotidna mjesta na kojima se sve sekvence jedne grupe razlikuju od druge grupe u računalnom programu SITES. Isto tako određeni su i dijeljeni polimorfizmi, odnosno polimorfna mjesta na kojima

se u svakoj sekvenci od dviju uspoređivanih grupa mogu naći po dvije istovjetne baze (Hey i Wakeley, 1997.).

Kako bi se dodatno analizirala evolucijska prošlost i populacijska genska struktura, korištene su metode populacijske genetike na razini vrste ili ispod razine vrste. Genski su polimorfizmi analizirani pomoću programskog paketa DnaSP (Librado i Rozas, 2009.) za tri ispitivana gena koja su bila zastupljena s dovoljnim brojem sekvenca za analizu (*cyt b*, *rhod* i *rag1*), a za svaku vrstu i populaciju određene su sljedeće mjere DNA polimorfizma:

- broj haplotipova (h)
- raznolikost haplotipova (Hd)
- broj polimorfnih mjesta (S)
- nukleotidna raznolikost (π) izražena kao srednja vrijednost broja razlika nukleotida
- ukupan broj mutacija (η)
- prosječan broj razlika nukleotida (k).

Uz to su određene i frekvencije haplotipova po pojedinom lokalitetu i vrsti - udio jedinki određenog haplotipa u odnosu na sve jedinke iste evolucijske linije, odnosno vrste.

Kako bi se utvrdile razlike između populacija iste vrste s različitih lokaliteta, upotrijebljen je test genske diferencijacije. Za utvrđivanje razlika među populacijama provedeno je nekoliko testova temeljenih na haplotipovima (χ^2; Nei, 1987., Hudson i sur., 1992a.; H_S i H_{ST}; Hudson i sur., 1992b.) i na nukleotidnim sekvencama (K_S, K_{ST}, K_S*, K_{ST}*, Z_S, Z_S*; Hudson i sur., 1992a., i Snn; Hudson, 2000.). Odluka o prihvaćanju ili odbijanju nulte hipoteze (nema genske razlike među populacijama) donesena je na temelju testa permutacije provedenog na 1 000 replikanata. Mjesta s nepoznatim nukleotidima nisu bila uključena u analizu.

Test temeljen na frekvenciji alela, χ^2 test, čija se statistička značajnost ispituje MC simulacijama, računa se prema izrazu:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^{L}\sum_{j=1}^{K}\frac{\left(n_{ij} - n_i\hat{p}_j\right)^2}{n_i\hat{p}_j},$$

gdje je L broj lokaliteta, K je broj haplotipova u ukupnom uzorku, dok n_i prikazuje veličinu uzorka u lokalitetu i, n_{ij} je uočeni broj kopija haplotipa j iz lokaliteta i, a $\hat{p}_j$ prikazuje frekvenciju haplotipa j u ukupnom uzorku. Vrijednost H_S predstavlja izraz za otežani prosjek procijenjene raznolikosti haplotipova u subpopulacijama, uz dodatak težinskog faktora w, te je izračunat uz pomoć jednadžbe:

$$Hs = \sum_{i=1}^{L} w_i H_i ,$$

dok je H_{ST} vrijednost definirana sljedećim izrazom:

$$H_{ST} = 1 - \left(H_S / H_T \right),$$

gdje H_T predstavlja procjenu raznolikosti haplotipova u ukupnoj populaciji.

Za razliku od haplotipova, statistički testovi temeljeni na sekvencama koriste informaciju o broju razlika između sekvenca. Vrijednosti K_S i K_{ST} izračunate su prema prikazanim formulama:

$$K_S = wK_1 + \left(1 - w\right) K_2$$

i

$$K_{ST} = 1 - (K_S / K_T),$$

gdje je K_S izraz za otežani parametar prosjeka između K_1 i K_2, w je težinski faktor, a K_T prikazuje prosjek razlika između dviju sekvenca bez obzira na njihov lokalitet. Parametri K_S* i K_{ST}* računaju se isto kao K_S i K_{ST} vrijednost uz zamjenu izraza $d_{ij,lk}$ s izrazom log $(1 + d_{ij,lk})$, zbog smanjivanja otežavajućeg parametra, odnosno da se ne vrši korekcija $d_{ij,lk}$ zbog višestrukih mutacija na istoj poziciji. Izraz $d_{ij,lk}$ predstavlja broj razlika između sekvence *j* iz lokaliteta *i* te sekvence *k* iz lokaliteta *l*. U „rang-statistici" računaju se Z i Z* vrijednosti nakon određivanja $d_{ij,lk}$ vrijednosti. Nulta se hipoteza (nema genske razlike među populacijama) odbija u slučaju vrlo male Z vrijednosti. Izraz Z* predstavlja otežanu vrijednost zbroja Z_1* i Z_2* vrijednosti (Hudson i sur, 1992a.). Vrijednost Snn pokazala se znatno snažnijom u odnosu na druge spomenute testove, osim u slučaju malog broja uzoraka (gdje su se K_S* i Z* pokazali statistički snažnijim pokazateljima kod visoke genske raznolikosti). Tom se vrijednosti pokazuje najbliža susjedna sekvenca iz istog lokaliteta, a definirana je izrazom:

$$S_{nn} = \sum_{j=1}^{n} \frac{\chi_j}{n},$$

gdje je χ_j najbliži susjed koji dolazi iz istog područja kao i jedinka *j*. Ukoliko je populacija snažno strukturirana, očekuje se pronalazak sekvence najbližeg susjeda na istom lokalitetu. Ukoliko su populacije s dva lokaliteta vrlo različite, očekuje se približavanje Snn vrijednosti prema broju 1, dok je vrijednost oko 0,5 zabilježena kod populacija koje su dio jedne panmiktične populacije s dva različita lokaliteta. Za procjenu veličine Snn vrijednosti koristi se permutacijski test koji se sastoji od nasumičnih dodjela sekvenca lokalitetima dok broj

sekvenca iz svakog lokaliteta bude jednak originalnom uzorku. Udio preraspodjeljivanih uzoraka kojima je vrijednost Snn jednaka ili veća od uočene vrijednosti, čini procijenjenu P vrijednost (Hudson, 2000.).

Određivanje genske udaljenosti

Genskom se udaljenosti pokušava procijeniti prosječan broj promjena po poziciji od trenutka kada su se dvije uspoređivane sekvence razdvojile (Nei i Kumar, 2000.). Neispravljena genska *p*-udaljenost između vrsta predstavlja udio nukleotidnih mjesta po kojima se dvije istraživane sekvence razlikuju, a određena je u računalnom programu MEGA 7 (Kumar i sur., 2016.). Kod izračuna se ne ispravljaju višestruke supstitucije na istoj poziciji, te se ne uzimaju u obzir razlike između tranzicija i transverzija ili razlike u evolucijskoj stopi između filogenetičkih linija (Nei i Kumar, 2000.).

Određivanje protoka gena

Kako bi se razumjela dinamika evolucije, potrebno je kvantificirati događaje migracije. Naime, migracijska stopa (m) i efektivna veličina populacije (N_e) predstavljaju važne evolucijske parametre za preživljavanje populacije (Slatkin, 1973., Nagylaki i Lucier, 1980., Slatkin 1985.). Tim se parametrima određuje prostorna varijacija u frekvenciji nukleotida te efikasnost selekcije u oblikovanju genoma. Migracija pridonosi održavanju genske varijacije u populaciji unosom rijetkih alela u populaciju ukoliko se populacija širi (Fu i Li, 1993.). Nakon što geni imigranta uđu u novu populaciju, mogu se inkorporirati spolnom reprodukcijom ili hibridizacijom, a naposljetku će doživjeti i lomove uzrokovane rekombinacijom. Migracije uzrokuju protok gena te omogućavaju rekolonizaciju nakon lokalnog izumiranja. U populacijskoj se genetici migracija prikazuje odnosom imigranata u populaciji *l* koji su došli iz populacije *j* u zadnjoj generaciji (Watts i sur., 2007.).

Kako bi se pojasnili demografski događaji poput migracija, u računalnom programu DnaSP (Librado i Rozas, 2009.) izračunati su testovi genske diferencijacije i protoka gena među populacijama s različitih lokaliteta, koristeći informaciju o ploidiji genoma i test permutacije na 1 000 replikanata. Pritom su izračunati različiti koeficijenti i procjenitelji. Koeficijent genske diferencijacije G_{ST} (Nei, 1973.) temelji se na podacima o haplotipovima i zapravo je modifikacija Wrightovog F_{ST} pokazatelja. Izražava se formulom:

$$G_{ST} = D_{ST} / H_T ,$$

gdje je D_{ST} genska raznolikost definirana odnosom zbroja genske raznolikosti između dviju populacija i kvadrata broja populacija, dok H_T predstavlja prosječnu gensku raznolikost u cijeloj populaciji (Hudson i sur., 1992a.). Fiksacijski indeks F_{ST} mjera je populacijske diferencijacije kao posljedice genske strukture, a izračunat je prema izrazu:

$$F_{ST} = 1 - H_w / H_b ,$$

kod kojeg H_w označava prosječan broj razlika između različitih sekvenca uzorkovanih iz iste subpopulacije, dok H_b predstavlja prosječan broj razlika između sekvenca uzorkovanih iz dviju različitih subpopulacija (Hudson i sur., 1992b.). Razina protoka gena izračunata je prema Nm procjenitelju (Hudson i sur., 1992b.) sljedećim izrazom:

$$Nm = \frac{1}{2}\frac{H_w}{H_b - H_w} .$$

Koeficijent varijabilnosti N_{ST} (Lynch i Crease, 1990.) gotovo je isti kao i Nm procjenitelj, uz razliku Jukes-Cantorove korekcije koja podrazumijeva jednaku frekvenciju za sve nukleotidne baze uz jednaku vjerojatnost pojavljivanja tranzicija i transverzija (Jukes i Cantor, 1969.). Taj koeficijent predstavlja mjeru populacijske raspodjele na razini nukleotida, a opisuje se izrazom:

$$N_{ST} = \frac{\hat{v}_b}{\hat{v}_w + \hat{v}_b} ,$$

gdje je $\hat{v}_b$ združeni procjenitelj diferencijacije između populacija, dok je $\hat{v}_w$ združeni procjenitelj unutarpopulacijske diferencijacije, što nam zapravo pokazuje odnos prosječne genske udaljenosti između gena različitih populacija i unutar gena u populaciji općenito. Procjena genskog protoka temeljena je na efektivnom broju migranata (Nm) i prikazana je kao F_{ST} i N_{ST} vrijednost (Lynch i Crease, 1990., Hudson i sur., 1992a. i b.). Istovremeno su izračunate delta (δ_{ST}) i gama (γ_{ST}) statistika prema izrazima opisanima u Nei (1982.).

Za potrebe određivanja unutarvrsne genske raznolikosti, jedinke su grupirane prema istim filogenetičkim linijima dobivenima filogenetičkim rekonstrukcijama za svaki gen zasebno. Za potrebu unutarpopulacijske analize, jedinke su grupirane ovisno o vrsti i lokalitetu. Populacije su nazvane imenom vrste i odgovarajućeg lokaliteta. Vrste iz Pazinčice i Borutskog potoka smatrane su jednom populacijom (squalus_BPPA), kao i vrste iz Neretve, Trebišnjice, Ravnog polja i Hutovog blata (svallize_NETRRAHB) zbog povezanosti vodotokova, iako su se zadnje navedeni lokaliteti promotrili i zasebno.

4. REZULTATI

Iz istraživanih uzoraka prikupljenih s 20 lokaliteta (19 iz jadranskog i jedan iz crnomorskog slijeva) dobivene su 133 zadovoljavajuće sekvence *cyt b* gena dužine 1140 pb (Tablica 6). Kod jezgrinih gena uspješno je izolirano i sekvencirano 144 sekvenca *rhod* gena od 72 analizirane jedinke dužine 810 pb, zatim 120 sekvenca *rag1* gena od 60 jedinki dužine 1443 pb, dok je za S7 uspješno analizirano 26 sekvenca (13 jedinki) dužine 911 pb (uključujući praznine). Insercije i delecije (uz supstitucije) primijećene su samo kod sekvenca introna jezgrinog gena za ribosomalni protein S7, dok su kod ostalih gena primijećene samo supstitucije nukleotida. Udio heterozigotnih jedinki u jezgrinih gena (diploidi) bio je najveći kod *rhod* gena (42%). Kod introna gena za S7 pronađeno je 23% heterozigota, a kod *rag1* gena 22% heterozigota.

4.1. Testovi neutralnosti mutacija i rekombinacije za sve ispitivane gene

Neutralnost mutacija provjerava se zbog toga što neutralne mutacije ne utječu na fitnes i preživljavanje jedinki, te se stoga prenose kroz generacije pa su kao takve pogodne za filogenetička istraživanja. Za provođenje testova bile su potrebno najmanje četiri sekvence pa se kod vrsta s manjim brojem sekvenca testovi nisu mogli izračunati. Tako se kod lokusa *cyt b* gena test neutralnosti nije mogao provesti za vrstu *S. tenellus* koja je predstavljena samo s jednom jedinkom. Svi su testovi neutralnosti za *cyt b* pokazali da su geni trenutno u stanju neutralnosti (Tablica 10), osim za vrstu *S. svallize* koja je jedino po Tajiminom D testu dala negativnu statistički značajnu vrijednost (D = -1,852*). Svi drugi testovi za istu vrstu nisu pokazali znakove selekcije pa se u ovom slučaju ne može odbaciti model neutralnosti. Budući da je ta vrsta predstavljena s većim brojem sekvenca (n=22), odbacuje se mogućnost dobivenog rezultata zbog malog broja predstavnika, što isto može dovesti do krive interpretacije rezultata. Statistička značajnost Tajiminog D testa može biti rezultat i drugih čimbenika osim selekcije, poput širenja populacije, koji onda utječu na devijaciju rezultata statističkih testova neutralnosti slično kao i selekcija. To se objašnjava povećanim brojem rijetkih varijanti zbog populacijskog širenja nakon nedavnog učinka uskog grla, što nam potvrđuje i činjenica da su od pet različitih dobivenih haplotipova *cyt b* gena za vrstu *S. svallize*, četiri predstavljena s jednom sekvencom - što upućuje na povećan broj rijetkih varijanti. To potvrđuje i negativna F_S vrijednost (-0,121) za istu vrstu. Svi testovi neutralnosti provedeni na jezgrinom *rhod* genu nisu pokazali nikakvo odstupanje od neutralnog modela. Naime, niti jedan od dobivenih rezultata nije pokazivao statističku značajnost ($p<0,05$). Kod sekvenca vrsta *S. illyricus* i *S. microlepis* nije bilo segregirajućih mjesta te se test neutralnosti

nije mogao izračunati. Testovi neutralnosti provedeni na sekvencama jezgrinog *rag1* gena pokazali su odstupanje od neutralnog modela za vrstu *S. svallize* (D = -2,077*, D* = -3,757**, F* = 3,779) te za vrstu *S. squalus* (D = - 2,344**, D* = -3,986**, F* = -4,063**), dok se kod ostalih vrsta test nije mogao izvesti zbog malog broja sekvenca (*S. zrmanjae*, *S. microlepis* i *S. tenellus*) ili nepostojanja segregirajućih mjesta (*S. illyricus*). S obzirom na povećan broj rijetkih varijanti moguće je objašnjenje nedavnog populacijskog širenja vrsta *S. svallize* i *S. squalus* nakon učinka uskog grla. Naime, od 11 pronađenih haplotipova vrste *S. squalus* osam je predstavljeno samo s jednom sekvencom, dok su kod vrste *S. svallize* od četiri haplotipa dva predstavljena s jednom sekvencom, što upućuje na povećan broj rijetkih varijanti (slično kao i kod *cyt b* gena). To se potvrđuje i negativnom F_S vrijednosti za obje vrste (-1,271 i -1,906). Testovi neutralnosti introna jezgrinog gena za S7 provedeni su za sve vrste čije su sekvence bile dostupne (*S. svallize*, *S. squalus* i *S. illyricus*), osim za vrstu *S. zrmanjae* koja je predstavljena s premalim brojem sekvenca. Testovi nisu pokazali odstupanje od neutralnog modela niti za jednu ispitivanu vrstu.

Svi testovi rekombinacije pokazali su nikakve ili vrlo male vrijednosti minimalnog broja rekombinacijskih događaja koji su bili puno manji u odnosu na broj mutacija, što upućuje na zaključak da rekombinacija nije utjecala na filogenetički obrazac (Tablica 10).

Tablica 10. Indeksi genske raznolikosti i rezultati ispitivanja neutralnosti i rekombinacije istraživanih lokusa po pojedinoj istraživanoj vrsti Značenje kratica: N - broj sekvenca; h - broj haplotipova; S - broj segregirajućih mjesta; π - nukleotidna raznolikost; Θ - Wattersonov populacijski mutacijski parametar po nukleotidu; D (Tajima, 1989.), D* (Fu i Li, 1993.), F* (Fu i Li, 1993.), F_S (Fu, 1997.), S (Strobeck, 1987.) - parametri testova neutralnosti; R - rekombinacijski parametar između udaljenih mjesta; Ra - rekombinacijski parametar između susjednih mjesta; Rm - najmanji broj rekombinacijskih događaja; η - broj mutacija

Lokus/ vrsta	**N**	**h**	**S**	**π**	**Θ**	**D**	**D***	**F***	**F_S**	**S**	**R**	**Ra**	**Rm**	**η**
cyt b														
S. squalus	66	12	24	0,003	0,005	-0,980	-1,357	-1,453	-0,426	0,736	6,1	0,005	0	25
S. svallize	22	5	11	0,001	0,003	-1,852*	-1,745	-2,065	-0,121	0,752	0,001	0	1	11
S. zrmanjae	5	2	1	0,0004	0,0004	-0,817	-0,817	-0,772	0,090	0,875	>10000	-	0	1
S. illyricus	24	6	5	0,001	0,001	0,349	0,332	0,390	-0,780	0,852	23,6	0,021	0	5
S. tenellus	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S. microlepis	4	3	4	0,002	0,002	-0,065	-0,065	-0,060	0,251	0,851	11,4	0,010	0	4
S. sp.	5	2	1	0,0005	0,0004	1,225	1,225	1,157	0,626	0,784	>10000	-	0	1
rhod														
S. squalus	51	6	6	0,0008	0,002	-1,322	-1,414	-1,624	-2,417	0,974	0,001	0	1	6
S. svallize	53	3	2	0,0006	0,0005	0,164	-0,909	-0,686	0,332	0,706	119	0,147	0	2
S. zrmanjae	5	2	1	0,0005	0,0006	-0,817	-0,817	-0,772	0,090	0,875	>10000	-	0	1
S. illyricus	11	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
S. tenellus	0													
S. microlepis	7	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
rag1														
S. squalus	37	10	30	0,002	0,005	-2,344**	-3,986**	-4,063**	-1,906	0,941	0,001	0	1	30
S. svallize	53	4	8	0,0003	0,001	-2,077*	-3,757**	-3,779**	-1,271	0,927	0,001	0	0	8
S. zrmanjae	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S. illyricus	15	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
S. tenellus	2	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
S. microlepis	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tablica 10. - nastavak

Lokus/ vrsta	**N**	**h**	**S**	**π**	**Ɵ**	**D**	**D***	**F***	**F_S**	**S**	**R**	**Ra**	**Rm**	**η**
S7														
S. squalus	6	3	2	0,001	0,001	1,393	1,280	1,354	0,020	0,827	199	0.248	0	2
S. svallize	12	2	3	0,001	0,001	-0,278	1,105	0,855	2,185	0,379	0,001	0	0	3
S. zrmanjae	2	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S. illyricus	4	2	5	0,003	0,003	-0,797	-0,797	-0,753	2,598	0,387	0,001	0	0	5
S. tenellus	0													
S. microlepis	0													

4.2. Raznolikost i geografska distribucija haplotipova

Haplotipovi gena za citokrom b

U setu od 133 istraživane mitohondrijske sekvence *cyt b* gena (127 jadranskih i 6 crnomorskih sekvenca) dobiveno je ukupno 35 haplotipova (31 jadranski i 4 crnomorska haplotipa). Broj sekvenca, uz odgovarajuće lokalitete i haplotipove, prikazan je u Tablici 11.

Tablica 11. Geografska distribucija haplotipova *cyt b* gena (imena haplotipova prikazana su u zagradi) po pojedinom lokalitetu
Posebno su istaknuti haplotipovi nađeni isključivo na određenom lokalitetu. Značenje kratica: N - broj sekvenca, N(h) - broj haplotipova

Lokalitet	**N**	**N(h)**	**N(h) spec. za lokalitet**
Dragonja	5	2 (IST1, IST2)	1 (IST2)
Mirna	6	2 (IST1, IST5)	1 (IST5)
Borutski potok	9	1 (IST1)	0
Pazinčica	8	1 (IST1)	0
Raša	3	3 (IST1, IST4, VIS1)	0
Boljunšćica	8	3 (IST3, IST4, ILI1)	1 (IST3)
Zrmanja	6	2 (ZRM1, ILI1)	1 (ZRM1)
Krka	8	3 (ZRM2, ILI3, ILI4)	1 (ZRM2)
Visovac/ Krka	9	6 (ILI1, ILI3, ILI4,VIS1,VIS2, VIS3)	2 (VIS2, VIS3)
Vinalić/ Cetina	8	4 (ILI1, ILI2, ILI5, ILI6)	3 (ILI2, ILI5, ILI6)
Ruda	1	1 (TEN1)	1 (TEN1)
Prološko blato	2	2 (MIC1, MIC2)	1 (MIC2)
Vrljika	2	2 (MIC1, MIC3)	1 (MIC3)
Neretva	13	2 (SVA1, SVA2)	1 (SVA2)
Hutovo blato	4	4 (SVA1, SVA3, SVA4, SVA5)	3 (SVA3, SVA4,SVA5)
Trebišnjica	10	5 (SVA1, TRE1, TRE2, TRE3, LJUT1)	2 (TRE1, TRE3)
Ravno	8	3 (SVA1, TRE2, LJUT1)	0
Ljuta	17	3 (LJUT1, LJUT2, LJUT3)	2 (LJUT2, LJUT3)

Unatoč malom broju ulovljenih jedinki, najveća raznolikost haplotipova uočena je u hercegovačkom Hutovom blatu (četiri jedinke) te u istarskoj Raši (tri jedinke), gdje broj jedinki odgovara i broju različitih pronađenih haplotipova. Velika raznolikost haplotipova pronađena je i u vodama Imotskog polja (Vrljika i Prološko blato), s četiri sekvence koje posjeduju tri haplotipa. Od lokaliteta s većim brojem predstavnika, umjerenu raznolikost pokazuju haplotipovi pronađeni na području Visovca na Krki, Vinalića na Cetini i u Trebišnjici. Mala raznolikost zabilježena je u rijekama Ljutoj i Neretvi. Naime, 17 sekvenca posjeduje samo tri haplotipa s lokaliteta Ljute, dok 13 sekvenca iz Neretve posjeduje samo dva haplotipa. Najmanja raznolikost haplotipova zabilježena je unutar istarskih sekvenca iz

Borutskog potoka i Pazinčice, gdje svih 17 sekvenca posjeduje isti *cyt b* haplotip. Najviše specifičnih haplotipova za lokalitete zabilježeno je u rijeci Cetini i na području Hutovog blata (3 jedinstvena haplotipa).

Haplotipovi *cyt b* gena po lokalitetu prikazani su u Tablici 12. Na lokalitetima gdje je pronađeno više haplotipova, većinom se radi o istim filogenetičkim linijama. Izuzetak čine lokaliteti Zrmanje, Krke (uz Visovac), Ravnog polja i Trebišnjice na kojima je nađeno više različitih filogenetičkih linija. Na području Trebišnjice i Ravnog polja pronađene su tri, dok su u Krki, Visovcu i Zrmanji pronađene dvije različite filogenetičke linije.

Od 39 istraživanih istarskih sekvenca, 36 ih posjeduje *S. squalus* haplotipove (pet haplotipova), dok, neočekivano, tri jedinke posjeduju *S. illyricus* haplotip (jedan haplotip iz Boljunšćice). U Zrmanji su pronađeni haplotipovi vrsta *S. zrmanjae* i *S. illyricus*, dok je u Ričici pronađen samo *S. zrmanjae* haplotip. Kao i u Zrmanji, u Krki su pronađeni haplotipovi vrsta *S. illyricus* i *S. zrmanjae*, dok su na lokalitetu Visovca na Krki, uz navedene, pronađeni i haplotipovi vrste *S. squalus*. U rijeci Cetini pronađeni su haplotipovi vrste *S. illyricus*, dok je u Rudi pronađen haplotip vrste *S. tenellus*. U Vrljici i Prološkom blatu pronađeni su haplotipovi koji odgovaraju vrsti *S. microlepis*. U Trebišnjici (i Ravnom polju), uz pronađene haplotipove vrsta *S. squalus* i *S. svallize*, pronađeni su i haplotipovi koji pripadaju novoj izdvojenoj filogenetičkoj liniji (dva haplotipa, pet sekvenca) - *S.* sp. TRRA. U Neretvi i Hutovom blatu pronađeni su isključivo haplotipovi vrste *S. svallize*, dok su u Ljutoj sekvence *cyt b* gena posjedovale haplotipove vrste *S. squalus*.

Geografska distribucija *cyt b* haplotipova pokazala je iznenađujuće rezultate pokazujući veću raširenost haplotipova vrste *S. illyricus* i *S. squalus* od očekivane. S druge strane, iz rijeka Dragonje, Pazinčice i Boljunčice ni po jednom genskom biljegu nije pronađen jedinstven haplotip koji bi odgovarao vrsti *S. janae*, koja je na tim lokalitetima nedavno opisana (Bogutskaya i Zupančič, 2010., Zupančič i sur., 2010a.). Haplotipovi pronađeni u tim istarskim rijekama široko su rasprostranjeni i u drugim istarskim rijekama, te su genski slični haplotipovima vrste *S. squalus* iz drugih područja.

Tablica 12. Broj sekvenca raspoređenih uz pripadajući haplotip cyt *b* gena po pojedinom lokalitetu
Podebljana imena haplotipova predstavljaju prvog predstavnika različite filogenetičke linije u nizu. Značenje kratica: DR - Dragonja, MI - Mirna, BP - Borutski potok, PA - Pazinčica, RŠ - Raša, BO - Boljunšćica, LI - Ričica (Lika), ZR - Zrmanja(+Ričica), KR - Krka, VS - Visovac (Krka), VI - Vinalić (Cetina), RU - Ruda, PB - Prološko blato, VR - Vrljika, NE - Neretva, ME - Metković (Neretva), HB - Hutovo blato, TR - Trebišnjica, RA - Ravno polje, LJU - Ljuta

Br. lok.	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15./16.	17.	18.	19.	20.
Lok.	DR	MI	BP	PA	RŠ	BO	LI	ZR	KR	VS	VI	RU	PB	VR	NE, ME	HB	TR	RA	LJU
IST1	3	4	8	8	1														
IST2	2																		
IST3						1													
IST4					1	4													
IST5		2																	
VIS1					1					3									
VIS2										1									
VIS3										1									
TRE3																	1		
LJUT1																	3	4	15
LJUT2																			1
LJUT3																			1
ZRM1							2	2											
ZRM2									1										
ILI1						3		2		1	3								
ILI2											1								
ILI3									6	2									
ILI4									1	1									
ILI5											2								
ILI6											2								
TEN1												1							

Tablica 12. - nastavak

Br. lok.	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15./16.	17.	18.	19.	20.
Lok.	DR	MI	BP	PA	RŠ	BO	LI	ZR	KR	VS	VI	RU	PB	VR	NE, ME	HB	TR	RA	LJU
MIC1													1	1					
MIC2													1						
MIC3														1					
SVA1															12	1	2	3	
SVA2															1				
SVA3																1			
SVA4																1			
SVA5																1			
TRE1																	3		
TRE2																	1	1	

Frekvencija *cyt b* haplotipova različita je unutar vrsta, često s dominacijom jednog ili dva haplotipa ovisno o vrsti, dok su druge haplotipove posjedovale jedna ili par sekvenca (Tablica 13). Kod vrste *S. squalus* dominiraju dva haplotipa u odnosu na ostale - jedan je u sjevernoj, istarskoj grupi pronađen na području Dragonje, Pazinčice, Borutskog potoka, Mirne i Raše (IST1), dok je drugi u južnoj grupi pronađen na području Trebišnjice, Ravnog polja i Ljute (LJUT1). Kod vrste *S. illyricus* dominiraju dva haplotipa - jedan je pronađen na širem geografskom području (Cetina, Zrmanja, Visovac i Boljunšćica; ILI1), a drugi je pronađen samo u rijeci Krki (zajedno s Visovcem; ILI3). Sve sekvence vrste *S. zrmanjae* iz Zrmanje i Ričice pripale su dominantnom haplotipu (ZRM1), dok je haplotip iz Krke posjedovala samo jedna pronađena sekvenca (ZRM2). Kod nove filogenetičke linije iz Trebišnjice i Ravnog polja čije su sekvence posjedovale dva haplotipa, podjednako se pojavljuju oba (mali broj istraživanih sekvenca, n=5). Za vrstu *S. svallize* dominirajući je haplotip pronađen u cijelom neretvanskom slijevu (SVA1). Za vrstu *S. tenellus* analizirana je samo jedna sekvenca iz Rude, pa se frekvencija haplotipova nije mogla izračunati.

Tablica 13. Frekvencija *cyt b* haplotipova istraživanih vrsta klenova u rijekama jadranskog slijeva
Vrijednosti su izračunate kao udio određenog haplotipa u ukupnom broju sekvenca iste filogenetičke linije. Različite su filogenetičke linije odvojene novim stupcem ili praznim redom.

haplotip	**f (h) (%)**	**haplotip**	**f (h) (%)**	**haplotip**	**f (h) (%)**
IST1	37,9	ILI1	37,5	ZRM1	80,0
IST2	3,0	ILI2	4,2	ZRM2	20,0
IST3	1,5	ILI3	33,3		
IST4	7,6	ILI4	8,3	TRE1	60,0
IST5	3,0	ILI5	8,3	TRE2	40,0
VIS1	6,1	ILI6	8,3		
VIS2	1,5			SVA1	81,8
VIS3	1,5	MIC1	50,0	SVA2	4,5
TRE3	1,5	MIC2	25,0	SVA3	4,5
LJUT1	33,3	MIC3	25,0	SVA4	4,5
LJUT2	1,5			SVA5	4,5
LJUT3	1,5	TEN1	100,0		

Haplotipovi jezgrinog gena za rodopsin

U setu od 140 istraživanih sekvenca (128 jadranskih i 12 crnomorskih sekvenca) jezgrinog gena za rodopsin ukupno je pronađeno 19 haplotipova (13 jadranskih i 6 crnomorskih haplotipova). Geografska distribucija haplotipova gena za rodopsin prikazana je u Tablici 14. Najveća raznolikost haplotipova zabilježena je u Dragonji, gdje svih šest

analiziranih sekvenca posjeduje različite haplotipove. Osim toga, za Dragonju su specifična četiri haplotipa pronađena isključivo na tom lokalitetu. Za razliku od Dragonje, u ostalim istarskim rijekama utvrđena je niska raznolikost. Tako je u Pazinčici 10 sekvenca posjedovalo samo dva haplotipa. U Mirni, Zrmanji, Rudi i Vrljici pronađen je samo jedan haplotip, na što je mogao utjecati i mali broj analiziranih sekvenca iz tih područja. Najmanja je raznolikost haplotipova zabilježena na lokalitetima Neretve i Trebišnjice, gdje su unatoč većem broju sekvenca (18 i 20) pronađena samo dva haplotipa. Isto tako, uz veći broj istraživanih sekvenca, na lokalitetima Ravnog polja (n=14) i Ljute (n=28) pronađena su samo 3 haplotipa.

Tablica 14. Geografska distribucija haplotipova jezgrinog gena za rodopsin istraživanih vrsta *Squalius* u rijekama jadranskog slijeva

Br. lok.	**Lokalitet**	**Br. sekv.**	**Ukupan br. haplotipova**	**Br. haplotipova spec. za lokalitet**
1.	Dragonja	6	6 (rDRA1, rDRA2, rSQU1, rSQU2, rSQU3, rSQU4)	4 (rDRA1, rDRA2, rSQU1, rSQU3)
2.	Mirna	2	1 (rSQU2)	0
3.	Borutski potok	6	2 (rSQU2, rSQU4)	0
4.	Pazinčica	10	2 (rSQU2, rSQU4)	0
8.	Zrmanja	4	1 (rZRM2)	1 (rZRM2)
9.	Krka	12	3 (rILI1, rSQU4, rZRM1)	1 (rZRM1)
12.	Ruda	4	1 (rMIC1)	0
13.	Prološko blato	2	2 (rILI1, rMIC1)	0
14.	Vrljika	2	1 (rMIC1)	0
15.	Neretva	18	2 (rSVA1, rSVA2)	0
18.	Trebišnjica	20	2 (rSQU4, rSVA2)	0
19.	Ravno polje	14	3 (rSQU4, rSVA1, rSVA2)	0
20.	Ljuta	28	3 (rSVA1, rSVA2, rSVA3)	1 (rSVA3)

Kod jezgrinog gena za rodopsin primijećena je pojava dijeljenja istog haplotipa između različitih vrsta, *S. microlepis* i *S. illyricus* (ustanovljenih prema mtDNA) (Tablica 15). Tako su sekvence iz Rude, Prološkog blata i Vrljike posjedovale jedan zajednički haplotip (rMIC1), dok prema *cyt b* genu jedinke iz Rude posjeduju haplotip vrste *S. tenellus*, a ostale navedene sekvence posjeduju haplotip vrste *S. microlepis*. Budući da se smatra da u Rudi obitava vrsta *S. tenellus*, razlog tomu je najvjerojatnije nepotpuno razvrstavanje linija zbog sporije mutacijske stope jezgrinih gena. Isto tako, kod jedne jedinke iz Krke (*S. illyricus* prema mtDNA) sekvence su pripale haplotipovima različitih vrsta, *S. illyricus* i *S. squalus* (rILI1 i rSQU4). Razlika u odnosu na mtDNA uočena je i kod sekvenca iz Trebišnjice i Ravnog polja koje su se po mtDNA izdvojile u novu filogenetičku liniju, dok po jezgrinom genu za rodopsin posjeduju haplotip vrste *S. squalus* (rSQU4). Isto tako, sekvence iz Ljute po

rhod genu posjeduju tri *S. svallize* haplotipa (rSVA1, rSVA2 i rSVA3), za razliku od *cyt b* sekvenca gdje su se izdvojili *S. squalus* haplotipovi.

Tablica 15. Broj sekvenca s pojedinog lokaliteta uz odgovarajuće haplotipove jezgrinog gena za rodopsin istraživanih jadranskih vrsta klenova
Početak nove filogenetičke linije obilježen je podebljanim slovima prvog haplotipa u nizu. Značenje kratica: DR - Dragonja, MI - Mirna, BP - Borutski potok, PA - Pazinčica, ZR - Zrmanja, KR - Krka, RU - Ruda, PB - Prološko blato, VR - Vrljika, NE - Neretva, TR - Trebišnjica, RA - Ravno polje, LJU - Ljuta

Br. lok.	1.	2.	3.	4.	8.	9.	12.	13.	14.	15.	18.	19.	20.
Lok.	DR	MI	BP	PA	ZR	KR	RU	PB	VR	NE	TR	RA	LJU
rDRA1	1												
rDRA2	1												
rSQU1	1												
rSQU2	1	2	3	5									
rSQU3	1												
rSQU4	1			5		1					19	8	
rZRM1						1							
rZRM2					4								
rILI1						10		1					
rMIC1							4	1	2				
rSVA1										7		2	7
rSVA2										11	1	4	20
rSVA3													1

Za izračun frekvencije haplotipova kod haplotipova s nepotpunim razvrstavanjem linija uzete su samo jedinke iz Prološkog blata i Vrljike (područje obitavanja isključivo vrste *S. microlepis*) te Krke, koje su potvrđene i mitohondrijskim *cyt b* genom. Frekvencije haplotipova sekvenca jezgrinog gena za rodopsin pokazale su da za svaku filogenetičku liniju dominira po jedan haplotip pojavljujući se u više od polovice uzoraka iste vrste (Tablica 16).

Kod vrste *S. squalus* dominira rSQU4 haplotip koji je pronađen kod jedinki iz Dragonje i Pazinčice (zajedno s Borutskim potokom), Trebišnjice i Ravnog polja te kod jedne jedinke iz Krke. Kod vrste *S. svallize* dominira rSVA2 haplotip pronađen u Neretvi, Trebišnjici, Ravnom polju i Ljutoj. Kod vrste *S. zrmanjae* dominira haplotip iz Zrmanje, dok je kod vrsta *S. illyricus* i *S. microlepis* pronađen samo jedan haplotip. Osim vrste *S. illyricus* koja je predstavljena s dovoljnim brojem sekvenca unutar jednog haplotipa, kod ostalih navedenih vrsta analiziran je mali broj sekvenca pa frekvencija haplotipova ne mora nužno odgovarati stvarnom stanju.

Tablica 16. Frekvencija haplotipova jezgrinog gena za rodopsin istraživanih vrsta klenova Različite filogenetičke linije razdvojene su praznim redom.

Haplotip	f (h) %	Haplotip	f (h) %
rDRA1	1,9	rILI1	100,0
rDRA2	1,9		
rSQU1	1,9	rMIC1	100,0
rSQU2	21,2		
rSQU3	1,9	rSVA1	30,2
rSQU4	71,2	rSVA2	67,9
		rSVA3	1,9
rZRM1	20,0		
rZRM2	80,0		

Haplotipovi jezgrinog rag1 gena

U setu od 118 istraživanih sekvenca jezgrinog *rag1* gena ukupno su pronađena 23 haplotipa. Ukupno je istraživano 114 jadranskih sekvenca s 20 haplotipova, dok od četiriju crnomorskih sekvenca jedna posjeduje haplotip jadranskih sekvenca (RSQU7), a ostale tri sekvence posjeduju tri različita haplotipa. Geografska distribucija haplotipova jezgrinog *rag1* gena prikazana je u Tablici 17.

Tablica 17. Geografska distribucija haplotipova jezgrinog *rag1* gena istraživanih vrsta *Squalius* u rijekama jadranskog slijeva

Br. lok.	Lokalitet	Br. sekv.	Ukupan br. haplotipova (ime haplotipa)	Br. haplotipova spec. za lokalitet
1.	Dragonja	6	2 (RSQU7, RSQU10)	1 (RSQU10)
2.	Mirna	2	1 (RSQU7)	0
3.	Borutski potok	6	1 (RSQU7)	0
4.	Pazinčica	6	3 (RSQU7, RSQU8, RSQU9)	2 (RSQU8, RSQU9)
8.	Zrmanja	2	2 (RZRM1, RZRM2)	2 (RZRM1, RZRM2)
9.	Krka	14	1 (RILI1)	0
12.	Ruda	2	1 (RTEN1)	1 (RTEN1)
13.	Prološko blato	2	2 (RILI1, RMIC1)	1 (RMIC1)
14.	Vrljika	2	1 (RILI1)	0
15.	Neretva	18	3 (RSVA1, RSVA2, RMET1)	2 (RSVA2, RMET1)
18.	Trebišnjica	16	7 (RSQU1, RSQU2, RSQU3, RSQU4, RSQU5, RSVA3, RSVA4)	6 (RSQU2, RSQU3, RSQU4, RSQU5, RSVA3, RSVA4)
19.	Ravno polje	12	3 (RSQU1, RSQU6, RSVA1)	1 (RSQU6)
20.	Ljuta	26	1 (RSVA1)	0

Najveća raznolikost haplotipova zabilježena je u Trebišnjici gdje je pronađeno sedam različitih haplotipova (16 sekvenca), od kojih je šest specifično baš za taj lokalitet. Na sjeveru, unutar istarskih rijeka najveća je raznolikost haplotipova *rag1* gena pronađena u Pazinčici i Dragonji, dok je samo jedan haplotip pronađen u Borutskom potoku i Mirni (ali na mali broj istraživanih sekvenca). Uz navedene lokalitete, mala je raznolikost zabilježena i u Krki, Rudi i Vrljici gdje je također pronađen samo jedan haplotip, na što je mogao utjecati i mali broj analiziranih predstavnika iz Rude i Vrljike, dok je za Krku uzorak bio dovoljno reprezentativan (14 sekvenca). Mali je broj haplotipova pronađen i u Neretvi, gdje su na 18 sekvenca pronađena samo tri haplotipa. Najmanja je raznolikost zabilježena u Ljutoj, gdje je na čak 26 sekvenca pronađen samo jedan haplotip.

Za razliku od sekvenca *rhod* gena iz Krke koje su posjedovale *S. illyricus* i *S. squalus* haplotipove, kod jedinki iz Krke uočeno je posjedovanje samo jednog haplotipa *rag1* gena vrste *S. illyricus* (kao i kod *cyt b* gena) (Tablica 18). Slično kao i kod *rhod* gena primijećeno je nepotpuno razvrstavanje linija. Naime, haplotip vrste *S. illyricus* (RILI1) kod *rag1* gena dijelile su sekvence iz Krke, Prološkog blata i Vrljike. Jedinke iz Rude, kao i kod *cyt b* gena, za *rag1* gen posjedovale su haplotipove vrste *S. tenellus* (RTEN1), dok su prema *rhod* genu posjedovale *S. microlepis* haplotip. Dvije ispitivane sekvence iz Prološkog blata posjedovale su haplotipove *rag1* gena (RMIC1 i RILI1) karakteristične za vrste *S. microlepis* i *S. illyricus* (kao i za *rhod* gen). Sekvence jedinki iz Trebišnjice i Ravnog polja koje su se po *cyt b* genu izdvojile u novu filogenetičku liniju, po *rhod* genu posjeduju haplotip vrste *S. squalus*, kod jezgrinog *rag1* gena posjeduju jedan haplotip (RSQU1) vrste *S. squalus*, dok je izuzetak jedna heterozigotna jedinka iz Trebišnjice s jednom sekvencom haplotipa vrste *S. svallize* (RSVA3). Osim navedene jedinke iz Trebišnjice, još su dvije jedinke s istog lokaliteta (potvrđene kao vrsta *S. squalus* prema *cyt b* i *rhod*) s dva različita alela *rag1* gena koji pripadaju vrstama *S. squalus* i *S. svallize*. Sve sekvence iz Ljute posjeduju jedan haplotip karakterističan za vrstu *S. svallize* (RSVA1). Potrebno je istaknuti i jednu jedinku iz Drave koja je posjedovala haplotip vrste *S. squalus* (RSQU7), koji je pronađen isključivo u istarskim rijekama (Mirni, Pazinčici, Dragonji i Borutskom potoku).

Tablica 18. Haplotipovi *rag1* gena jadranskih vrsta klenova
Prikazan je broj sekvenca ispod navedenih lokaliteta uz odgovarajuće haplotipove. Početak nove filogenetičke linije obilježen je podebljanim slovima prvog odgovarajućeg haplotipa u nizu. Značenje kratica: DR - Dragonja, MI - Mirna, BP - Borutski potok, PA - Pazinčica, ZR - Zrmanja, KR - Krka, RU - Ruda, PB - Prološko blato, VR - Vrljika, NE - Neretva, TR - Trebišnjica, RA - Ravno polje, LJU - Ljuta, DV - Drava

Br. lok.	1.	2.	3.	4.	8.	9.	12.	13.	14.	15.	18.	19.	20.	21.
Lok.	DR	MI	BP	PA	ZR	KR	RU	PB	VR	NE	TR	RA	LJU	DV
RSQU1											7	5		
RSQU2											1			
RSQU3											1			
RSQU4											1			
RSQU5											1			
RSQU6												1		
RSQU7	3	2	6	4										1
RSQU8				1										
RSQU9				1										
RSQU10	3													
RZRM1					1									
RZRM2					1									
RILI1						14		1	2					
RMIC1								1						
RTEN1							2							
RSVA1										15		6	26	
RSVA2										1				
RSVA3											4			
RSVA4											1			
RMET1										2				

Za izračun frekvencije haplotipova nisu uzeti u obzir filogenetički nerazriješeni haplotipovi RZRM2 i RMET1. Budući da se računala frekvencija jadranskih haplotipova, nije uzeta u obzir ni jedinka iz Drave čija je sekvenca posjedovala istarski haplotip RSQU7. Kod vrste *S. squalus* prevladavaju dva haplotipa - jedan sjeverni iz istarskih rijeka pronađen u Dragonji, Mirni, Pazinčici, Borutskom potoku (i Dravi) (RSQU7) te južni iz Trebišnjice i Ravnog polja (RSQU1) (Tablica 19). Kod vrste *S. svallize* u velikom postotku dominira haplotip RSVA1 pronađen kod jedinki iz Neretve, Ravnog polja i Ljute. Kao i kod gena za rodopsin, sve sekvence *rag1* gena vrste *S. illyricus* posjeduju samo jedan haplotip. Ostale su vrste predstavljene s premalim brojem sekvenca da bi se donio valjan zaključak o frekvenciji haplotipova.

Tablica 19. Frekvencija haplotipova *rag1* gena istraživanih vrsta klenova jadranskog slijeva

Haplotip	**f (h) %**	**Haplotip**	**f (h) %**
RSQU1	32,4	RZRM1	100,0
RSQU2	2,7		
RSQU3	2,7	RILI1	100,0
RSQU4	2,7		
RSQU5	2,7	RMIC1	100,0
RSQU6	2,7		
RSQU7	40,5	RSVA1	88,7
RSQU8	2,7	RSVA2	1,9
RSQU9	2,7	RSVA3	7,5
RSQU10	8,2	RSVA4	1,9
RTEN1	100,0		

Haplotipovi introna jezgrinog gena za S7

U setu od 26 uspješno sekvenciranih jadranskih sekvenca ukupno je pronađeno 10 haplotipova. Geografska distribucija pojedinih haplotipova introna jezgrinog gena za S7 prikazana je u Tablici 20. Najveća raznolikost haplotipova zabilježena je u Neretvi i Ravnom polju, gdje su na četiri sekvence pronađena tri haplotipa, odnosno na šest sekvenca dobivena su četiri haplotipa. Najmanja raznolikost zabilježena je u Ljutoj, gdje je na osam sekvenca pronađen samo jedan haplotip.

Tablica 20. Geografska distribucija haplotipova introna jezgrinog gena za S7 istraživanih vrsta *Squalius* u rijekama jadranskog slijeva
Značenje kratica: KR - Krka, CE - Cetina, TR - Trebišnjica

Br. lok.	**Lokalitet**	**Br. sekv.**	**Uk. br. haplotipova (ime haplotipa)**	**Br. haplotipova spec. za lokalitet**
8.	Zrmanja	2	1 (SZRM1)	1 (SZRM1)
9.	Krka	2	1 (SILI3)	1 (SILI3)
10.	Visovac (KR)	2	1 (SSVA1)	0
11.	Vinalić (CE)	2	2 (SILI1, SILI2)	2 (SILI1, SILI2)
15.	Neretva	4	3 (SSQU1, SSQU2, SMET1)	1 (SMET1)
19.	Ravno polje (TR)	6	4 (SSQU1, SSQU2, SSQU3, SSVA2)	2 (SSQU3, SVA2)
20.	Ljuta	8	1 (SSVA1)	0

Sve su sekvence iz Ljute posjedovale S7 haplotip vrste *S. svallize*, kao što je slučaj i kod svih ostalih jezgrinih gena uključenih u ovo istraživanje (Tablica 21). Zanimljivo je istaknuti jednu jedinku iz Visovca čija je *cyt b* sekvenca posjedovala haplotip vrste *S. squalus*,

dok je ista jedinka kod sekvenca introna jezgrinog gena za S7 imala sekvence haplotipa vrste *S. svallize* (SSVA1). Za ostale jezgrine gene kod spomenute jedinke nisu bile dostupne sekvence za istraživanje. Kao i kod *rag1* gena, i kod introna S7 gena pronađen je nerazriješeni haplotip iz Neretve (za ostale istraživane gene kod navedene jedinke nisu bile dostupne sekvence).

Tablica 21. Broj sekvenca odvojenih po lokalitetu i haplotipu introna jezgrinog S7 gena jadranskih vrsta klenova
Početak nove filogenetičke linije obilježen je podebljanim slovima prvog haplotipa u nizu. Značenje kratica: ZR - Zrmanja, KR - Krka, VS - Visovac (KR), VI - Vinalić (Cetina), NE - Neretva, RA - Ravno polje, LJU - Ljuta

Br. lok.	8.	9.	10.	11.	15.	19.	20.
Lok.	ZR	KR	VS	VI	NE	RA	LJU
SILI1				1			
SILI2				1			
SILI3		2					
SZRM1	2						
SSVA1			2				8
SSQU1					1	2	
SSQU2					1	1	
SSQU3						1	
SMET1					2		
SSVA2						2	

Budući da je za ovaj molekularni biljeg uspješno sekvenciran mali broj sekvenca, frekvencija haplotipova nije izračunata.

4.3. Filogenetički odnosi unutar klenova jadranskog slijeva

4.3.1. Filogenetička rekonstrukcija mitohondrijskog *cyt b* gena

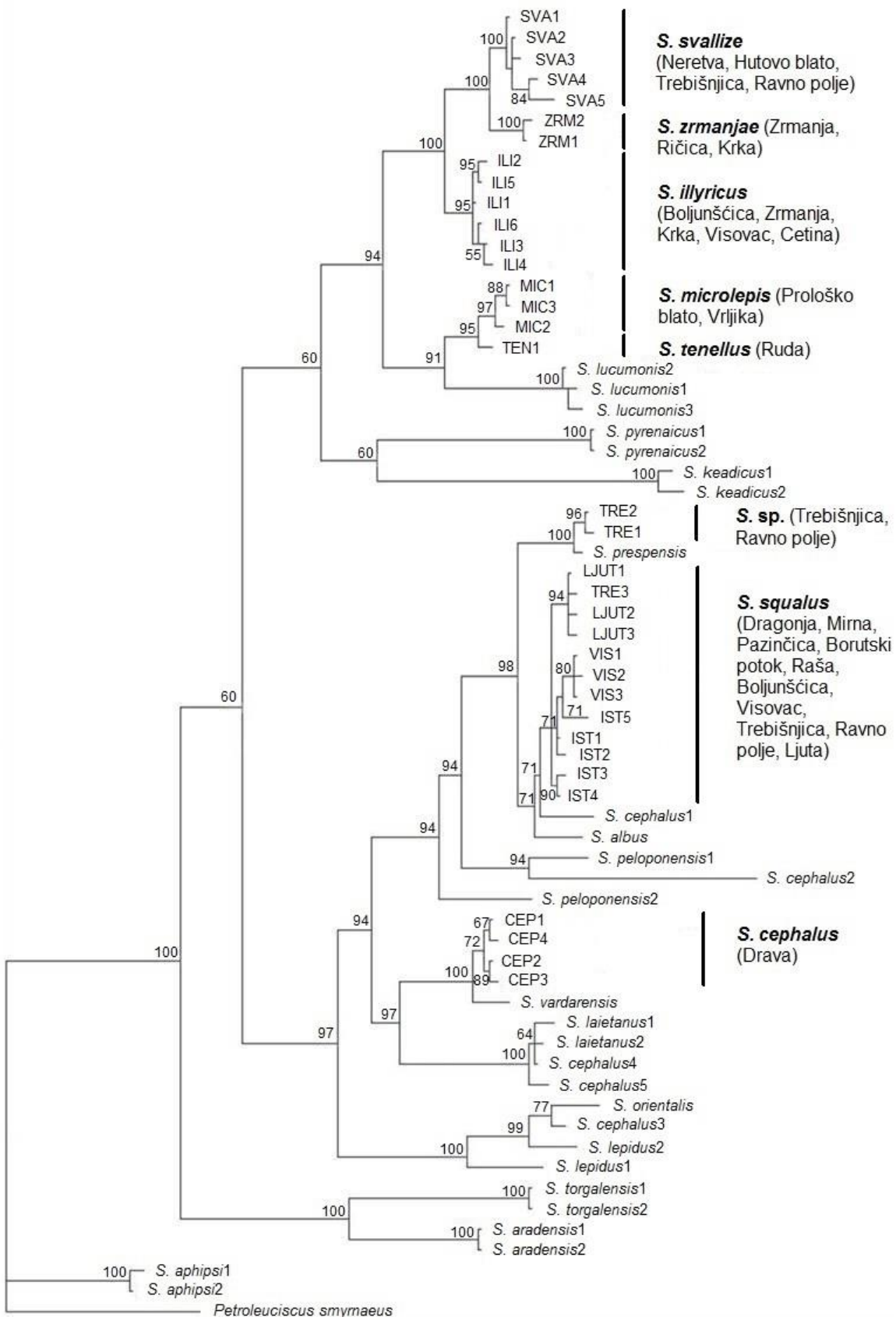
Filogenetička rekonstrukcija rađena je na temelju ukupno dobivenih 167 sekvenca (uz vanjsku grupu) na 1140 nukleotidnih mjesta (prvi skup podataka) *cyt b* gena. Na ukupno 64 haplotipa (uključujući sekvence iz banke gena i vanjsku grupu) dobiveno je 757 nevarijabilnih mjesta te 383 varijabilna mjesta, od kojih je 320 bilo parsimonijski informativno.

Analizom najveće parsimonije iz podataka za mitohondrijski biljeg *cyt b* dobiveno je filogenetičko stablo dužine 914 (Slika 28). Indeks konzistencije (CI) iznosio je 0,4967, CI bez neinformativnih značajki (uključena samo varijabilna mjesta) iznosio je 0,4575, indeks homoplazije (HI) iznosio je 0,5033, dok je HI bez neinformativnih značajki iznosio 0,5425, indeks retencije (RI) je 0,8533, a reskalirani indeks konzistencije (RC) je 0,4239.

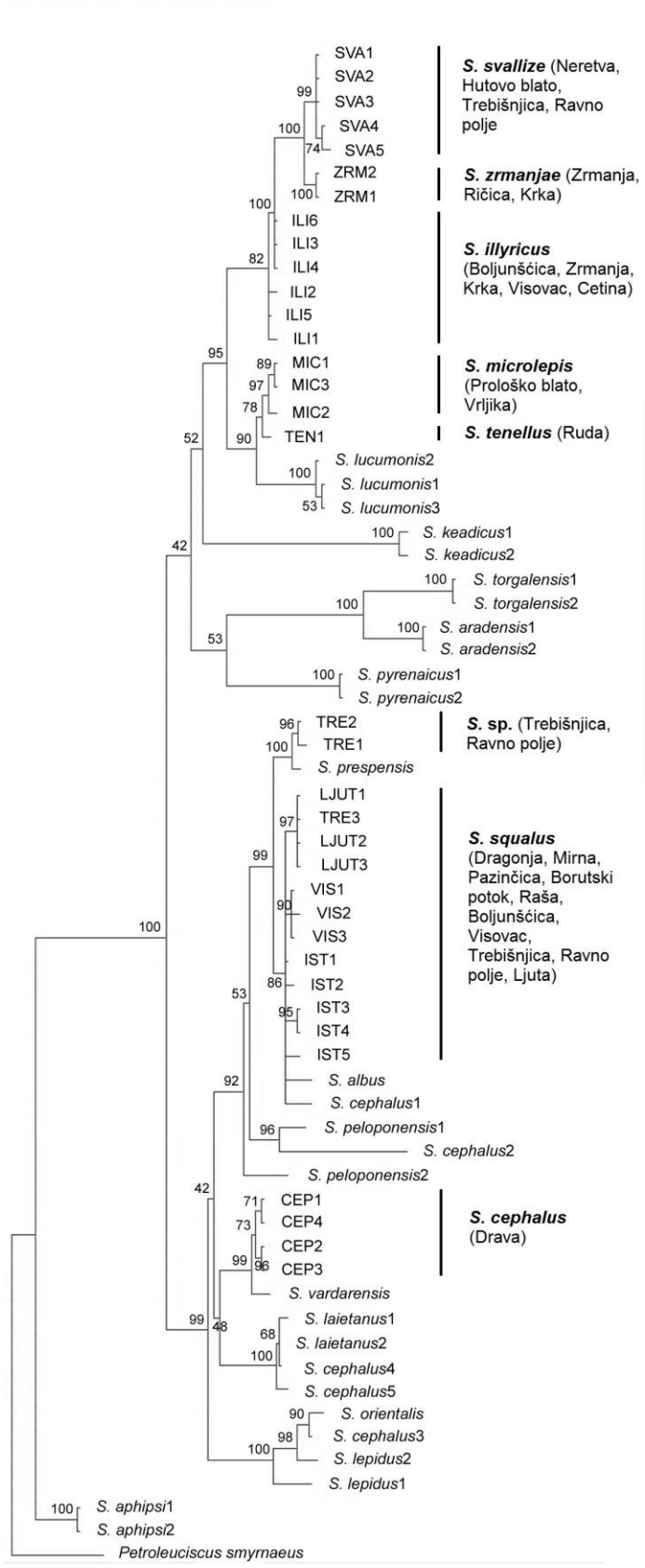
Filogenetička rekonstrukcija *cyt b* sekvenca dobivena ML metodom (Slika 29) napravljena je uz pomoć Tamura-Nei evolucijskog modela (TN93; Tamura i Nei, 1993.), koji je određen za najbolji evolucijski model s obzirom na uzorak, uz uključivanje dijela nevarijabilnih mjesta (+I; Shoemaker i Fitch, 1989.). Taj evolucijski model pretpostavlja nejednake frekvencije nukleotidnih baza i razlikuje tranzicijske od transverzijskih stopa. Evolucijske su stope modelirane uz pomoć diskretne gama-distribucije (+G).

Konsenzusno stablo iz grupe najboljih analiziranih stabala, uz pravilo 50%-tne većine i izuzeće prvih 25% generacija (burn-in), dobiveno BAY metodom prikazano je na Slici 30.

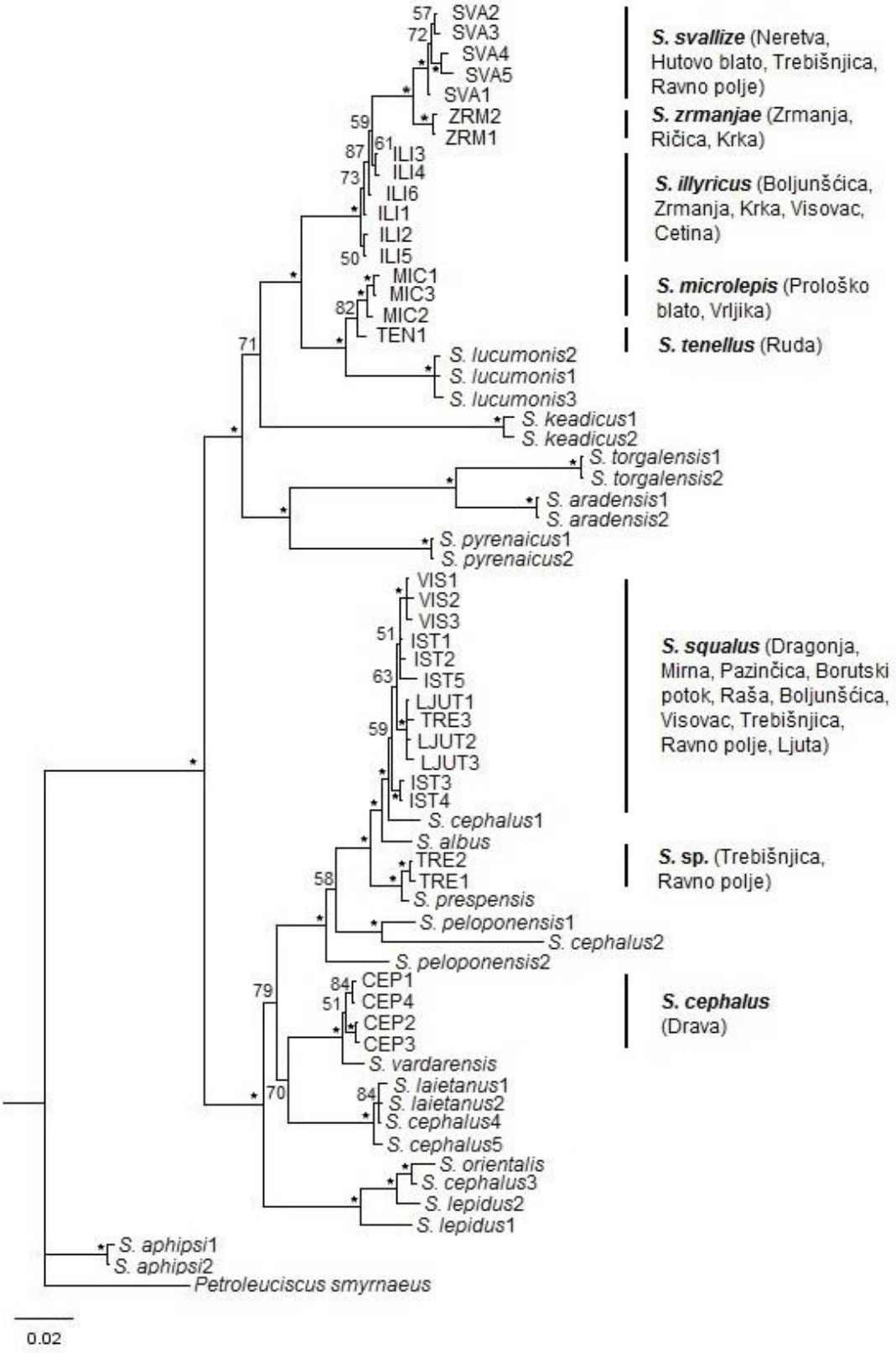
S ciljem dobivanja detaljnijeg uvida u filogenetičke odnose na populacijskoj razini izrađene su filogenetičke mreže metodom statističke parsimonije i udruživanja medijanskih vektora (MJ). Filogenetička mreža *cyt b* gena dobivena udruživanjem medijanskih vektora prikazana je na Slici 31, dok je mreža dobivena pomoću statističke parsimonije uz 95%-tnu granicu povezivanja prikazana na Slici 32.



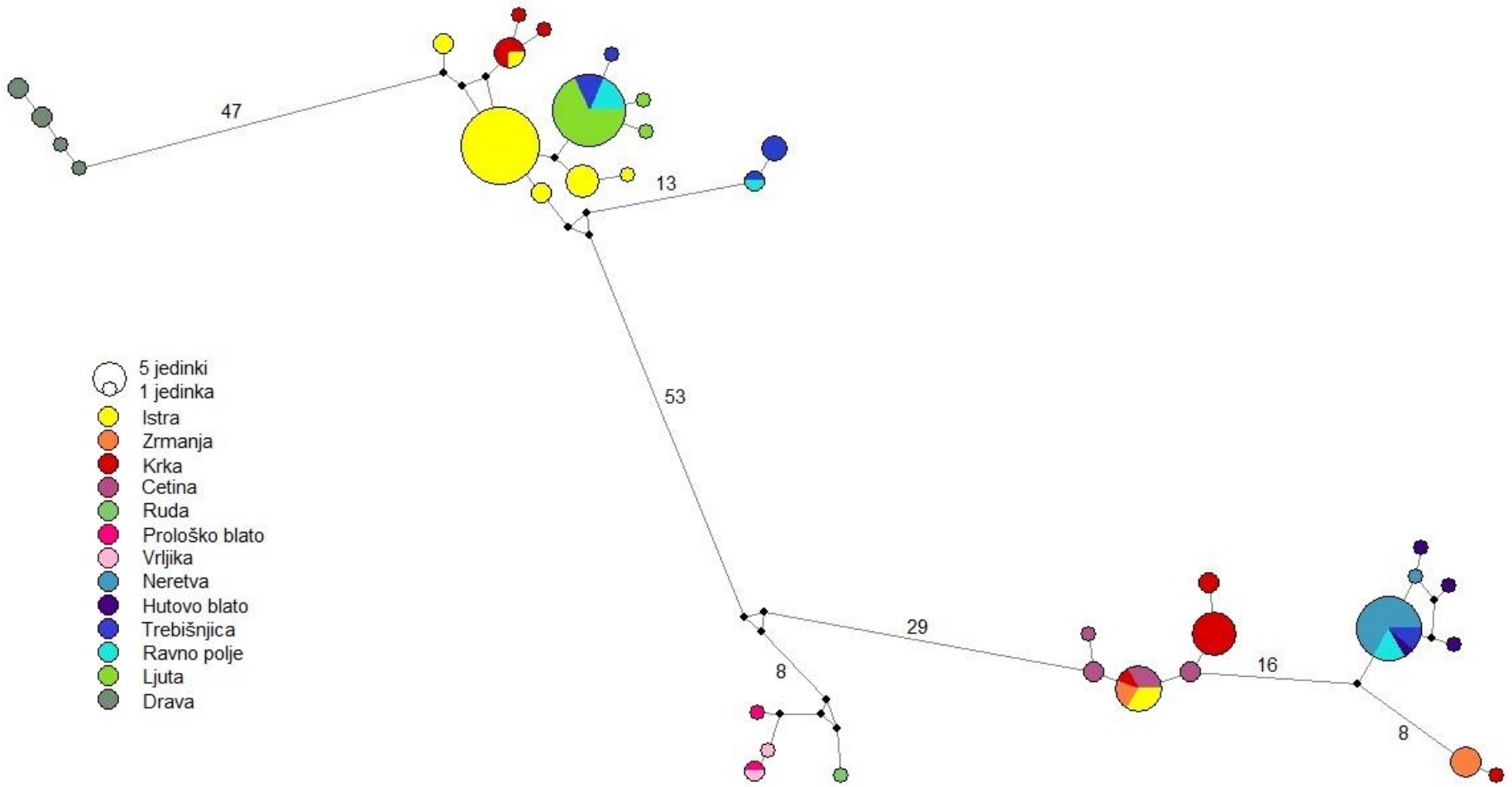
Slika 28. Filogram dobiven MP metodom na temelju cyt *b* sekvenca iz prvog skupa podataka Na grananjima uz čvorove upisane su vrijednosti podržanosti (broj replikanata = 1 000). Uz haplotipove navedene su i odgovarajuće vrste uz lokalitete u zagradi.



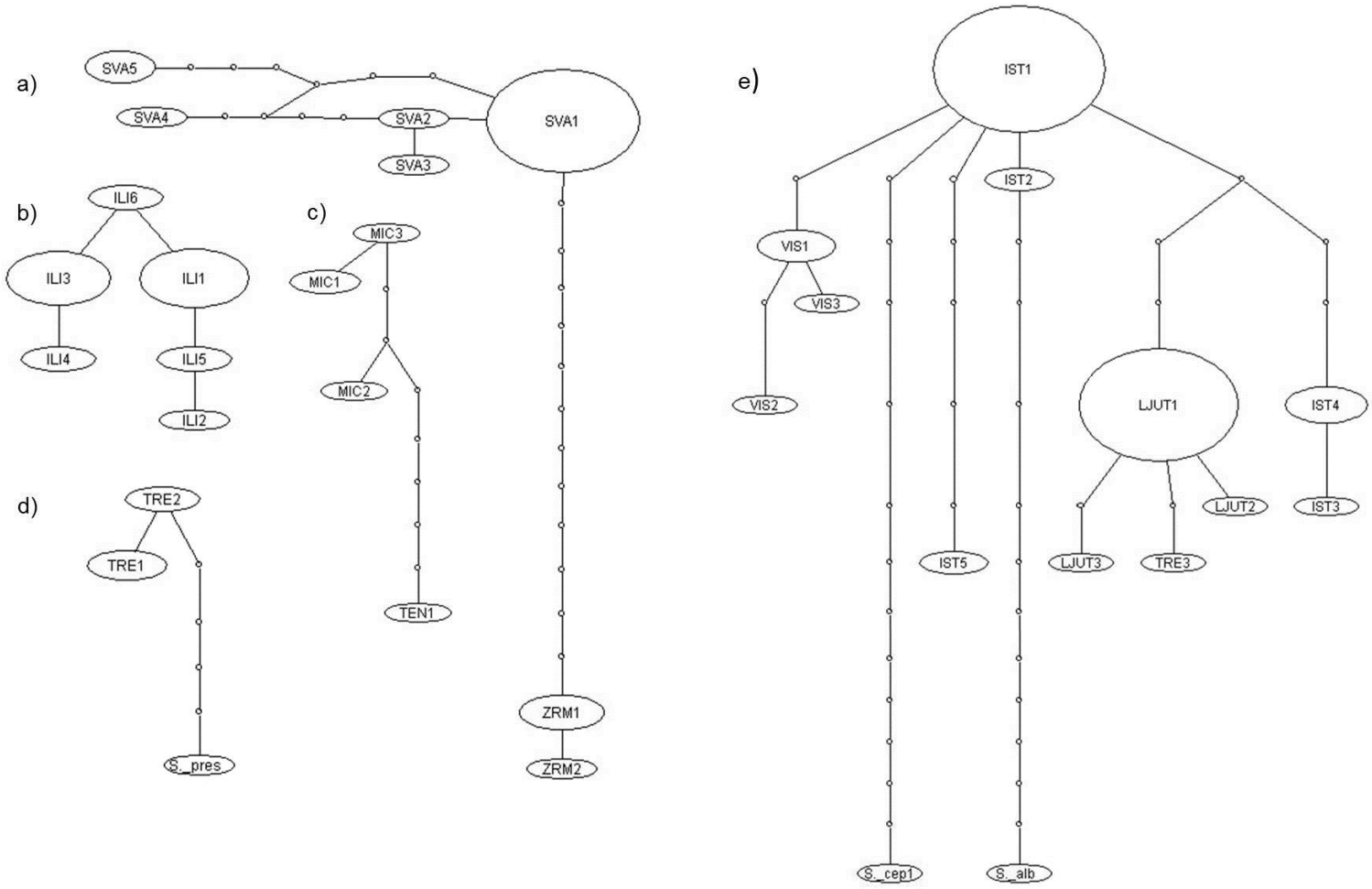
Slika 29. Filogram dobiven ML metodom iz prvog skupa podataka sekvenca *cyt b* gena Na grananjima uz čvorove upisane su vrijednosti podržanosti (broj replikanata = 1 000). Uz istraživane haplotipove navedene su odgovarajuće vrste uz lokalitete u zagradi.



Slika 30. Filogram dobiven BAY metodom na temelju prvog skupa sekvenca *cyt b* gena Vrijednosti uz čvorove predstavljaju njihovu posteriornu vjerojatnost (*=100%). Uz obilježene haplotipove navedene su odgovarajuće vrste uz lokalitete u zagradi.



Slika 31. Filogenetička mreža istraživanih klenova dobivena MJ metodom iz prvog skupa podataka *cyt b* gena
Crnim točkama predstavljeni su medijanski vektori. Crni brojevi iznad linija prikazuju broj mutacija između vrsta (prikazano > 5 mutacija).



Slika 32. Filogenetička mreža dobivena metodom statističke 95 %-tne parsimonije na temelju *cyt b* sekvenca za sve istraživane populacije Prikazane su jadranske populacije *Squalius* vrsta: a) *S. svallize – S. zrmanjae*, b) *S. illyricus*, c) *S. microlepis – S. tenellus*, d) *S.* sp. TR/RA, e) *S. squalus*. Haplotipovi iz banke gena obilježeni su prvim slovima odgovarajuće vrste i rednim brojem. Veličina ovala odgovara zastupljenosti haplotipa, dok kružići predstavljaju mutaciju. Značenje kratica: pres - *prespensis*, cep - *cephalus*, alb - *albus*

4.3.2. Filogenetička rekonstrukcija prema jezgrinim genskim biljezima

Gen za rodopsin

Filogenetička rekonstrukcija sekvenca *rhod* gena rađena je na temelju 782 nukleotidna mjesta (158 sekvenca; drugi skup podataka; Tablica 7). Na ukupno 37 haplotipova (uključujući i sekvence iz banke gena i vanjske grupe) dobiveno je 667 nevarijabilnih i 115 varijabilnih mjesta, od kojih je 26 parsimonijski informativno.

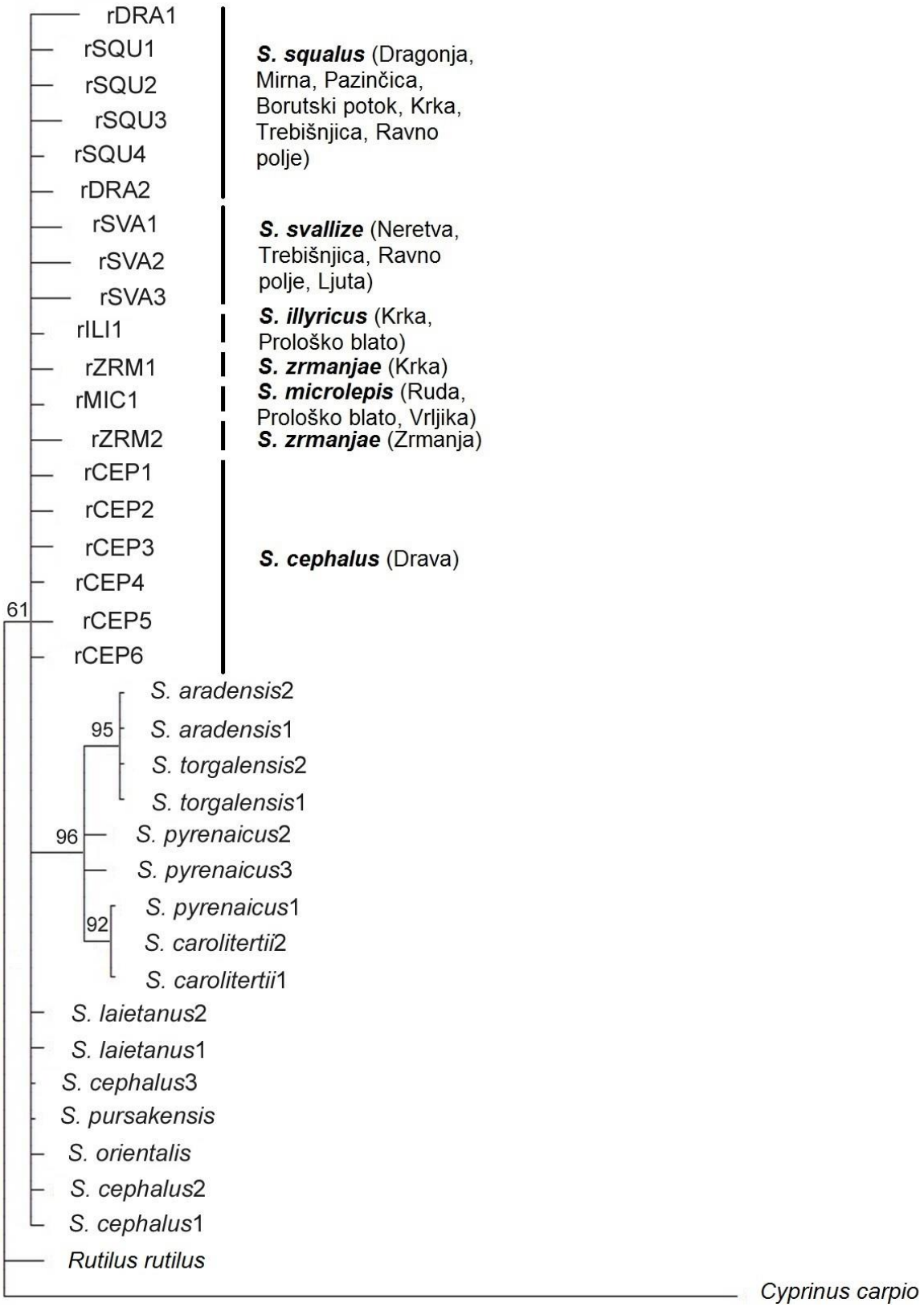
Analizom najveće parsimonije iz podataka jezgrinog *rhod* gena dobiveno je filogenetičko stablo dužine 131. Indeks konzistencije (CI) iznosio je 0,9313, CI bez neinformativnih značajki (uključena samo varijabilna mjesta) iznosio je 0,7805, indeks homoplazije (HI) iznosio je 0,0687, dok je HI bez neinformativnih značajki iznosio 0,2915, indeks retencije (RI) je 0,9174, a reskalirani indeks konzistencije (RC) je 0,8544.

Filogram dobiven na temelju MP metode prema sekvencama jezgrinog gena za rodopsin (drugi skup podataka) prikazan je na Slici 33.

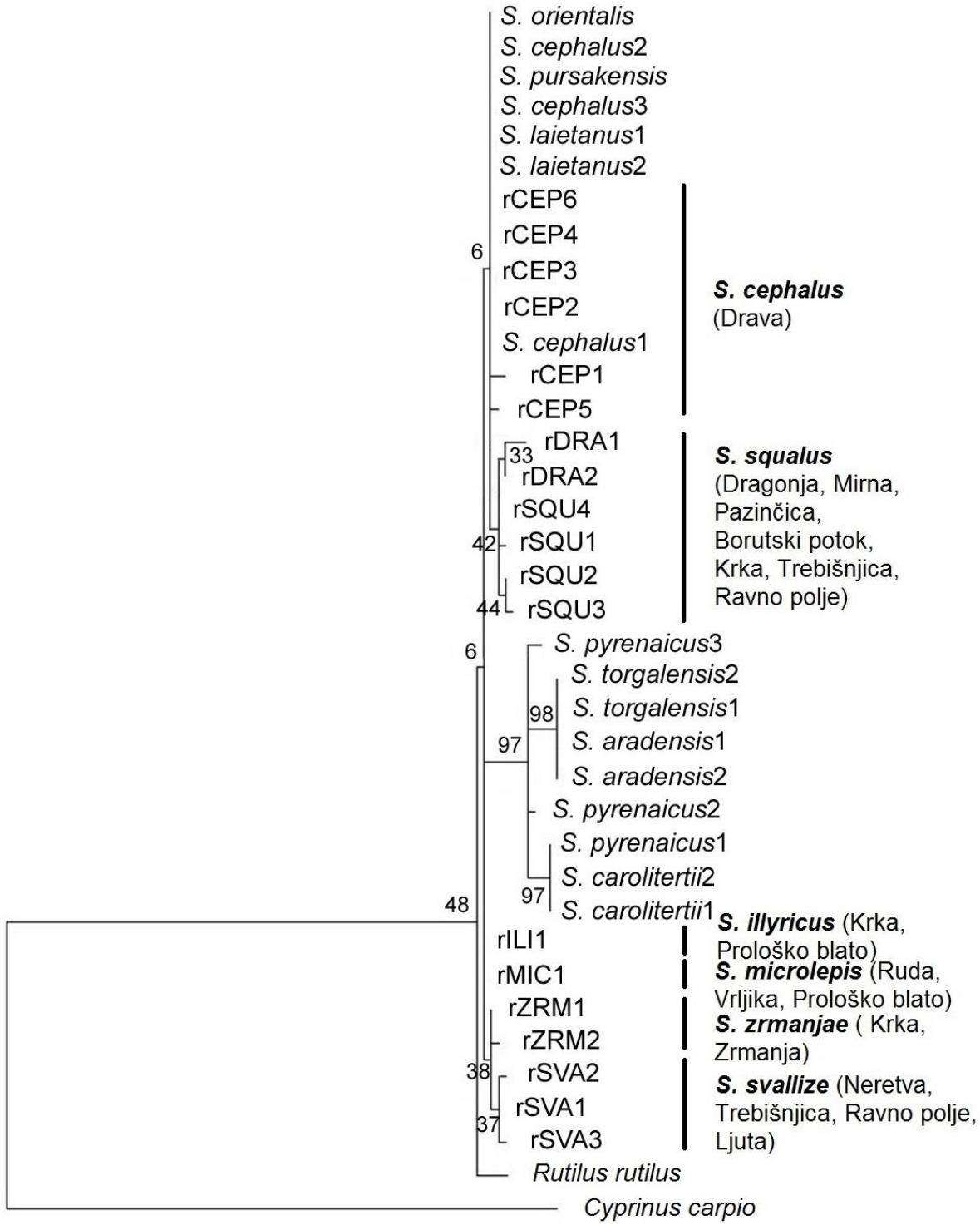
Kod primjene ML metode koristio se Kimura-2 parametar koji se pokazao kao najbolji evolucijski model (K2; Kimura, 1980.) u odnosu na uočene podatke. Ovaj model uzima u obzir jednaku frekvenciju pojavljivanja nukleotida, razlikovanje tranzicijske i transverzijske supstitucijske stope i nejednaku evolucijsku stopu među nukleotidima. Evolucijske su stope modelirane uz pomoć gama-distribucije (+G). Filogram dobiven metodom samopodržanja na 1 000 replikanata prikazan je na Slici 34.

Konsenzusno stablo iz grupe najboljih analiziranih stabala, uz pravilo 50%-tne većine i izuzeće prvih 25% generacija (burn-in), dobiveno BAY metodom prikazano je na Slici 35.

Filogenetička mreža jezgrinog *rhod* gena dobivena udruživanjem medijanskih vektora prikazana je na Slici 36, dok je mreža konstruirana metodom 95 %-tne statističke parsimonije prikazana na Slici 37.

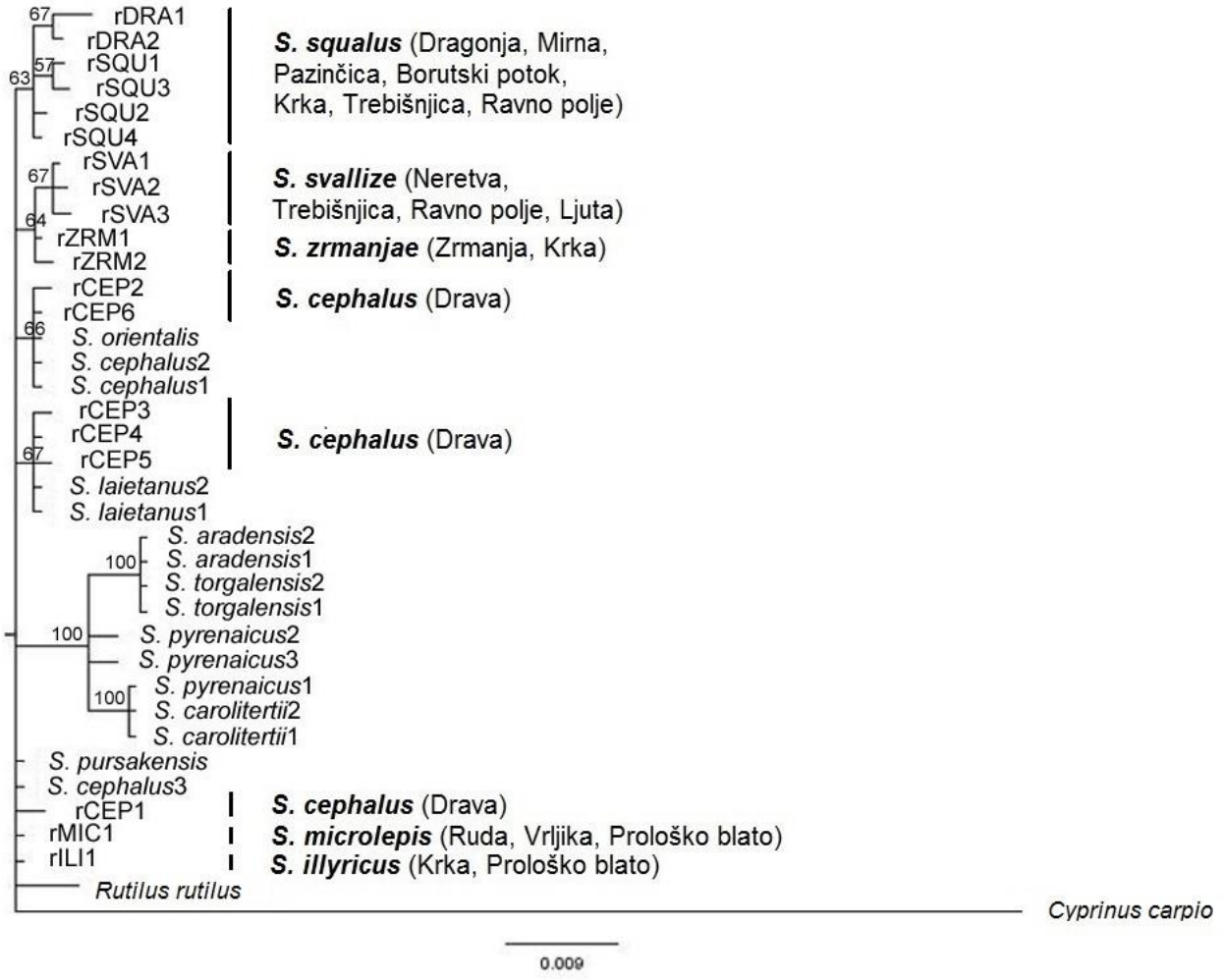


Slika 33. Filogram dobiven MP metodom na temelju jezgrinog *rhod* gena (drugi skup podataka)
Na grananjima uz čvorove upisane su vrijednosti podržanosti (broj replikanata = 1 000). Uz haplotipove pridružene su odgovarajuće vrste i u zagradi lokaliteti.

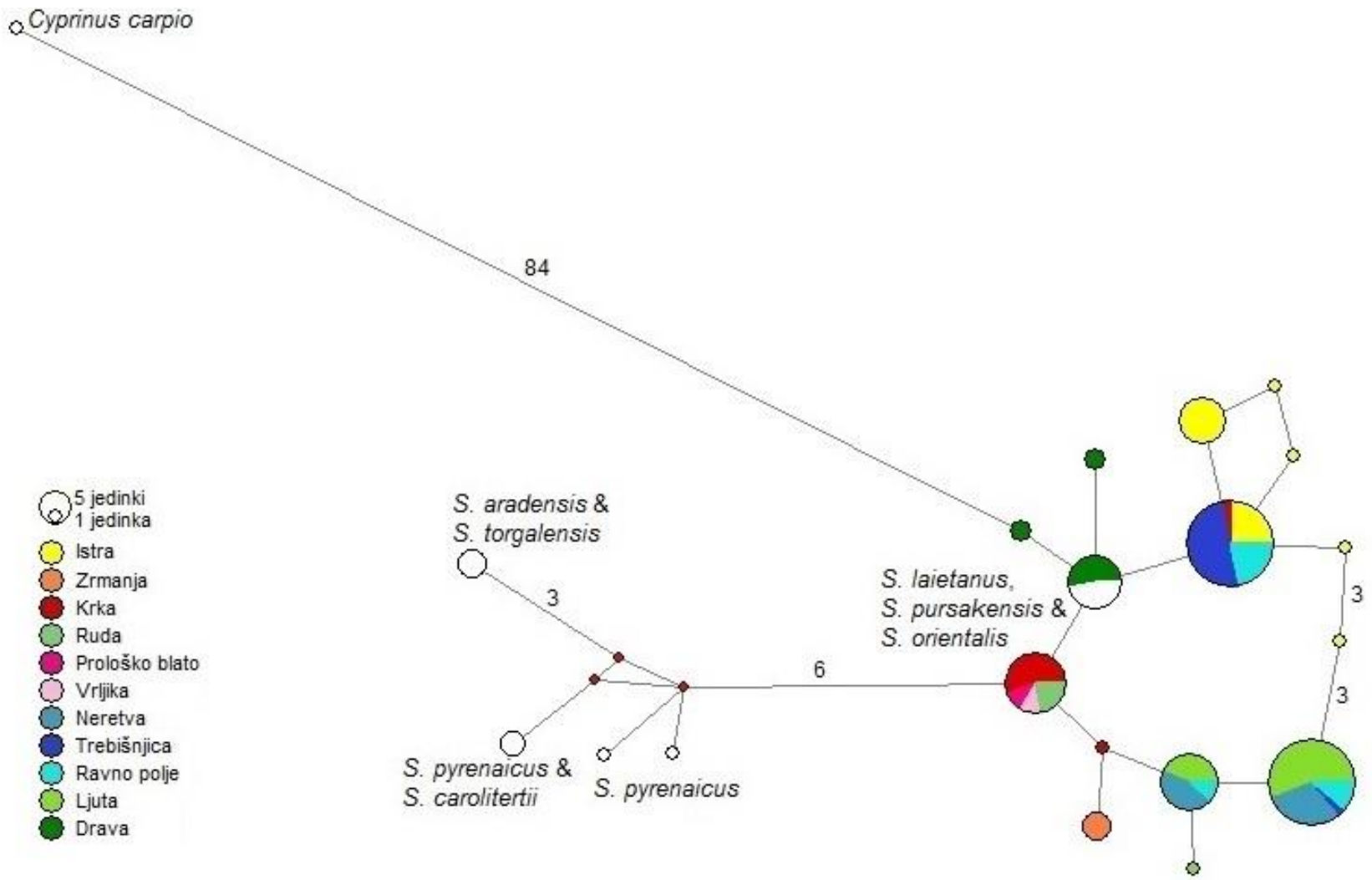


Slika 34. Filogram prema genu za rodopsin (drugi set podataka) dobiven putem ML metode na 1 000 replikanata

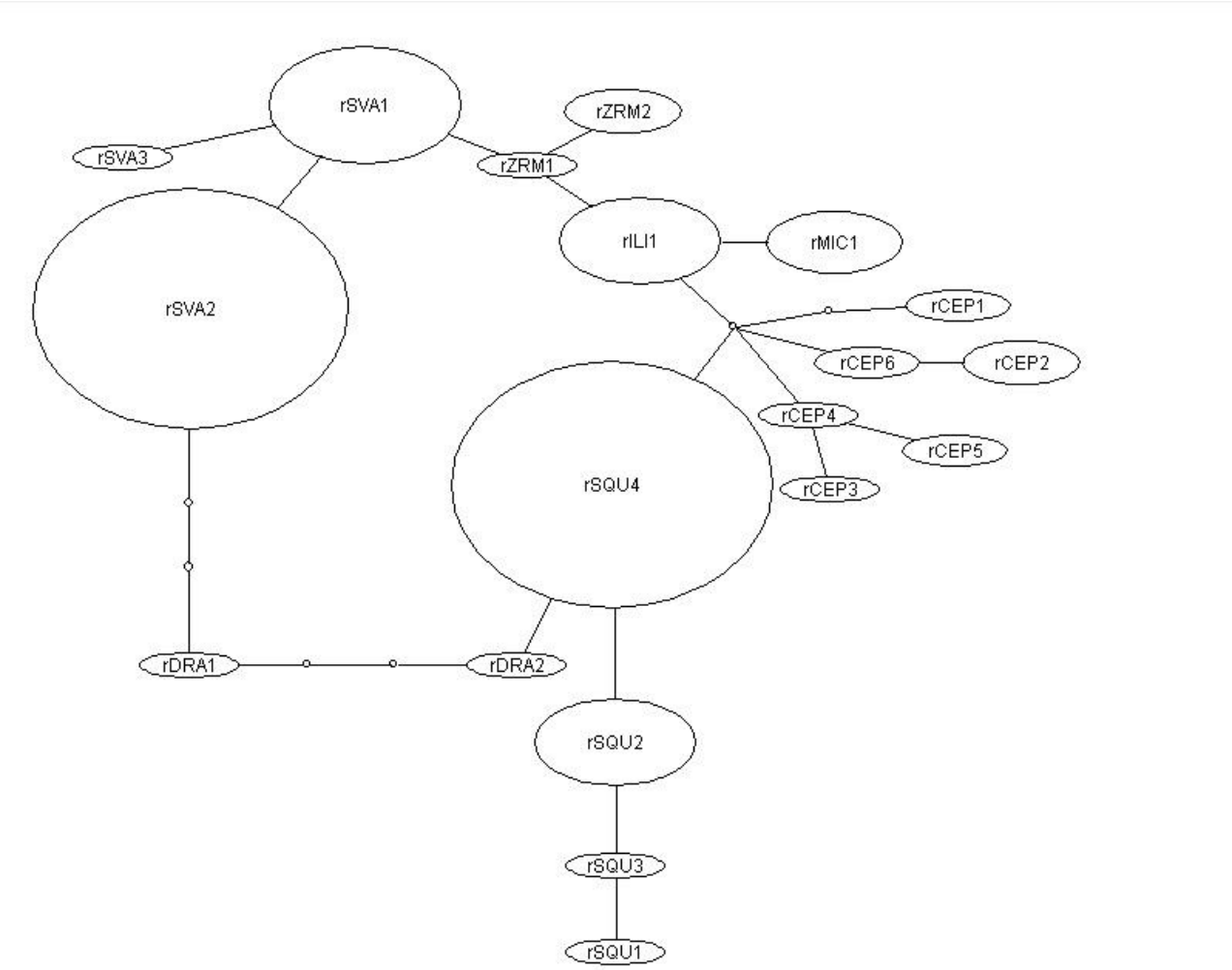
Uz odgovarajuće čvorove prikazane su podržanosti. Sa strane su uz haplotipove pridružene odgovarajuće vrste zajedno s lokalitetima na kojima su haplotipovi pronađeni (u zagradi).



Slika 35. Filogram prema genu za rodopsin dobiven pomoću BAY metode
Uz čvorove su pridružene odgovarajuće posteriorne vjerojatnosti.



Slika 36. Filogenetička mreža jezgrinog gena za rodopsin izračunata uz pomoć medijanskih vektora (MJ metoda)
Crne točke predstavljaju medijanske vektore. U slučaju više od dviju mutacija crnim brojevima prikazan je broj mutacija na grani.



Slika 37. Filogenetička mreža 95%-tne statističke parsimonije sekvenca jezgrinog gena za rodopsin istraživanih klenova jadranskog slijeva U obzir su uzete i dodatne sekvence iz Drave. Veličina ovala predstavlja zastupljenost haplotipova, dok kružići predstavljaju neprimijećene haplotipove.

Gen za aktivaciju rekombinacije

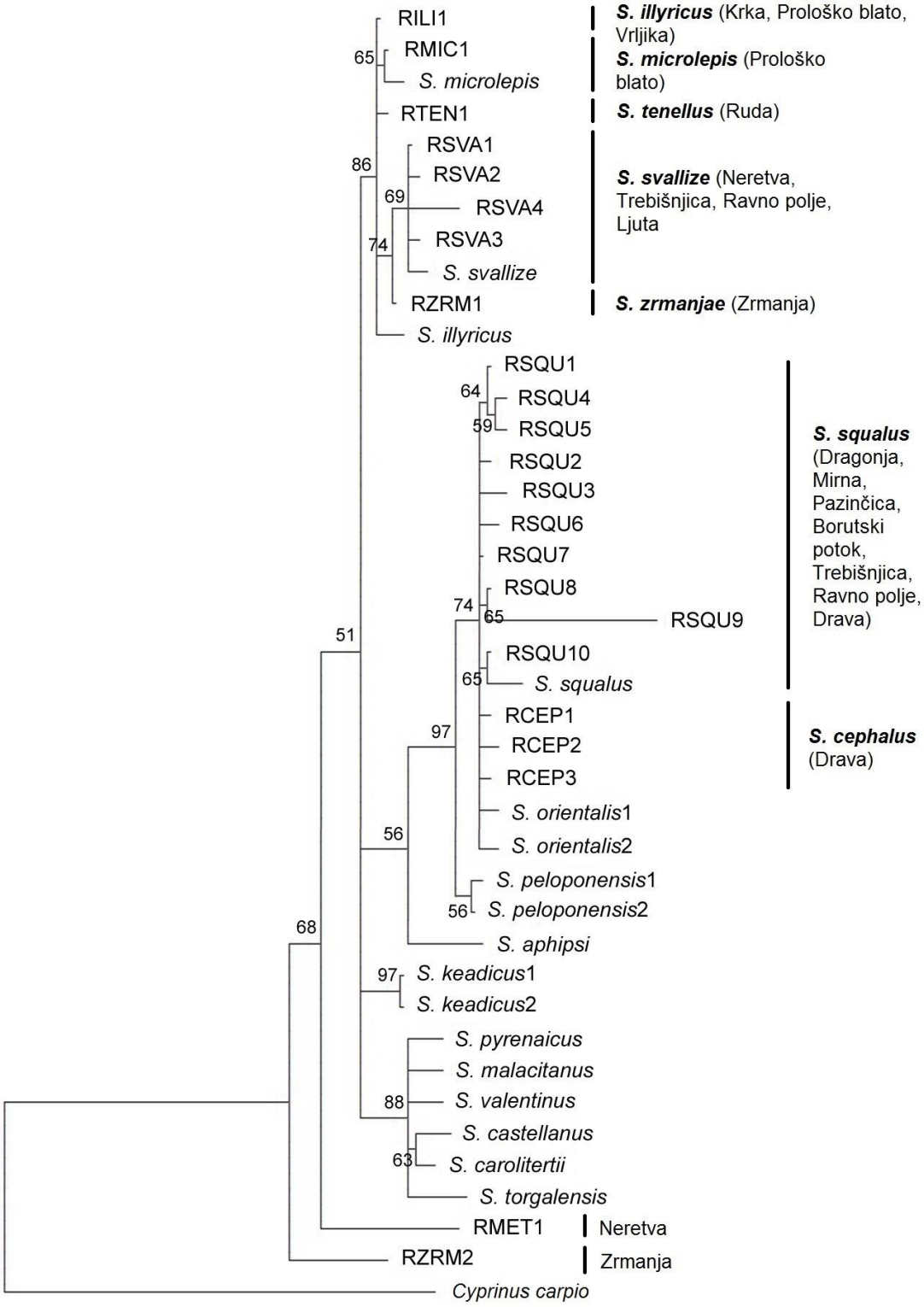
Filogenetička rekonstrukcija prema sekvencama jezgrinog *rag1* gena rađena je na 136 sekvenca (treći skup podataka) veličine 1443 nukleotidna mjesta (Tablica 8). Analiziran je 41 haplotip (zajedno sa sekvencama iz banke gena i vanjskom grupom) i dobivena su 1243 nevarijabilna mjesta i 150 varijabilnih mjesta, od kojih je 50 parsimonijski informativno.

Analizom najveće parsimonije iz podataka jezgrinog *rag1* gena dobiveno je filogenetičko stablo dužine 245 (Slika 38). Indeks konzistencije (CI) iznosio je 0,8571, CI bez neinformativnih značajki (uključena samo varijabilna mjesta) iznosio je 0,6023, indeks homoplazije (HI) iznosio je 0,1429, dok je HI bez neinformativnih značajki iznosio 0,3977, indeks retencije (RI) je 0,8961, a reskalirani indeks konzistencije (RC) je 0,7681.

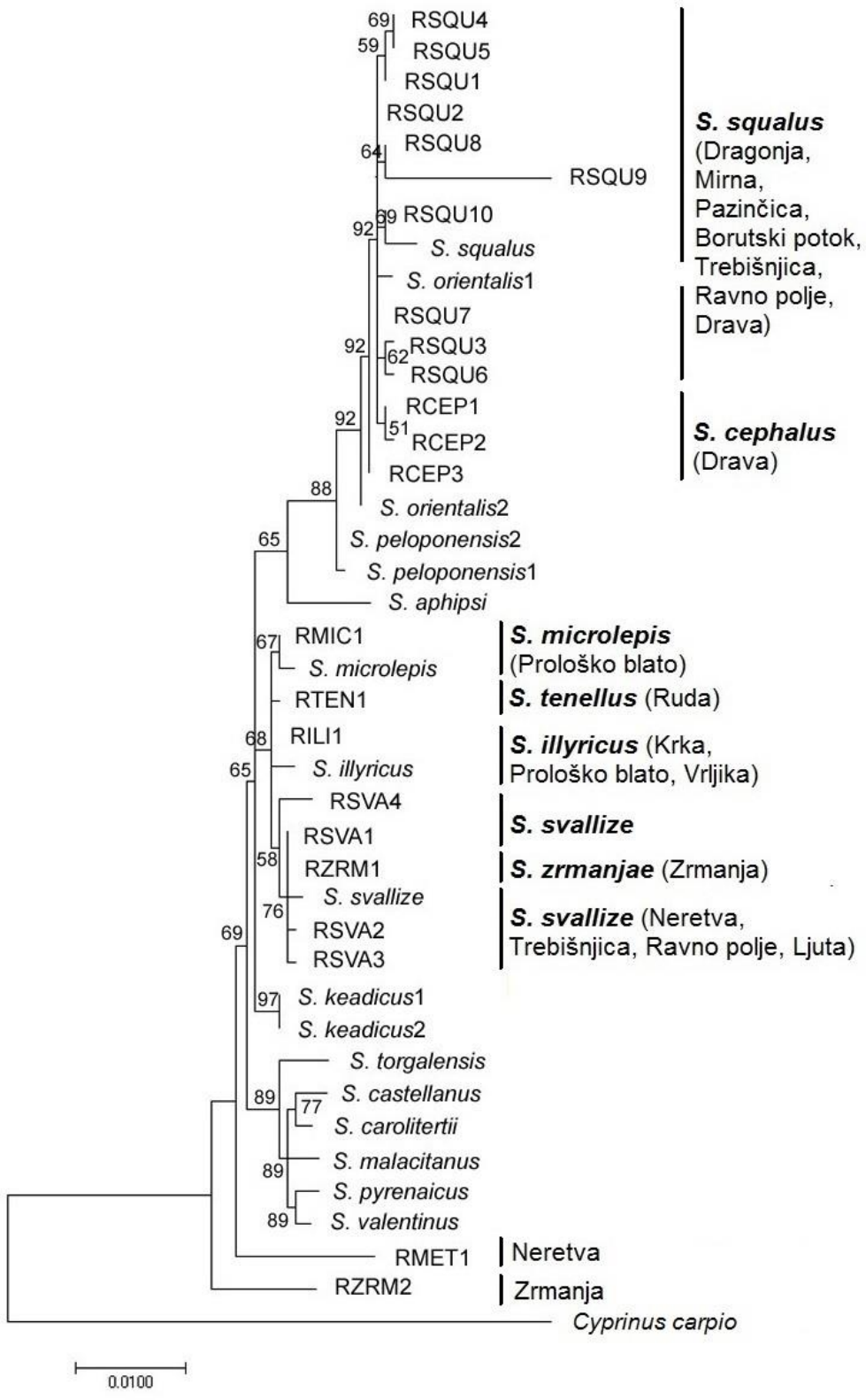
Za filogenetičku rekonstrukciju ML metodom koristio se Kimura-2 parametar koji se pokazao kao najbolji evolucijski model (K2; Kimura, 1980.) u odnosu na uočene podatke - koji podrazumijeva jednaku frekvenciju nukleotida, razlikovanje tranzicijske i transverzijske supstitucijske stope te nejednaku evolucijsku stopu između nukleotida. Evolucijske su stope modelirane uz pomoć gama-distribucije (+G). Filogram prema sekvencama jezgrinog *rag1* gena dobiven je metodom samopodržanja na 1 000 replikanata (Slika 39).

Konsenzusno stablo iz grupe najboljih analiziranih stabala, uz pravilo 50%-tne većine i izuzeće prvih 25% generacija (burn-in), dobiveno BAY metodom prikazano je na Slici 40.

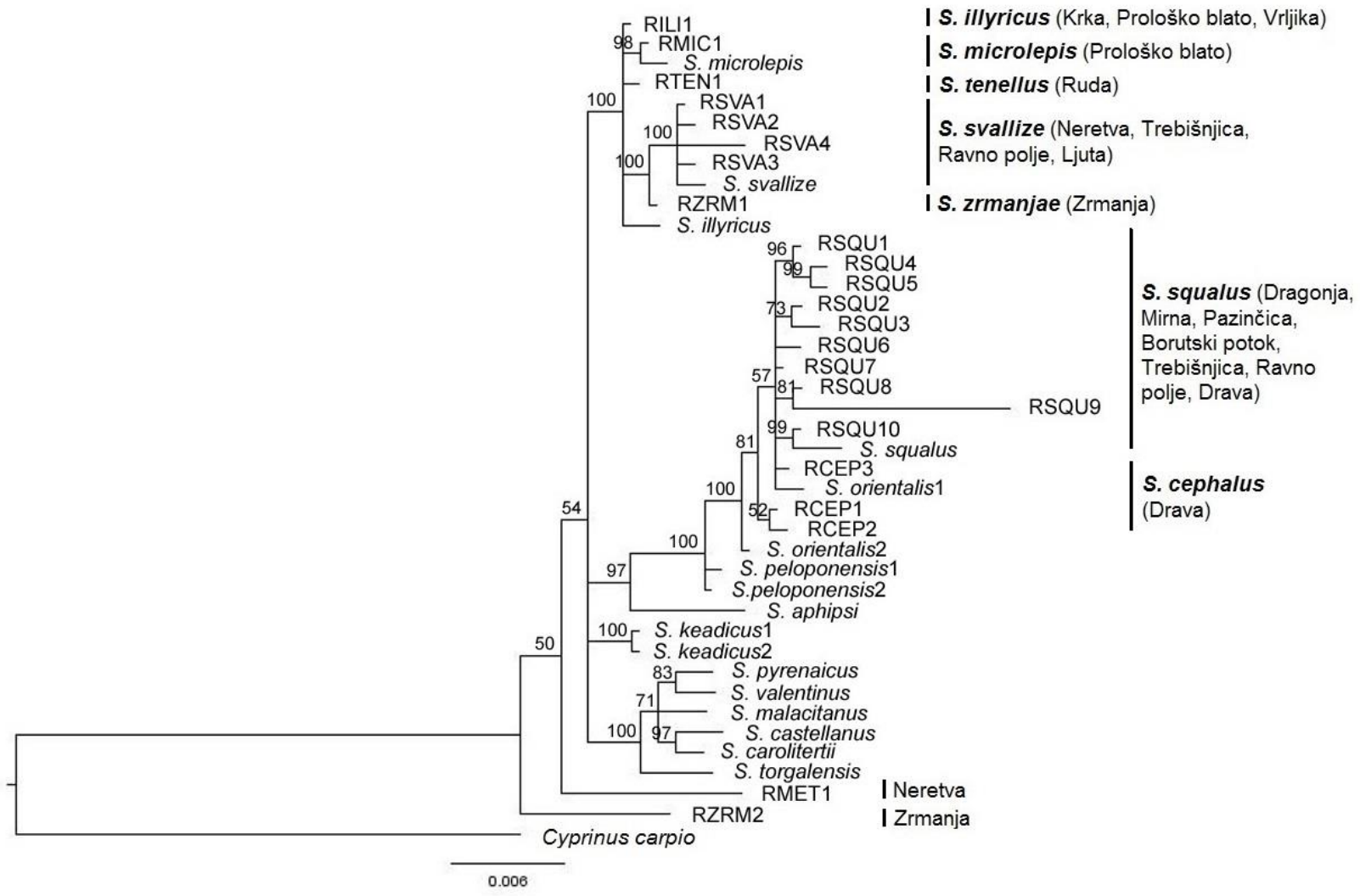
Filogenetička mreža prema jezgrinom *rag1* genu dobivena putem medijanskog udruživanja prikazana je na Slici 41, dok je mreža 95%-tnog statističkog parsimonijskog povezivanja prikazana na Slici 42.



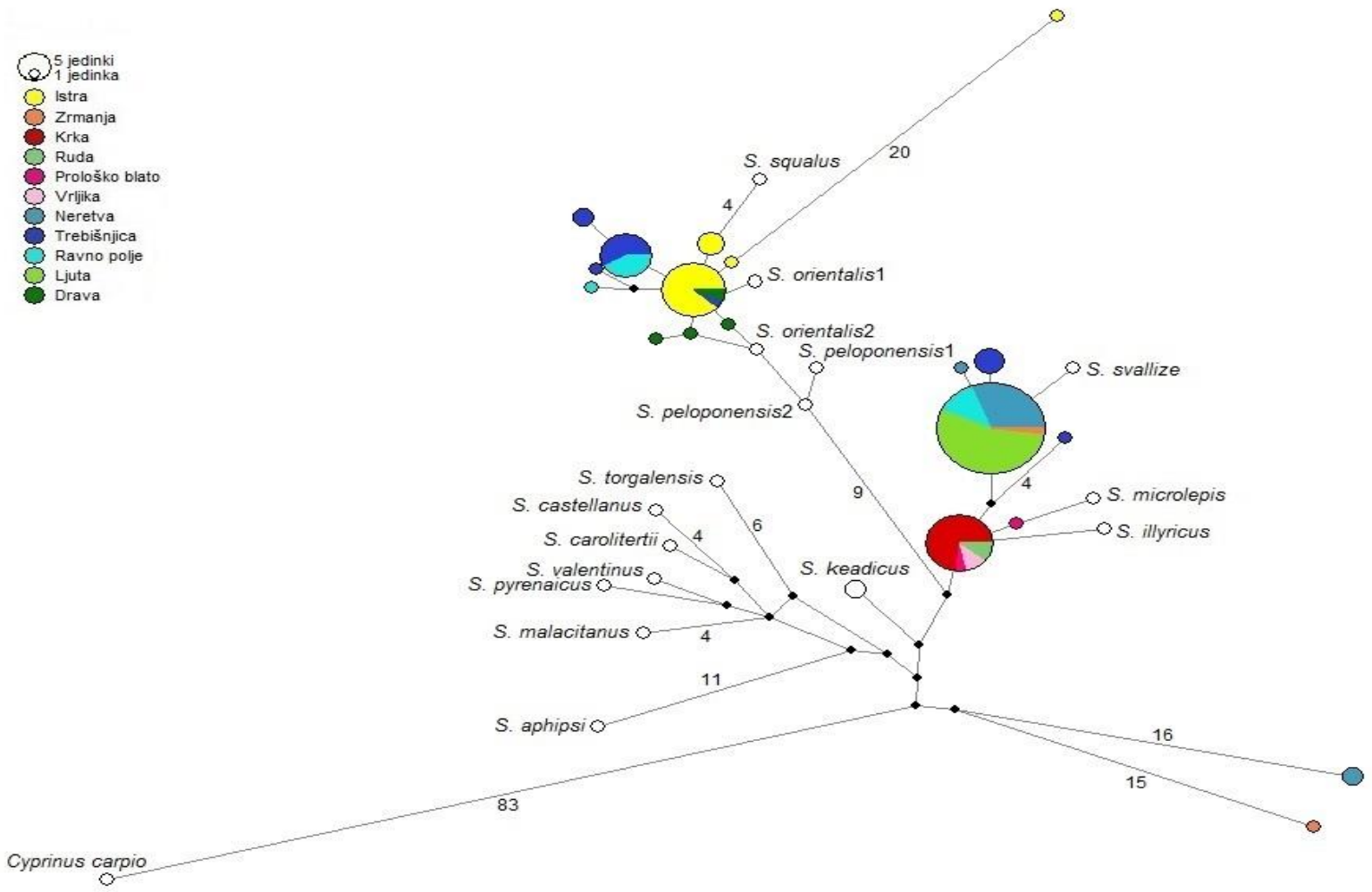
Slika 38. Filogram dobiven MP metodom prema jezgrinom *rag1* genu (treći skup podataka) Vrijednosti uz odgovarajuće čvorove prikazuju podržanosti (1 000 replikanata). Uz haplotipove navedene su odgovarajuće vrste i lokaliteti pronalaska (uz nerazriješene haplotipove pridruženi su samo lokaliteti).



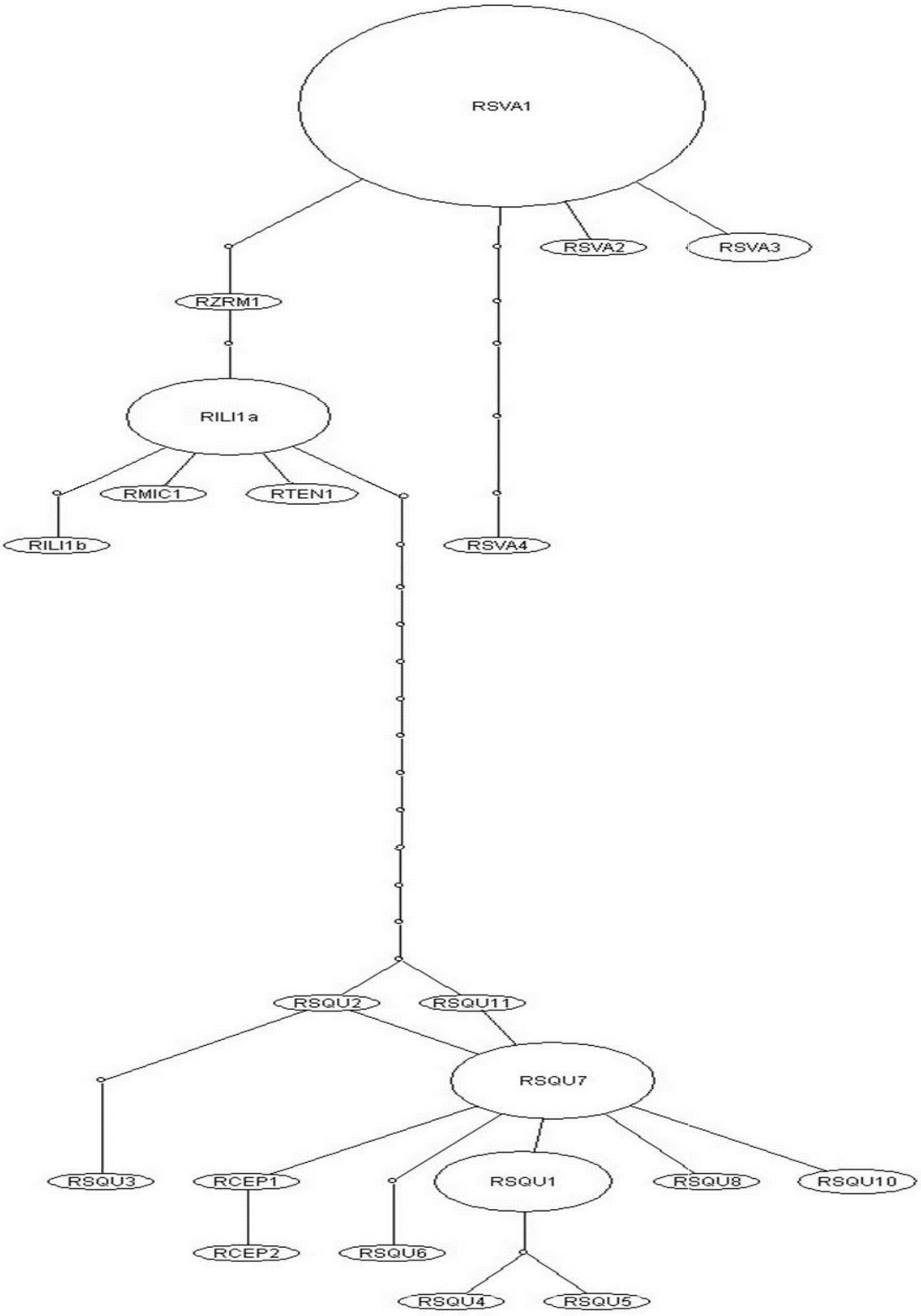
Slika 39. ML filogram prema jezgrinom *rag1* genu
Vrijednosti samopodržanja prikazane su uz odgovarajuće čvorove (1 000 replikanata). Uz odgovarajuće razriješene haplotipove pridružene su vrste i lokaliteti, dok su za nerazriješene haplotipove navedeni samo lokaliteti pronalaska.



Slika 40. Konsenzusno stablo dobiveno pomoću BAY metode prema jezgrinom *rag1* genu (treći skup podataka)
Uz čvorove su prikazane vrijednosti posteriorne vjerojatnosti.



Slika 41. Filogenetička mreža prema jezgrinom *rag1* genu (treći skup podataka) dobivena pomoću medijanskih vektora
Neobilježeni manji crveni kružići predstavljaju medijanske vektore. Broj mutacija prikazan je iznad grana crvenim brojem ukoliko je bilo više od triju mutacija.



Slika 42. Filogenetička mreža 95%-tne statističke parsimonije prema jezgrinom *rag1* genu (treći skup podataka)
Veličina ovala predstavlja zastupljenost haplotipova, dok kružići predstavljaju nezabilježene haplotipove.

Intron jezgrinog gena za ribosomalni protein S7

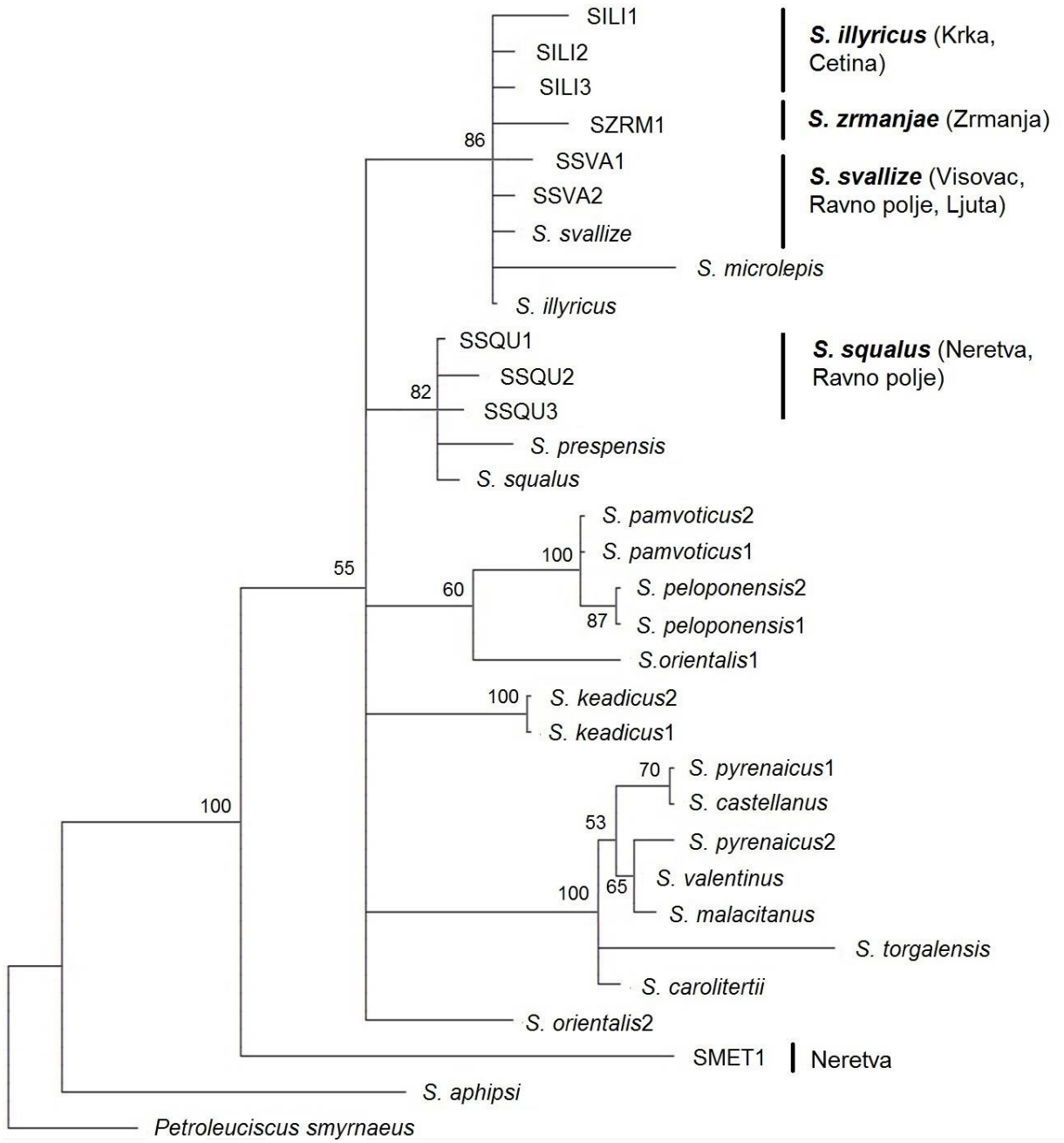
Filogenetička rekonstrukcija rađena je na temelju 48 sekvenca, zajedno sa sekvencama iz banke gena i vanjskom grupom, gdje su ukupno dobivena 32 haplotipa (četvrti skup podataka; Tablica 9). Na ukupno 726 istraživanih nukleotidnih mjesta dobiveno je 588 nevarijabilnih i 85 varijabilnih mjesta, od kojih je 53 parsimonijski informativno.

Analizom najveće parsimonije iz sekvenca introna jezgrinog gena za S7 dobiveno je filogenetičko stablo dužine 171 (Slika 43). Indeks konzistencije (CI) iznosio je 0,8538, CI bez neinformativnih značajki (uključena samo varijabilna mjesta) iznosio je 0,6951, indeks homoplazije (HI) iznosio je 0,1462, dok je HI bez neinformativnih značajki iznosio 0,3049, indeks retencije (RI) je 0,8980, a reskalirani indeks konzistencije (RC) je 0,7667.

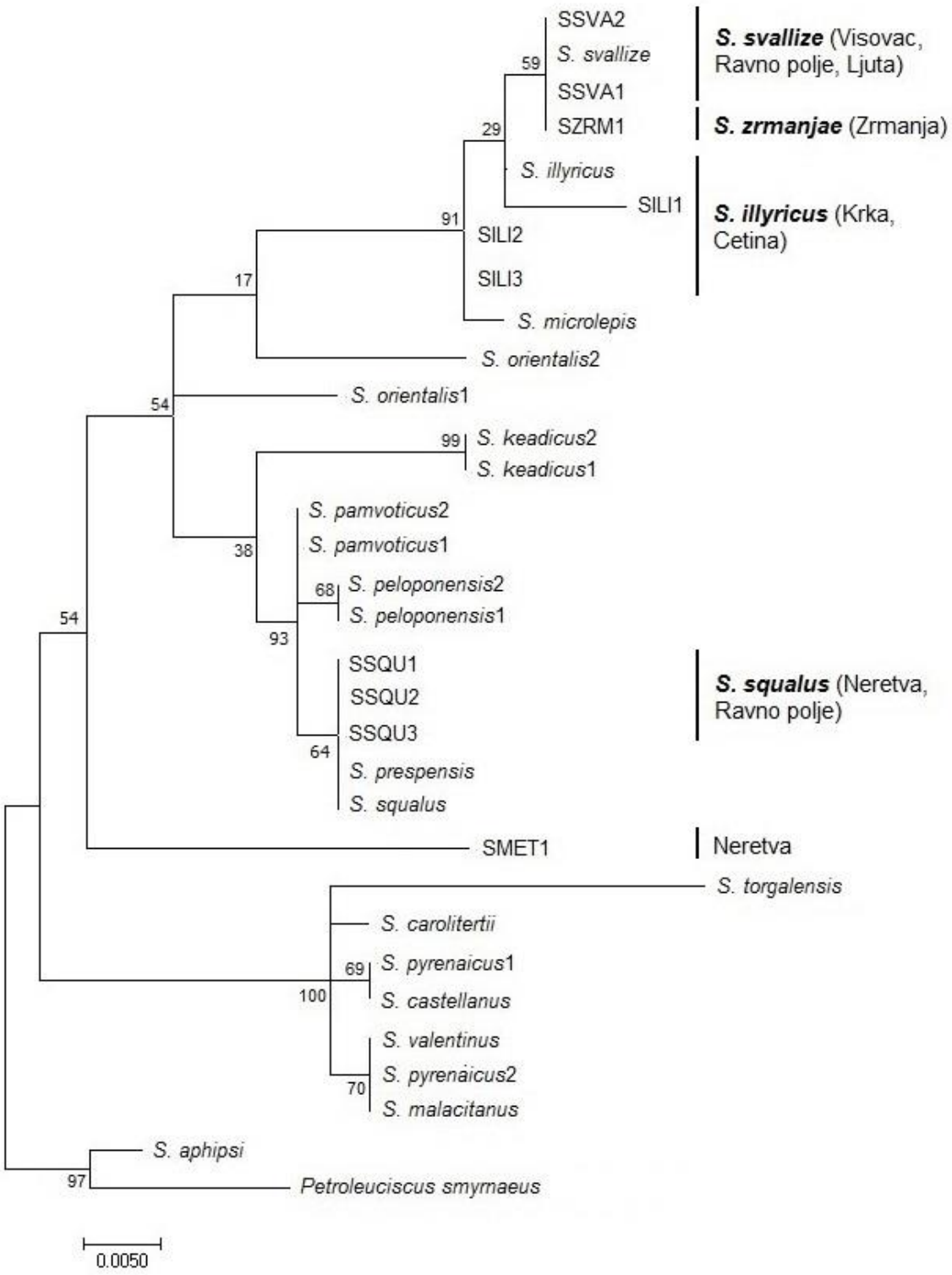
Tijekom ML metode, kao najbolji evolucijski model u odnosu na uočene podatke, koristio se Tamura-3 parametar (T92; Tamura, 1992.). Ovaj model uzima u obzir razlikovanje tranzicijske i transverzijske supstitucijske stope i razlikovanje po sadržaju nukleotidnih G-C parova uz nejednaku evolucijsku stopu među nukleotidima. Evolucijske su stope modelirane uz pomoć gama-distribucije (+G). Filogram dobiven na temelju metode samopodržanja napravljenoj na 1 000 replikanata nakon ML metode prikazan je na Slici 44.

Konsenzusno stablo iz grupe najboljih analiziranih stabala, uz pravilo 50%-tne većine i izuzeće prvih 25% generacija (burn-in), dobiveno BAY metodom prikazano je na Slici 45.

Filogenetička mreža dobivena na temelju udruživanja medijanskih vektora iz sekvenca introna gena za S7 prikazana je na Slici 46, dok je mreža 95%-tne statističke parsimonije prikazana na Slici 47.

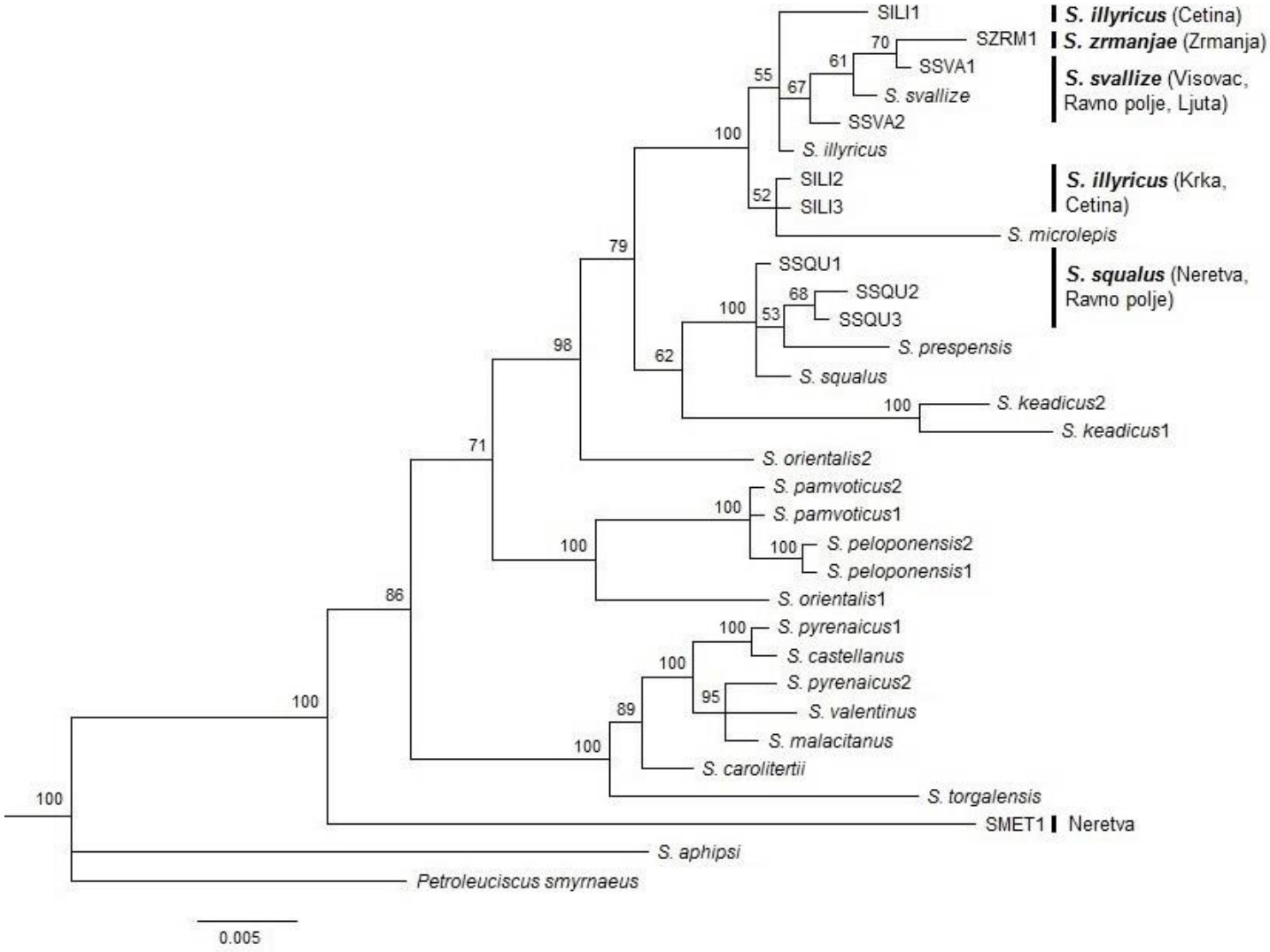


Slika 43. Filogram dobiven MP metodom prema sekvencama introna jezgrinog gena za S7 (četvrti skup podataka)
Vrijednosti uz odgovarajuće čvorove prikazuju podržanosti (1 000 replikanata). Uz haplotipove navedene su odgovarajuće vrste i lokaliteti pronalaska (uz nerazriješene haplotipove navedeni su samo lokaliteti).

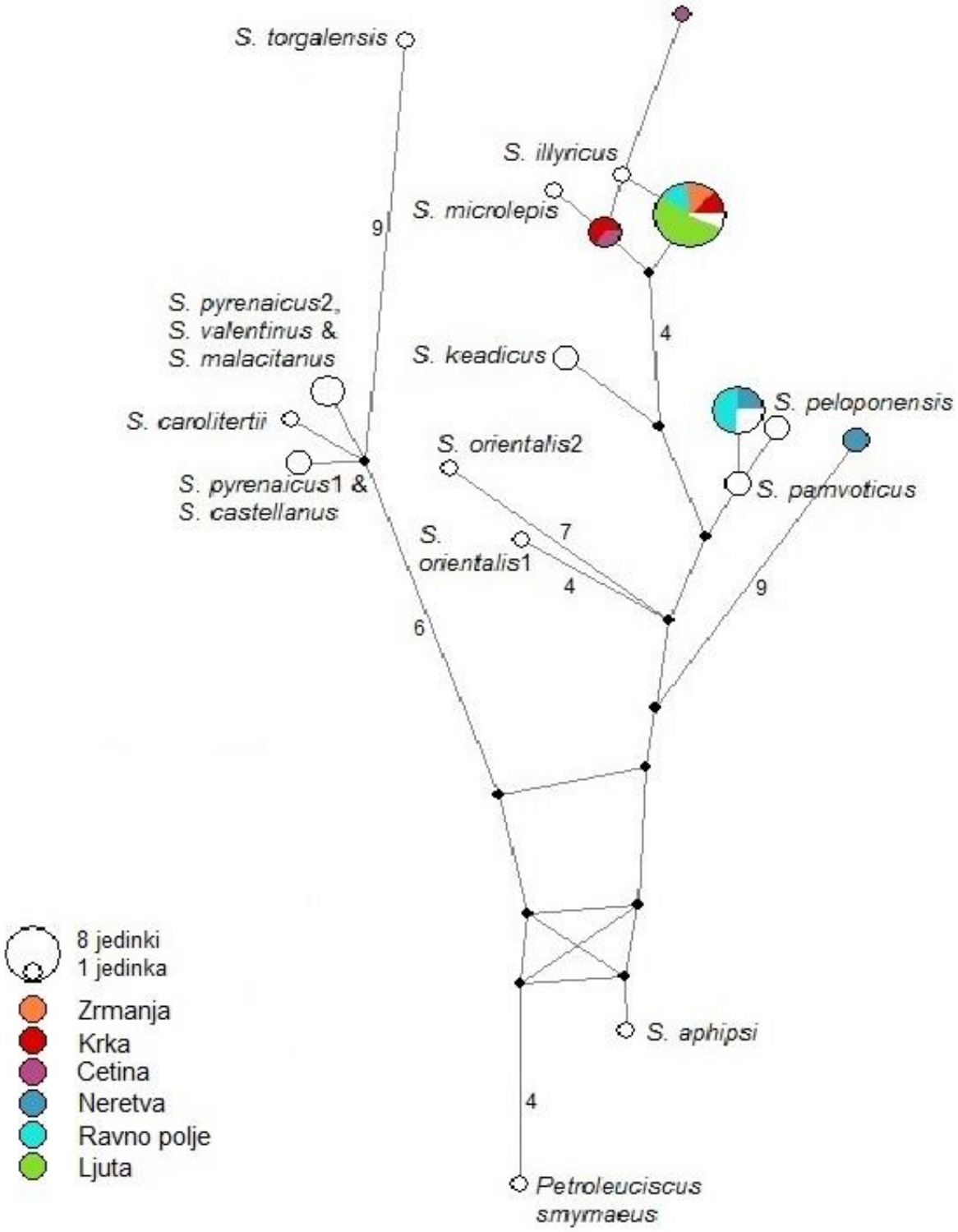


Slika 44. Filogram rekonstruiran ML metodom prema sekvencama introna jezgrinog gena za S7

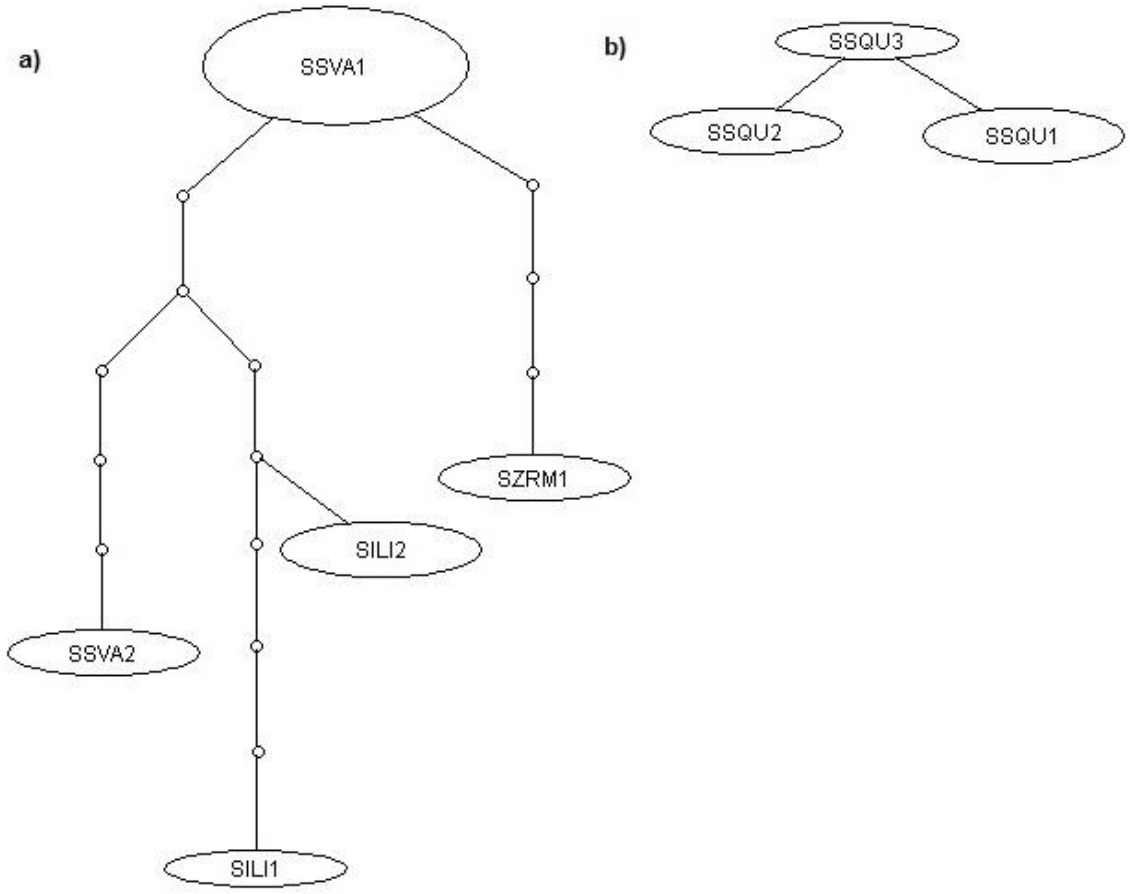
Vrijednosti podržanosti prikazane su uz odgovarajuće čvorove (1 000 replikanata). Uz odgovarajuće razriješene haplotipove navedene su vrste podebljanim slovima, dok su za nerazriješene haplotipove navedeni samo lokaliteti pronalaska.



Slika 45. Filogram BAY analize prema intronu jezgrinog gena za S7 (četvrti skup podataka)
Uz čvorove su prikazane vrijednosti posteriorne vjerojatnosti.



Slika 46. Filogenetička MJ mreža introna gena za S7 istraživanih klenova jadranskog slijeva (četvrti skup podataka)
Neobilježeni manji crni kružići predstavljaju medijanske vektore. Broj mutacija prikazan je iznad grana crvenim brojem ukoliko je bilo više od triju mutacija.



Slika 47. Filogenetička mreža 95%-tne statističke parsimonije introna jezgrinog gena za S7 (četvrti skup podataka)
Veličina ovala predstavlja zastupljenost haplotipova, dok kružići predstavljaju nezabilježene haplotipove. Prikazane su populacije: a) *S. svallize – S. illyricus – S. zrmanjae* (mediteranska grupa), b) *S. squalus* (*S. cephalus* grupa).

4.3.3. Usporedba filogenetičke rekonstrukcije istraživanih genskih biljega

U usporedbi s jezgrinim biljezima mitohondrijski *cyt b* gen očekivano *je* pokazao značajno bolju filogenetičku razlučivost, s čak 9 puta većim postotkom parsimonijski informativnih mjesta (PI) od *rag1* i *rhod* gena, te s 4,5 puta većim postotkom PI od introna gena za S7 (Tablica 22). Osim toga, *cyt b* gen pokazao je puno niži indeks konzistencije. Zbog toga su filogenetički odnosi temeljeni na *cyt b* genu bolje razriješeni od istraživanih jezgrinih biljega.

Tablica 22. Dužina i filogenetička učinkovitost istraživanih genskih biljega
Značenje kratica: PI - parsimonijski informativna mjesta, Tv/Ts - odnos tranzicija i transverzija, MP - najveća parsimonija, CI - indeks konzistencije, HI - indeks homoplazije, RI - retencijski indeks

Gen	**Br. mjesta**	**PI (%)**	**Ts/Tv**	**Dužina MP stabla**	**CI**	**HI**	**RI**
cyt b	1140	320 (28%)	9,47	914	0,4967	0,5033	0,8533
rhod	810	26 (3%)	4,54	131	0,9313	0,0687	0,9174
rag1	1443	50 (3%)	1,92	245	0,8571	0,1429	0,8961
S7	911	53 (6%)	1,17	171	0,8538	0,1462	0,8980

Sve korištene metode filogenetičke rekonstrukcije dale su stabla slične topologije za pojedine genske biljege, dok su se stabla različitih gena razlikovala, posebice između mitohondrijskog *cyt b* gena i jezgrinih biljega. Prema *cyt b* genu haplotipovi jadranskih vrsta *Squalius* Hrvatske i BiH razdvojili su se na dvije veće filogenetičke grupe. Prva grupa obuhvaća haplotipove jadranskih vrsta *S. illyricus*, *S. zrmanjae*, *S. microlepis*, *S. tenellus* i *S. svallize*, uz haplotipove talijanske vrste *S. lucumonis*, grčke vrste *S. keadicus*, španjolske i portugalske vrste *S. torgalensis*, portugalske vrste *S. aradensis* te španjolskih vrsta *S. torgalensis* i *S. pyrenaicus*. Ova je grupa vrlo slična već opisanoj, tzv. mediteranskoj grupi (Perea i sur., 2010.). Unutar ove grupe sve su filogenetičke linije monofiletičkog porijekla. Vrsta *S. zrmanjae* sestrinska je vrsti *S. svallize*, dok je vrsta *S. microlepis* sestrinska vrsti *S. tenellus*. Zadnje dvije navedene vrste dijele zajedničkog pretka s vrstom *S. lucumonis* iz talijanskih rijeka jadranskog i sredozemnog slijeva (Reno, Arno, Tiber). U ovu su se grupu većinom smjestili jadranski haplotipovi iz Dalmacije i Hercegovine, obuhvaćajući haplotipove iz Neretve, Ravnog polja, Hutovog blata i Trebišnjice vrste *S. svallize*, haplotipove iz Zrmanje, Ričice i Krke vrste *S. zrmanjae*, haplotipove iz Prološkog blata i Vrljike vrste *S. microlepis* te jedan haplotip iz Rude vrste *S. tenellus*. Iznenađujući je pronalazak da isti haplotip tipičan za vrstu *S. illyricus* dijele sekvence iz Dalmacije (Cetina, Zrmanja i Krka) i istarske rijeke Boljunšćice. Osim navedenog haplotipa, unutar *S. illyricus* filogenetičke linije još se izdvajaju linije iz Krke (zajedno s Visovcem) i linije iz Cetine. Druga velika *S. cephalus* grupa obuhvaća jadranske haplotipove vrste *S. squalus* i crnomorske haplotipove vrste *S. cephalus* dodatnih uzoraka iz Drave (uz poznate haplotipove iz Francuske, Njemačke i Španjolske) te haplotipove iz Italije (*S. albus*), Grčke (*S. prespensis*, *S. peloponensis*, *S. vardarensis*), Španjolske (*S. laietanus*), Turske (*S. lepidus*) i Rusije (*S. orientalis*). Ova grupa odgovara u literaturi opisanoj *S. cephalus* grupi (Perea i sur., 2010.), iako ne u potpunosti. Neki odnosi unutar ove grupe nisu potpuno u skladu s dosadašnjom

taksonomijom. Svi su se istarski haplotipovi, uz haplotipove za koje se smatralo da pripadaju vrsti *S. janae*, smjestili u ovu grupu unutar *S. squalus* linije, zajedno s haplotipovima iz Visovca (Krka), Trebišnjice, Ravnog polja i Ljute. Iznenađujuće, jedan haplotip iz Visovca (VIS1) posjedovala je jedna od triju ispitivanih sekvenca iz Raše, dok su ostale posjedovale istarske haplotipove koji su pronađeni i u ostalim istarskim rijekama (IST1 i IST4). Potrebno je napomenuti da su svi uzorci iz Ljute, zajedno s nekoliko uzoraka iz Trebišnjice i Ravnog polja čije su sekvence posjedovale *cyt b* haplotipove vrste *S. squalus*, morfološki bili identificirani kao vrsta *S. svallize*. Primijećena su dva haplotipa iz Trebišnjice i Ravnog polja koja pripadaju novoj filogenetičkoj liniji unutar *S. cephalus* grupe. Ta je nova filogenetička linija, *S.* sp. TRRA, sestrinska liniji vrste *S. prespensis* (Slika 28, Slika 29, Slika 30). Isto kao i na filogenetičkim stablima, na filogenetičkoj mreži dobivenoj metodom statističke parsimonije, što je potvrđeno i metodom udruživanja medijanskih vektora, odvajaju se dvije velike filogenetičke skupine s najmanje 53 mutacijska događaja, koje odgovaraju mediteranskoj i *S. cephalus* grupi. Jadranske su se sekvence prema *cyt b* genu izdvojile u pet manjih grupa povezanih unutar 95-% granice parsimonijskog povezivanja. Prvu grupu čine sekvence vrsta *S. svallize* i *S. zrmanjae*, drugu grupu čine sekvence vrste *S. illyricus*, treću grupu čine sekvence vrste *S. microlepis* i *S. tenellus*, četvrtu grupu čine *S. squalus* sekvence (uključujući i sekvence jedinki iz Dragonje, Boljunšćice i Pazinčice opisane kao *S. janae*), a petu grupu čine četiri sekvence iz Trebišnjice i jedna sekvenca iz Ravnog polja nepoznatog taksonomskog statusa.

Uspoređujući jezgrine biljege, *rag1* gen pokazao je najbolju razlučivost filogenetičkih odnosa klenova jadranskog slijeva zbog većeg broja parsimonijski informativnih mjesta i manjeg indeksa konzistencije, homoplazije i retencije. Jedino je intron gena za S7 imao manji indeks konzistencije s većim brojem parsimonijski informativnih mjesta u usporedbi s *rag1* genom, ali ne i manji indeks homoplazije, retencije i konzistencije bez neinformativnih mjesta. U usporedbi s kodirajućim regijama, nekodirajuća priroda introna pretpostavlja veći broj nezavisnih parsimonijski informativnih mjesta povezanih s manjim udjelom homoplazije i smanjenim odnosom tranzicija i transverzija (Creer, 2007.). Osim toga, za filogenetičku rekonstrukciju prema sekvencama jezgrinog introna gena za ribosomalni protein S7 korišten je puno manji broj sekvenca u odnosu na *rag1* gen (48 vs. 167 sekvenca).

Kao i kod sekvenca *cyt b* gena, kod sekvenca *rag1* gena vidljivo je razdvajanje dviju većih filogenetičkih grupa, mediteranske i *S. cephalus* grupe. Međutim, unutarnji odnosi nisu potpuno razriješeni, a primijećeno je i nepotpuno razvrstavanje linija (Slika 38, Slika 39, Slika 40). Također, nije primijećeno izdvajanje *S. janae* haplotipova u nezavisnu filogenetičku

liniju, već su sve sekvence za čije se jedinke smatralo da morfološki pripadaju navedenoj vrsti, imale *S. squalus* haplotipove. Za razliku od *cyt b* gena, sve su sekvence *rag1* gena iz Ljute (jedinke morfološki prepoznate kao vrsta *S. svallize* s *cyt b* haplotipovima vrste *S. squalus*) posjedovale *S. svallize* haplotip. Sekvence iz Trebišnjice i Ravnog polja koje su posjedovale *S. squalus* haplotip *cyt b* gena, a morfološki su prepoznate kao vrsta *S. svallize*, posjeduju *rag1* haplotipove vrsta *S. svallize* i *S. squalus*. Nadalje, sekvence iz Trebišnjice i Ravnog polja koje su posjedovale *cyt b* haplotipove nove filogenetičke linije, po *rag1* genu imaju haplotip vrste *S. squalus*, osim jedne sekvence iz Trebišnjice koja je imala haplotip vrste *S. svallize*.

Filogenetička mreža dobivena udruživanjem medijanskih vektora sekvenca *rag1* gena također je pokazala grupiranje koje odgovara mediteranskoj i *S. cephalus* grupi (isto kako je prikazano i na filogenetičkim stablima), uz razdvojenost od 16 mutacijskih događaja (Slika 41). Budući da unutarnji čvorovi odgovaraju ancestralnim haplotipovima u retikularnim filogenetičkim mrežama (Huson i Bryant, 2006.), ancestralni su haplotipovi jadranskih vrsta pronađeni na lokalitetima Prološkog blata, Vrljike, Krke i Rude u mediteranskoj grupi, dok su u *S. cephalus* grupi ancestralni haplotipovi pronađeni u istarskim rijekama - Dragonji, Mirni, Pazinčici i Borutskom potoku. Iznenađujuća su tri dobivena haplotipa koja pokazuju udaljenost u odnosu na ostale haplotipove, što je vidljivo i na filogenetičkim stablima i na filogenetičkoj mreži dobivenoj putem medijanskih vektora. Haplotip RSQU9 koji je pronađen kod jedinke iz Pazinčice, a koja je za drugi alel imala tipičan *S. squalus* haplotip (kao i kod *cyt b* gena), pokazao je veliku udaljenost od 20 mutacijskih događaja u odnosu na ostale haplotipove iz istog područja. Pretragom banke gena ustanovljena je najveća sličnost tog haplotipa iz Pazinčice s haplotipovima iz *S. cephalus* filogenetičke grupe (98%). Zrmanjski nerazriješeni haplotip (RZRM2) najsličniji je haplotipu vrste *Delminichthys* (99%), s genskom p-udaljenosti od 0,5 do 0,8%. Neretvanska jedinka posjedovala je jedan haplotip (RMET1) identičan haplotipu vrste *Chondrostoma knerii* Heckel, 1843 iz NCBI banke gena (pristupni broj: MG806168.1; Schönhuth i sur., 2018.).

Sekvence introna gena za S7 (četvrti skup podataka) dale su topologije filogenetičkih stabala relativno dobre razlučivosti, te se i kod ovog genskog biljega može uočiti razdvajanje dviju većih filogenetičkih grupa, mediteranske i *S. cephalus* grupe (Slika 43, Slika 44, Slika 45). Kao i u slučaju podataka za *rag1*, i kod sekvenca introna jezgrinog gena za S7 primijećeni su nepotpuno razriješeni unutarnji odnosi, te nepotpuno razvrstavanje linija. Kao i kod *rag1* gena, ista jedinka iz Neretve (lokalitet Metković) posjedovala je alele nerazriješenog haplotipa u filogenetičkoj rekonstrukciji, a udaljena je s 15 mutacijskih događaja od ostalih iz

istog područja. Pretragom NCBI banke gena ustanovljena je najveća sličnost s vrstama roda *Chondrostoma*, što se potvrđuje i s podacima za *rag1* gen.

Sekvence gena za rodopsin sadržavale su mali broj PI, zbog čega filogenetička razlučivost nije bila adekvatna. Osim politomije uočene kod nekoliko haplotipova, uočene su i male vrijednosti podržanosti dobivenih topologija (Slika 33, Slika 34, Slika 35). Vrlo mala razina strukturiranja vidljiva je na MJ filogenetičkoj mreži dobivenoj prema drugom setu podataka. Osim toga, na dobivenim filogenetičkim mrežama uočena je pojava tzv. petlje, koja može biti posljedica greške u sekvenciranju ili opetovanih mutacija (Huson i Bryant, 2006.). Pojava rekombinacijskog događaja može utjecati na stvaranje petlje, ali rekombinacija nije dokazana (Tablica 10).

4.3.4. Hibridne jedinke

Filogenetičkom analizom višestrukih genskih lokusa omogućeno je prepoznavanje hibridnih jedinki s haplotipovima najmanje dviju različitih vrsta. Hibridne su jedinke pronađene u Pazinčici, Boljunšćici, Zrmanji, Krki (i Visovcu), Trebišnjici, Ravnom polju i Ljutoj i prikazane su u Tablici 23. S obzirom na veći broj dokazanih hibrida, očito je da je hibridizacija vrlo raširena pojava u klenova jadranskog slijeva i da je imala važan utjecaj na genski sastav današnjih vrsta.

Tablica 23. Jedinke kod kojih je dokazano hibridno porijeklo

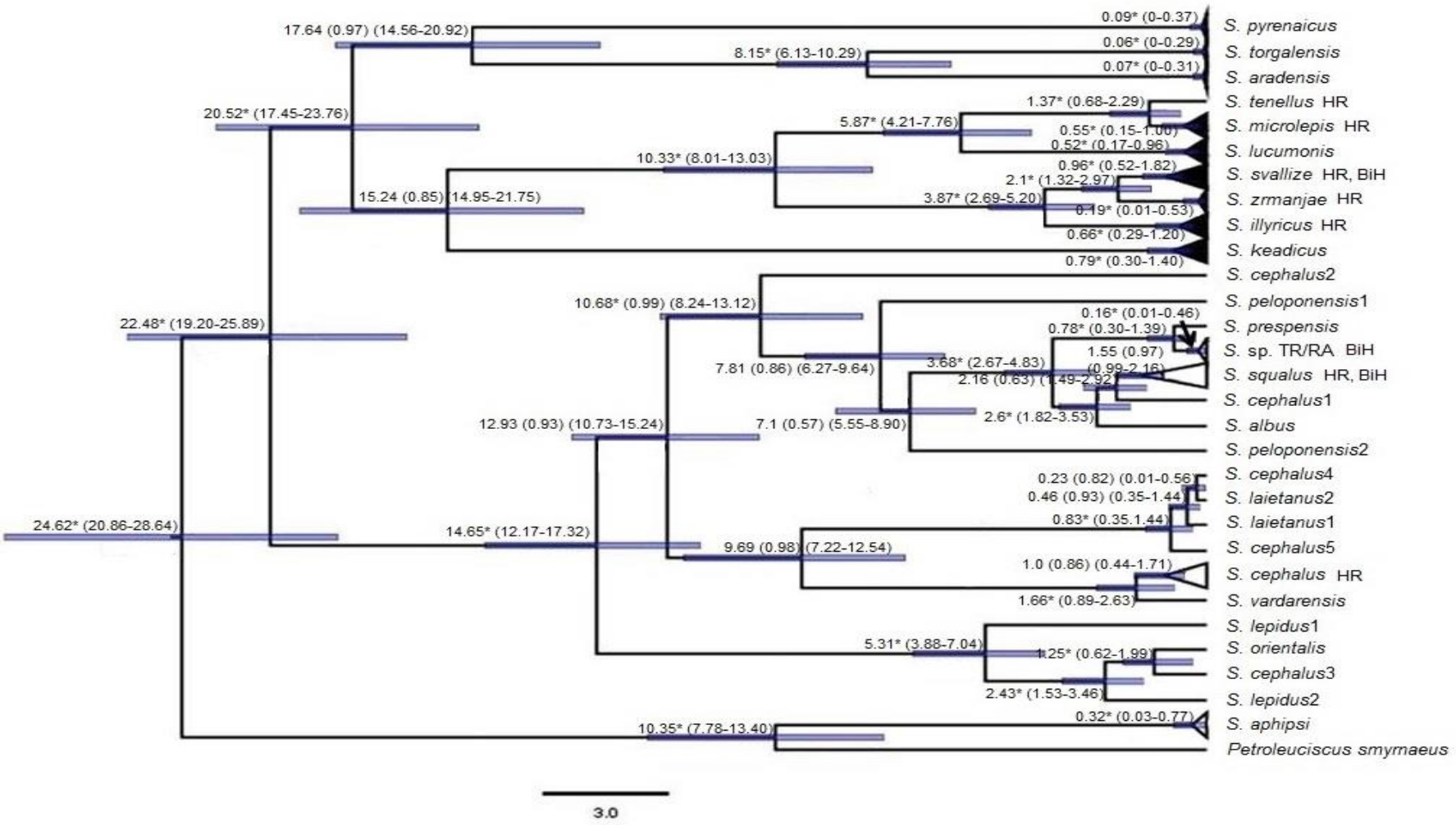
Lokalitet	**Kodno ime sekvence**	***cyt b***	***rhod***	***rag1***	**S7**	**Morfološka determinacija**
Pazinčica	SQPA5	*S. squalus*	*S. squalus*	*S. squalus*, *Delminichthys* nalik alel	/	*S. squalus*
Boljunšćica	SQBO1, SQBO6, SQBO9	*S. illyricus*	/	/	/	*S. squalus*
Zrmanja	SQZR8	*S. zrmanjae*	*S. zrmanjae*	*S. zrmanjae*, *Delminichthys* nalik alel	*S. zrmanjae*	*S. zrmanjae*
	SQZR9	*S. illyricus*	*S. zrmanjae*	/	/	*S. zrmanjae*
Krka	SQKR2	*S. zrmanjae*	nerazriješeni haplotipovi	*S. illyricus*	*S. illyricus*	*S. illyricus*
Visovac, Krka	SQVS6	*S. squalus*	/	/	*S. svallize*	*S. squalus*
Trebišnjica	SQTR1	*S.* sp. TR/RA	*S. squalus*	*S. squalus*	/	*S. squalus*
	SQTR2	*S. squalus*	*S. squalus*	*S. squalus*, *S. svallize*		*S. squalus*
	SQTR3	*S. svallize*	*S. squalus*	/	/	*S. squalus*
	SQTR5	*S.* sp. TR/RA	*S. squalus*	*S. squalus*	/	*S. squalus*
	SQTR8	*S. squalus*	*S. squalus*	*S. squalus*, *S. svallize*	/	*S. squalus*
	SQTR9	*S.* sp. TR/RA	*S. squalus*	*S. squalus*	/	*S. squalus*
	SQTR10	*S.* sp. TR/RA	*S. squalus*	*S. squalus*, *S. svallize*	/	*S. squalus*
Ravno polje	SQRA1	*S.* sp. TR/RA	*S. squalus*	*S. squalus*	*S. squalus*	*S. squalus*
Ljuta	svi uzorci	*S. squalus*	*S. svallize*	*S. svallize*	*S. svallize*	*S. svallize*

4.4. Vremena divergencije klenova jadranskog slijeva

Za određivanje vremena divergencije korištene su samo mitohondrijske sekvence *cyt b* gena jer je jedino za taj gen poznata evolucijska stopa. Za ostale jezgrine gene nije bilo moguće precizno kalibrirati vrijeme divergencije u usporedbi s podacima iz analize mitohondrijskog biljega zbog nedovoljnog broja pouzdanih dodirnih čvorova na filogenetičkim stablima.

Za izračun vremena razdvajanja linija prema podacima za *cyt b* koristio se evolucijski model TN93 (Tamura i Nei, 1993.), dobiven prema AIC kriteriju, koji uzima u obzir razliku između tranzicije i transverzije te razlikuje vrste tranzicija (purin-purin, pirimidin-pirimidin izmjena). Osim toga korišten je striktni molekularni sat sa stopom divergencije od 0,4 milijuna godina po evolucijskoj liniji, kalibriran prema fosilnim podacima (Perea i sur., 2010.) uz 20 000 MCMC koraka. Rezultati analize prikazani su na Slici 48.

Razdvajanje dviju velikih filogenetičkih grupa dogodilo se davno prije mesinske krize saliniteta (MSC), u ranom miocenu, što objašnjava veliku raznolikost između vrsta koje pripadaju različitim filogenetičkim grupama. Međutim, razdvajanje jadranskih vrsta klenova mlađeg je porijekla. Posljednji zajednički predak vrsta mediteranske grupe, *S. lucumonis*, *S. microlepis*, *S. tenellus*, *S. illyricus*, *S. zrmanjae* i *S. svallize*, živio je u doba gornjeg/srednjeg miocena. Vrste *S. microlepis* i *S. tenellus* razdvojile su se od talijanske vrste *S. lucumonis* u kasnom miocenu. Razdvajanje dalmatinskih vrsta *S. illyricus*, *S. zrmanjae* i *S. svallize* dogodilo se kasnije, u doba pliocena i pleistocena. Unutar druge, *S. cephalus* filogenetičke grupe, razdvajanje linija započinje, slično kao i kod jadranskih vrsta mediteranske grupe, u srednjem miocenu. Nova filogenetička linija iz Trebišnjice i Ravnog polja razdvojila se od *S. squalus* grupe u pliocenu. Diverzifikacijski događaji unutar vrste *S. squalus* događali su se u pleistocenu. Istraživane *S. squalus* jedinke dijele najbližeg zajedničkog pretka s vrstama *S. cephalus* i *S. albus* iz Italije, što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima (Perea i sur., 2010.).



Slika 48. Procjena vremena divergencije vrsta i razvojnih filogenetičkih linija unutar roda *Squalius* prema genu za citokrom *b*
Vremena divergencije prikazana su kao srednje vrijednosti uz podržanost (*=100%) i raspon s 95% vjerojatnosti u milijunima godina (u zagradi).
Značenje kratica: HR - Hrvatska, BiH - Bosna i Hercegovina, TR - Trebišnjica, RA - Ravno polje

4.5. Dijagnostička mjesta

4.5.1. Gen za citokrom b

Polimorfna nukleotidna mjesta na kojima se sve sekvence jedne vrste razlikuju od sekvenca drugih vrsta, tzv. fiksne razlike, pronađena su između svakog istraživanog para taksona, pa čak i između filogenetičke linije pronađene u Trebišnjici i Ravnom polju i ostalih populacija s istih lokaliteta (Tablica 24). Najviše je fiksnih razlika pronađeno između vrste *S. svallize* i linije još nepotvrđenog taksonomskog statusa, *S.* sp. TR/RA (94), te *S. zrmanjae* i *S.* sp. TR/RA, s gotovo istim brojem fiksnih razlika (93). Najmanje je fiksnih razlika (šest) pronađeno između vrsta *S. microlepis* i *S. tenellus*. Dijeljeni su polimorfizmi uočeni tek između nekoliko parova istraživanih taksona, i to između vrsta *S. illyricus* i *S. squalus* (540. nukleotidno mjesto), *S. illyricus* i *S. microlepis* (354.), *S. illyricus* i *S. svallize* (150.), *S. squalus* i *S.* sp. TR/RA (1131.) te *S. squalus* i *S. cephalus* (423. i 825.).

Tablica 24. Broj fiksnih razlika i dijeljenih polimorfizama prema sekvencama gena za citokrom *b* između istraživanih vrsta klenova jadranskog slijeva
Fiksne su razlike prikazane u gornjem desnom kutu, dok su dijeljeni polimorfizmi prikazani u donjem lijevom kutu. Filogenetički izdvojena linija iz Trebišnjice i Ravnog polja također je uključena u analizu, iako joj taksonomski status treba potvrdu. U analizu je uključena i nejadranska vrsta *S. cephalus* zbog dostupnosti podataka.
Značenje kratica: TR - Trebišnjica, RA - Ravno polje

Vrsta	**(1)**	**(2)**	**(3)**	**(4)**	**(5)**	**(6)**	**(7)**	**(8)**
***S. illyricus* (1)**	–	83	41	91	21	42	23	81
***S. squalus* (2)**	1	–	65	17	87	66	89	42
***S. microlepis* (3)**	1	0	–	77	50	6	54	76
***S.* sp. TR/RA (4)**	0	1	0	–	94	80	93	53
***S. svallize* (5)**	1	0	0	0	–	50	13	83
***S. tenellus* (6)**	0	0	0	0	0	–	53	75
***S. zrmanjae* (7)**	0	0	0	0	0	0	–	86
***S. cephalus* (8)**	0	2	0	0	0	0	0	–

Dijagnostička se mjesta razlikuju ovisno o vrsti, zbog čega mogu omogućiti pouzdanu molekularnu identifikaciju. Unutar *cyt b* gena (1140 pb) ustanovljena su dijagnostička mjesta za svaku istraživanu vrstu, kao i populaciju iz Trebišnjice i Ravnog polja čiji taksonomski status treba potvrdu (Tablica 25).

Tablica 25. Dijagnostička mjesta unutar *cyt b* gena između istraživanih jadranskih vrsta klenova
Brojevi koji se nalaze ispod dijagnostičkih mjesta predstavljaju točne pozicije u sekvenci počevši od start kodona. Sve su mutacije tihe i nemaju utjecaja na fenotip.
U analizu je uvrštena i populacija iz Trebišnjice i Ravnog polja iako taksonomski status treba potvrdu. Značenje kratica: TR - Trebišnjica, RA - Ravno polje

Vrsta	**Dijagnostička mjesta**	**Nukleotidna baza**	**Nukleotidna baza kod ostalih vrsta**
S. illyricus	351, 495, 732, 1066	G	A
S. squalus	501	A	T
	888	T	C
S. microlepis	72	C	A/G
	378	G	A
S. sp. TR/RA	156, 372, 408, 441, 846	G	A
	195	A	T/G
	360	C	T
S. svallize	63	C	T
	405	G	A
	765	T	C
S. tenellus	72	G	C/A
	324	T	A
	957	T	C
S. zrmanjae	663, 1020	T	C
	759	G	A

4.5.2. Gen za rodopsin

U odnosu na mitohondrijski *cyt b*, *rhod* gen općenito je pokazao puno manje fiksnih razlika između vrsta po svom nukleotidnom sastavu (Tablica 26). Unutar jadranskih sekvenca najviše je fiksnih razlika (3) pronađeno između vrsta *S. squalus* i *S. microlepis* te *S. microlepis* i *S. svallize*, dok je samo jedna fiksna razlika uočena između vrsta *S. illyricus* i *S. microlepis*, *S. illyricus* i *S. zrmanjae* te *S. svallize* i *S. zrmanjae*. Jedna fiksna razlika pronađena je i između jadranskih vrsta *S. illyricus* i *S. squalus* u usporebi s crnomorskom vrstom *S. cephalus*. Dijeljeni je polimorfizam uočen jedino između vrsta *S. svallize* i *S. squalus* na 688. nukleotidnoj poziciji.

Dijagnostička su mjesta pronađena za vrstu *S. microlepis* na 790. mjestu, gdje se nalazi timin, za razliku od ostalih vrsta koje imaju citozin na tom mjestu. Za *S. cephalus* vrstu na 439. poziciji specifična je baza timin, dok je za druge karakterističan citozin. Za ostale vrste nisu ustanovljena dijagnostička mjesta.

Tablica 26. Broj fiksnih razlika i dijeljenih polimorfizama sekvenca gena za rodopsin između istraživanih vrsta klenova jadranskog slijeva
Istraživane su i dodatne sekvence iz Drave (crnomorski slijev). Fiksne razlike prikazane su u gornjem desnom kutu, dok su dijeljeni polimorfizmi prikazani u donjem lijevom kutu.

Vrsta	**(1)**	**(2)**	**(3)**	**(4)**	**(5)**	**(6)**
***S. illyricus* (1)**	–	1	2	2	1	1
***S. microlepis* (2)**	0	–	3	3	2	2
***S. squalus* (3)**	0	0	–	2	2	1
***S. svallize* (4)**	0	0	1	–	1	3
***S. zrmanjae* (5)**	0	0	0	0	–	2
***S. cephalus* (6)**	0	0	0	0	0	–

4.5.3. Gen za aktivaciju rekombinacije

Fiksne razlike i dijeljeni polimorfizmi *rag1* gena prikazani su u Tablici 27. Osim jadranskih vrsta, u analizu su bile uključene sekvence vrste *S. cephalus* i sekvence nerazriješenih haplotipova iz Zrmanje i Neretve (lokalitet Metković).

Tablica 27. Broj fiksnih razlika i dijeljenih polimorfizama sekvenca *rag1* gena između istraživanih vrsta klenova
Broj fiksnih razlika prikazan je u gornjem desnom kutu, dok je broj dijeljenih polimorfizama prikazan u donjem lijevom kutu tablice. U obzir su uzeti nerazriješeni haplotipovi i vrsta *S. cephalus* iz Drave zbog dostupnosti podataka i povećanja razlučivosti rezultata.

Vrsta	**(1)**	**(2)**	**(3)**	**(4)**	**(5)**	**(6)**	**(7)**	**(8)**	**(9)**
***S. illyricus* (1)**	–	1	1	2	3	11	16	21	22
***S. microlepis* (2)**	0	–	2	3	4	12	17	22	23
***S. tenellus* (3)**	0	0	–	3	4	12	17	22	23
***S. zrmanjae* (4)**	0	0	0	–	2	13	18	23	24
***S. svallize* (5)**	0	0	0	0	–	13	18	24	25
***S. squalus* (6)**	0	0	0	0	3	–	1	25	25
***S. cephalus* (7)**	0	0	0	0	0	0	–	33	30
RZRM2 (8)	0	0	0	0	0	0	0	–	31
RMET1 (9)	0	0	0	0	0	0	0	0	–

Najviše fiksnih razlika uočeno je između nerazriješenih haplotipova iz Neretve i Zrmanje i haplotipova svih ostalih vrsta roda *Squalius*. Unutar razriješenih haplotipova, najviše je fiksnih razlika (18) pronađeno između jadranskih vrsta *S. zrmanjae* i *S. svallize* u usporedbi s nejadranskom vrstom *S. cephalus*, dok je unutar jadranskih sekvenca najviše fiksnih razlika (13) zabilježeno između vrsta *S. zrmanjae* i *S. svallize* u odnosu na vrstu *S. squalus*. Samo jedna fiksna razlika zabilježena je između vrsta *S. microlepis* i *S. illyricus*, *S.*

tenellus i *S. illyricus* te *S. squalus* i *S. cephalus*. Uočena su tri nukleotidna mjesta (1048., 1083., 1431.) na kojima vrste *S. svallize* i *S. squalus* dijele polimorfizme.

Ustanovljena su dijagnostička mjesta prema rasporedu nukleotidnih pozicija *rag1* gena (Tablica 28). Za vrste *S. illyricus, S. squalus* i *S. zrmanjae* nisu ustanovljena dijagnostička mjesta na 1443 istraživana nukleotida unutar sekvenci *rag1* gena.

Tablica 28. Dijagnostička mjesta unutar sekvenci *rag1* gena između istraživanih jadranskih vrsta klenova
U analizu je uvrštena i populacija iz Trebišnjice i Ravnog polja iako taksonomski status treba potvrdu. Značenje kratica: TR - Trebišnjica, RA - Ravno polje

Vrsta	**Dijagnostička mjesta**	**Nukleotidna baza**	**Nukleotidna baza kod ostalih vrsta**
S. illyricus	-		
S. squalus	-		
S. microlepis	1263	A	G
S. svallize	516, 843	T	C
S. tenellus	777	T	C
S. zrmanjae	-		
RZRM2	153	C	T
	306, 703, 1250	A	G
	339, 354, 726, 984, 1056	T	C
	771	A	T
	1038	T	A
	1111	T	G
RMET1	30	T	C
	91	G	A
	138, 198, 651, 759	C	T
	507	C	G
	534	C	A
	696,742	A	C
	1043	T	A
	1086	C	T/A
	1189	G	C
	1266	G	T

4.6. Genska raznolikost

4.6.1. DNA polimorfizam svih ispitivanih gena klenova jadranskog slijeva

Sekvence mitohondrijskog *cyt b* gena ukupne dužine od 1140 nukleotida korištene su u svim analizama genske raznolikosti. Od 1140 analiziranih mjesta 985 je konstantnih, dok je 155 varijabilnih mjesta. Unutar varijabilnih mjesta 16 je singletonskih, dok je 139

parsimonijski značajnih. Sva singletonska mjesta imaju po dvije varijante. Od parsimonijski značajnih mjesta 127 ih se pojavljuje u dvjema varijantama, dok se na šest mjesta nalaze po tri različita nukleotida. Među svim uočenim mutacijama nalazile su se samo supstitucije, a insercije i delecije nisu uočene.

Kod *rhod* gena dužina analiziranih sekvenca iznosila je 810 nukleotida, od kojih je 799 konstantnih, a 11 varijabilnih. Unutar varijabilnih mjesta 10 ih je parsimonijski informativnih, a samo je jedno singletonsko mjesto. Sva varijabilna mjesta dolaze u dvjema varijantama. Unutar istraživanih sekvenca uočene su samo supstitucijske mutacije, bez insercija i delecija.

Dužina dobivenih sekvenca *rag1* gena iznosila je 1443 nukleotida od kojih je 1378 konstantnih, a 65 je varijabilnih mjesta, unutar kojih je 36 singletona. Unutar varijabilnih mjesta 27 ih je parsimonijski informativno. Većina varijabilnih značajki dolazi u dvjema varijantama. Jedino su unutar parsimonijski informativnih značajki pronađena dva nukleotidna mjesta koja se pojavljuju u trima varijantama. Od svih mogućih mutacija, uočene su samo nukleotidne supstitucije, dok insercije i delecije nisu uočene.

Polimorfizam DNA za sve istraživane gene *Squalius* vrsta prikazan je u Tablici 29. Unutar sekvenca mitohondrijskog *cyt b* gena puno je veći udio segregirajućih mjesta i mutacija u odnosu na jezgrine gene, što potvrđuje činjenicu da mitohondrijski DNA puno brže evoluira. Tako je i najveći broj raznolikih haplotipova upravo zabilježen kod mitohondrijskih sekvenca. U odnosu na sva istraživana nukleotidna mjesta unutar *cyt b* sekvenca pronađeno je 14% varijabilnih mjesta (155/1140), dok je kod *rag1* sekvenca pronađeno 5% varijabilnih mjesta (65/1443), za razliku od sekvenca gena za rodopsin gdje je pronađeno samo 1% varijabilnih pozicija (11/810). Kod analize *rag1* gena nisu uzeti u obzir nerazriješeni haplotipovi iz Neretve koji su se pokazali identičnima s haplotipovima vrste roda *Chondrostoma*, gdje je najvjerojatnije došlo do greške prilikom uzorkovanja, iako su podaci za mitohondrijski biljeg nepoznati. Zbog premalog broja zastupljenih sekvenca introna jezgrinog gena za S7, ovaj genski biljeg nije korišten za izračun genske raznolikosti i diferencijacije. U analize nisu uvrštene ni jedinke iz rijeke Drave koja nije dio jadranskog slijeva.

Tablica 29. Polimorfizam DNA za istraživane genske biljege klenova jadranskoga slijeva Značenje kratica: *cyt b* - citokrom *b*, *rhod* - rodopsin, *rag1* - gen za aktivaciju rekombinacije, N - broj istraživanih sekvenca, S - broj polimorfnih (segregirajućih) mjesta, η - broj mutacija, h - broj haplotipova, Hd - raznolikost haplotipova, var. - varijanca, st. dev. - standardna devijacija, π - nukleotidna raznolikost, k - prosjek nukleotidnih razlika

Gen	**N**	**S**	**η**	**h**	**Hd (var., st. dev.)**	**π**	**k**
cyt b	127	155	162	31	0,903 (0,00018, 0,014)	0,04483	51,101
rhod	128	11	11	13	0,809 (0,00036, 0,019)	0,00345	2,793
rag1	112	65	67	19	0,775 (0,00100, 0,032)	0,00693	9,980

4.6.2. Genska raznolikost mitohondrijskog *cyt b* gena jadranskih vrsta *Squalius*

DNA polimorfizam cyt b gena

Nekoliko mjera genske raznolikosti izračunato je za svaku vrstu, osim za vrstu *S. tenellus* koja je predstavljena samo s jednom jedinkom pa se polimorfizam nije mogao izračunati (Tablica 30). Najveća raznolikost haplotipova (Hd) pronađena je unutar vrste *S. microlepis* koja je predstavljena sa samo četiri sekvence (0,833), dok je najmanja Hd vrijednost pronađena unutar vrste *S. svallize* (0,338).

Tablica 30. Mjere DNA polimorfizma mitohondrijskog *cyt b* gena unutar istraživanih jadranskih vrsta *Squalius*
U analizu je uključena izdvojena linija iz Trebišnjice (TR) i Ravnog polja (RA) čiji taksonomski status treba potvrdu. Značenje kratica: N - broj istraživanih sekvenca, S - broj polimorfnih (segregirajućih) mjesta, η - broj mutacija, h - broj haplotipova, Hd - raznolikost haplotipova, π - nukleotidna raznolikost, k - prosjek nukleotidnih razlika

Vrsta	**N**	**S**	**η**	**h**	**Hd**	**π**	**k**
S. illyricus	24	5	5	6	0,757	0,00132	1,500
S. microlepis	4	4	4	3	0,833	0,00190	2,167
S. sp. TR/RA	5	1	1	2	0,600	0,00053	0,600
S. squalus	66	24	25	12	0,744	0,00304	3,463
S. svallize	22	11	11	5	0,338	0,00123	1,403
S. zrmanjae	5	1	1	2	0,400	0,00035	0,400

Zbog sličnosti i uvida u status pojedinih populacija, izračunat je i genski polimorfizam unutar populacija (Tablica 31). Jedinke iz Pazinčice i jedinke iz Borutskog potoka ubrajane su u jednu populaciju zbog povezanosti lokaliteta. Isto tako vrijedi i za jedinke iz Zrmanje i Ričice (Lika) te za jedinke iz Vrljike i Prološkog blata. S obzirom na povezanost i blizinu

staništa, vrste klenova iz Neretve, Trebišnjice, Ravnog polja i Hutovog blata također su promatrane kao jedna populacija. Populacije s ostalih lokaliteta promatrane su zasebno. Populacije su označene kodnim imenima prema vrsti kojoj jedinke pripadaju i lokalitetu na kojem su nađene.

Tablica 31. Mjere DNA polimorfizma gena za citokrom *b* jadranskih populacija vrsta roda *Squalius*
Značenje kratica: N - broj istraživanih sekvenca, S - broj polimorfnih (segregirajućih) mjesta, η - broj mutacija, h - broj haplotipova, Hd - raznolikost haplotipova, π - nukleotidna raznolikost, k - prosjek nukleotidnih razlika, NE - Neretva, RA - Ravno polje, TR - Trebišnjica, ZR - Zrmanja, LI - Ričica (Lika), VI - Vinalić (Cetina), KR - Krka, VS - Visovac (Krka), BO - Boljunšćica, PB - Prološko blato, VR - Vrljika, LJU - Ljuta, RS - Raša, DR - Dragonja, PA - Pazinčica, MI - Mirna, BP - Borutski potok

Populacija	**N**	**S**	**η**	**h**	**Hd**	**π**	**k**
squalus_DR	5	1	1	2	0,600	0,00053	0,600
squalus_MI	6	6	6	2	0,533	0,00281	3,200
squalus_PA/BP	17	0	0	1	0	0	0
squalus_RS	3	6	6	3	1,000	0,00351	4,000
squalus_BO	5	1	1	2	0,400	0,00035	0,400
squalus_VS	5	3	3	3	0,700	0,00105	1,200
squalus_TR/RA	8	2	2	2	0,500	0,00044	0,500
squalus_LJU	17	3	3	3	0,228	0,00031	0,353
zrmanjae_ZR	4	0	0	1	0	0	0
illyricus_BO	3	0	0	1	0	0	0
illyricus_ZR/LI	4	0	0	1	0	0	0
illyricus_KR/VS	11	3	3	3	0,473	0,00061	0,691
illyricus_VI	8	3	3	4	0,821	0,00107	1,214
microlepis_PB/VR	4	4	4	3	0,833	0,0019	2,167
svallize_NE/TR/HB/RA	19	11	11	5	0,386	0,00142	1,614
sp_TR/RA	4	1	1	2	0,500	0,00044	0,500

Najveća je raznolikost haplotipova i nukleotida pronađena u *S. squalus* populaciji iz Raše (Hd=1,000), gdje je na samo tri istraživane sekvence svaka posjedovala drugačiji haplotip. Umjerena raznolikost *cyt b* haplotipova zabilježena je unutar *S. squalus* populacija iz Dragonje, Mirne, Visovca, Trebišnjice i Ravnog polja, dok je vrlo mala raznolikost haplotipova, uz vrlo malu nukleotidnu raznolikost, dobivena za populaciju vrste *S. squalus* iz Ljute (0,228) na velikom broju sekvenca (17 sekvenca). Nikakva raznolikost nije zabilježena između sekvenca iste vrste iz Pazinčice i Borutskog potoka, gdje je čak 17 sekvenca posjedovalo samo jedan haplotip. Velika je raznolikost haplotipova, uz veliku nukleotidnu raznolikost, pronađena u populaciji vrste *S. microlepis* iz Prološkog blata i Vrljike te populaciji vrste *S. illyricus* iz Cetine (0,821). Za razliku od populacije iz Cetine, populacija

vrste *S. illyricus* iz Krke pokazuje puno manju raznolikost haplotipova (0,400). Kod populacije iste vrste iz Zrmanje i Boljunčice pronađen je samo jedan haplotip (Hd=0). Kod populacije vrste *S. svallize* zabilježena je vrlo niska raznolikost haplotipova iz neretvanskog slijeva (Hd=0,386). Populacija iz Trebišnjice i Ravnog polja nove filogenetičke linije pokazuje umjerenu raznolikost haplotipova, s malom nukleotidnom raznolikosti. Kod populacije vrste *S. zrmanjae* iz Zrmanje uočen je samo jedan haplotip.

Genska p-udaljenost cyt b gena

Genska p-udaljenost, odnosno stupanj genske raznolikosti temeljen na prosječnom broju nukleotidnih razlika u genu za citokrom *b,* prikazana je u Tablici 32.

Tablica 32. Međuvrsne genske p-udaljenosti jadranskih vrsta *Squalius* prema *cyt b* genu Prikazani su rasponi i srednje vrijednosti (u zagradi) genske p-udaljenosti izražene u postocima. U analizu je uvrštena i populacija iz Trebišnjice (TR) i Ravnog polja (RA), čiji taksonomski status treba potvrdu.

Vrsta	*S. squalus*	*S. microlepis*	*S. svallize*	*S.* sp. TR/RA	*S. tenellus*	*S. illyricus*
S. microlepis	6,1-6,8 (6,5)					
S. svallize	8,3-9,0 (8,6)	4,5-5,4 (4,9)				
S. sp. TR/RA	1,7-2,4 (2,1)	6,8-7,1 (7,0)	8,3-8,9 (8,6)			
S. tenellus	6,3-6,7 (6,5)	0,6-0,8 (0,7)	4,5-5,0 (4,7)	7,0-7,1 (7,1)		
S. illyricus	7,7-8,4 (8,1)	3,7-4,2 (3,9)	1,8-2,6 (2,2)	8,1-8,3 (8,2)	3,7-4,0 (3,8)	
S. zrmanjae	8,2-8,6 (8,4)	4,8-5,1 (4,9)	1,1-1,8 (1,5)	8,2-8,3 (8,2)	4,6-4,7 (4,7)	2,0-2,4 (2,2)

Genska se udaljenost kretala u rasponu od 0,6% do 9,0% između istraživanih jadranskih *Squalius* vrsta. Najmanja genska p-udaljenost zabilježena je između vrsta *S. tenellus* iz Rude i *S. microlepis* iz voda imotskog slijeva (0,6%). Osim navedenih vrsta, sličnost pokazuju i vrste *S. zrmanjae* i *S. svallize* sa zabilježenom prosječnom genskom p-udaljenosti od 1,5%. Najveća genska p-udaljenost od 9,0% zabilježena je između vrsta različitih filogenetičkih grupa, *S. svallize* i *S. squalus*, te između *S. svallize* i jedinki nove filogenetičke linije iz Trebišnjice i Ravnog polja. Ta, dosad neprimijećena hercegovačka linija, pokazivala je najveću sličnost s vrstom *S. squalus* (2,1%) unutar iste filogenetičke *S. cephalus* grupe.

Najveća unutarvrsna genska p-udaljenost od 0,6% zabilježena je unutar vrste *S. squalus* (Tablica 33). Najmanja je genska udaljenost zabilježena unutar vrste *S. zrmanjae* i nove filogenetičke linije iz Trebišnjice i Ravnog polja (0,1%). S obzirom na to da je pronađen samo jedan haplotip unutar vrste *S. tenellus*, za tu vrstu nije bilo moguće izračunati unutarvrsnu gensku udaljenost.

Tablica 33. Unutarvrsne genske p-udaljenosti vrsta *Squalius* rijeka jadranskog slijeva u Hrvatskoj i BiH prema genu za citokrom *b*
Osim navedenih vrsta istraživana je i dosad neopisana linija iz Trebišnjice i Ravnog polja (*S.* sp. TR/RA).

Vrsta	**p-udaljenost (%)**
	Raspon (srednja vrijednost)
S. squalus	0,1-1,1 (0,6)
S. svallize	0,1-0,8 (0,5)
S. microlepis	0,1-0,4 (0,2)
S. illyricus	0,1-0,4 (0,2)
S. zrmanjae	0,1 (0,1)
S. sp. TR/RA	0,1 (0,1)
S. tenellus	-

Genska diferencijacija prema genu za citokrom b

Rezultati testova genske diferencijacije *cyt b* gena prikazani su u Tablici 34. Populacije su nazvane po lokalitetu iz kojeg dolaze. Statistički značajne razlike među populacijama utvrđene su prema svim testovima između *S. illyricus* populacija iz Krke i Cetine, te Krke i Boljunšćice. Isto tako, utvrđene su i razlike između populacija vrste *S. squalus* iz Boljunščice i svih ostalih istraživanih istarskih rijeka, osim Raše. Dobiveni su statistički značajni testovi i između populacija vrste *S. squalus* iz Dragonje i Pazinčice (zajedno s Borutskim potokom). Iznenađujuće, između *S. illyricus* populacija iz Cetine i Boljunšćice ni prema jednom testu nisu utvrđene razlike pa se prihvaća nulta hipoteza da nema razlike među tim populacijama. Ista je situacija zabilježena između *S. squalus* populacija iz Raše i Krke.

Tablica 34. Rezultati statističkih testova genske diferencijacije prema *cyt b* genu istraživanih *Squalius* populacija
Sivo obojana polja predstavljaju testove koji su pokazali statističku značajnost, dok broj zvjezdica označava jačinu statističke značajnosti (*=0,01<P<0,05; **= 0,001<P<0,01; ***= P<0,001). Značenje kratica: χ^2, H_S, H_{ST} - statistički parametri diferencijacije između subpopulacija temeljeni na haplotipovima, K_S, K_{ST}, K_S^x, K_{ST}^x Z, Z^x, Snn - statistički parametri diferencijacije između populacija temeljeni na nukleotidnim sekvencama, DR - Dragonja, MI - Mirna, PA - Pazinčica, BP - Borutski potok, BO - Boljunšćica, RŠ - Raša, KR - Krka, TR - Trebišnjica, RA - Ravno polje, LJU - Ljuta, VI - Vinalić (Cetina), ZR - Zrmanja, NE - Neretva, HB - Hutovo blato

Populacije	χ^2	H_S	H_{ST}	K_S	K_{ST}	K_S^x	K_{ST}^x	**Z**	Z^x	**Snn**
squalus DR/MI	4,09	0,56	0,03	2,00	0,12	0,77	0,06	25,66	3,12	0,64
squalus DR/PABP	7,48**	0,10*	0,42*	0,14*	0,21*	0,07*	0,42*	106,56*	4,64*	0,76*
squalus DR/BO	10,0*	0,50**	0,36**	0,50**	0,82**	0,35**	0,69**	9,50**	2,22**	1,00**
squalus RŠ/DR	4,80	0,70	0,07	1,88	0,03	0,70	0,21	11,13	2,29	0,56
squalus RŠ/MI	5,40	0,63	0,10	3,47	0,04	1,14	0,06	16,76	2,67	0,60
squalus RŠ/BO	4,59	0,55	0,14	1,75	0,29	0,6	0,36	10,38	2,28	0,73
squalus MI/BO	11,00*	0,48**	0,38**	1,93**	0,55**	0,72**	0,48**	17,97**	2,62***	1,00**
squalus MI/PABP	6,20*	0,11	0,32	0,83	0,16	0,22	0,32	119,20	4,75	0,70
squalus BO/PABP	22,00***	0,07***	0,83***	0,09***	0,94***	0,05***	0,93***	75,37***	4,30***	1,00***
squalus RŠ/PABP	12,59**	0,06*	0,68*	0,60	0	0,10*	0,63*	82,29*	4,40*	0,81*
squalus KR/RŠ	4,80	0,78	0,01	2,25	0,14	0,89	0,15	11,47	2,33	0,59
squalus TR/RŠ	7,00	0,67	0,22	2,29*	0,45*	0,88*	0,40*	4,89*	1,54*	1,00*
squalus TR/BO	9,00*	0,44*	0,41*	0,67**	0,83**	0,39**	0,70**	7,56**	2,03**	1,00**
squalus TR/KR	9,00	0,62*	0,26*	1,11**	0,75**	0,63**	0,56**	7,48**	1,98**	1,00**
squalus RA/TR	1,14	0,25	0	0,50	0	0,27	0	13,50	2,60	0,43
squalus TRRA/LJU	3,07	0,23	-0,02	0,40	0	0,23	-0,002	149,88	4,95	0,55
illyricus VI/KR	15,92**	0,61***	0,22***	0,91***	0,43***	0,54***	0,36***	57,57***	3,82***	0,89***
illyricus VI/ZR	2,50	0,82	-0,12	0,97	0,05	0,72	-0,16	24,84	3,10	0,70
illyricus VI/BO	3,44	0,70	-0,02	0,88	0,07	0,62	-0,07	28,46	3,19	0,67
illyricus KR/BO	9,55**	0,43*	0,31*	0,54*	0,53*	0,37*	0,41*	32,43*	3,35*	0,86*
illyricus KR/ZR	7,88*	0,47	0,20	0,58*	0,44*	0,41*	0,30*	31,03*	3,31*	0,85
svallize NE/TRRAHB	1,23	0,87	0,48	0,03	0,80	2,25	-0,04	1,00	0,76	-0,02

Protok cyt b gena

Osim genskog razlikovanja, za donošenje zaključka o konzervacijskim strategijama, potrebno je bilo i ustanoviti u kojem je omjeru prisutna migracija i protok gena unutar geografski udaljenih populacija. U Tablici 35 prikazan je izračun protoka mitohondrijskog *cyt b* gena uz test permutacije na 1 000 replikanata. Za populacije vrste *S. svallize* iz Trebišnjice i Ravnog polja te *S. illyricus* populacije iz Zrmanje i Boljunšćice nije bilo polimorfnih nukleotidnih mjesta, pa se protok gena nije mogao izračunati. Velik protok gena izračunat je između populacija *S. squalus* iz Trebišnjice i Ljute te Ravnog polja i Ljute prema većini testova, uz vrijednost F_{ST} jednaku nuli, po čemu nema genske diferencijacije između navedenih populacija. Velike su vrijednosti Nm primijećene i između *S. squalus* populacije iz Raše i Pazinčice samo za jedan test (N_{ST}), kod kojeg je najvjerojatnije došlo do pretjerivanja u rezultatima radi malog broja uzoraka iz Raše s vrlo velikom raznolikosti haplotipova. Za sve ostale populacije po svim su testovima izračunate relativno male vrijednosti efektivnog broja migranata (Nm), osim između *S. svallize* populacija, gdje je očekivano uočen veći broj migranata prema svim testovima.

Tablica 35. Protok gena prema sekvencama *cyt b* gena istraživanih populacija klenova Značenje kratica: G_{ST}, δ_{ST} i γ_{ST} - koeficijenti genske diferencijacije, Nm - efektivni broj imigranata po generaciji, N_{ST} - procjenitelj protoka gena, F_{ST} - fiksacijski indeks, DR - Dragonja, PA - Pazinčica, BP - Borutski potok, MI - Mirna, BO - Boljunšćica, RŠ - Raša, RA - Ravno polje, TR - Trebišnjica, LJU - Ljuta, VI - Vinalić (Cetina), KR - Krka, ZR - Zrmanja, NE - Neretva, HB - Hutovo blato

Populacije	**G_{ST}**	**Nm**	**δ_{ST}**	**γ_{ST}**	**Nm**	**N_{ST}**	**Nm**	**F_{ST}**	**Nm**
squalus DR/PABP	0,22	1,81	0,00005	0,34	0,97	0,25	1,50	0,25	1,50
squalus MI/PABP	0,17	2,53	0,0002	0,27	1,35	0,20	2,00	0,20	2,00
squalus BO/PABP	0,76	0,16	0,001	0,95	0,03	0,95	0,02	0,95	0,03
squalus RŠ/PABP	0,25	1,51	0,0002	0,30	1,18	-0,0008	-638,50	0	
squalus RA/TR	0		0,00005	0,14	3,00	0		0	
squalus RA/LJU	0,03	13,90	0	0,01	42,00	-0,00005	-10235	0	
squalus TR/LJU	0,001	410,5	0,00004	0,92	4,93	0,0001	3563,90	0	
illyricus VI/KR	0,20	1,98	0,0006	0,47	0,57	0,59	0,35	0,59	0,35
illyricus VI/ZR	0,14	3,11	0,00006	0,08	6,07	0,19	2,13	0,19	2,13
illyricus VI/BO	0,14	3,01	0,00008	0,10	4,45	0,19	2,13	0,19	2,13
illyricus KR/ZR	0,34	0,98	0,0004	0,45	0,61	0,83	0,10	0,83	0,10
illyricus KR/BO	0,39	0,78	0,0005	0,53	0,43	0,83	0,10	0,83	0,10
svallize NE/TRRAHB	-0,03	-17,68	0,00002	0,01	42,13	-0,08	-7,15	-0,08	-7,15
svallize NE/RA	0,06	7,87	0,00002	0,02	29,05	0,05	10,19	0,05	10,17
svallize NE/TR	0,09	5,10	0,00002	0,01	41,39	0,05	10,19	0,05	10,17

4.6.3. Genska raznolikost istraživanih jezgrinih gena (*rhod* i *rag1*) jadranskih vrsta *Squalius*

DNA polimorfizam rhod gena

Za sve je vrste dobivena niska raznolikost haplotipova *rhod* gena, dok je kod vrste *S. illyricus* i *S. microlepis* prisutan samo jedan haplotip gena za rodopsin (Tablica 36).

Tablica 36. DNA polimorfizam jezgrinog gena za rodopsin unutar jadranskih vrsta roda *Squalius*
Značenje kratica: N - broj istraživanih sekvenca, h - broj haplotipova, S - broj polimorfnih (segregirajućih) mjesta, Hd - raznolikost haplotipova, k - prosjek nukleotidnih razlika, π - nukleotidna raznolikost, η - broj mutacija

Vrsta	**N**	**S**	**η**	**h**	**Hd**	**π**	**k**
S. illyricus	11	0	0	1	0	0	0
S. microlepis	7	0	0	1	0	0	0
S. squalus	51	6	6	6	0,463	0,00079	0,638
S. svallize	53	2	2	3	0,456	0,00059	0,482
S. zrmanjae	5	1	1	2	0,400	0,00049	0,400

Većina istraživanih populacija ima vrlo nisku raznolikost haplotipova gena za rodopsin, a samo jedan haplotip posjeduju populacija iz Krke, populacija iz Vrljike i Prološkog blata, populacija iz Zrmanje te populacija iz Trebišnjice i Ravnog polja (Tablica 37). Uzorci iz Vrljike, Prološkog blata i Zrmanje predstavljeni su s malim brojem sekvenca, što je moglo utjecati na rezultat, dok je za ostale populacije analiziran dovoljan broj sekvenca. Najveća je raznolikost haplotipova zabilježena kod populacije vrste *S. squalus* iz Dragonje (Hd=1,000), s velikom nukleotidnom raznolikosti. Populacija iste vrste iz Pazinčice (i Borutskog potoka) pokazuje umjerenu raznolikost haplotipova *rhod* gena (Hd=0,533) uz vrlo malu nukleotidnu raznolikost, gdje 16 sekvenca posjeduje samo dva haplotipa. Od svih populacija vrste *S. squalus* ističe se populacija iz Trebišnjice i Ravnog polja, gdje čak 27 analiziranih sekvenca dijeli samo jedan haplotip. Populacije vrste *S. svallize* iz neretvanskog slijeva i Ljute, uz dovoljan broj analiziranih sekvenca, također pokazuju nisku raznolikost haplotipova s malom nukleotidnom raznolikosti (Hd=0,480).

Tablica 37. Unutarpopulacijska analiza DNA polimorfizma jezgrinog gena za rodopsin jadranskih klenova
Značenje kratica: N - broj istraživanih sekvenca, S - broj polimorfnih (segregirajućih) mjesta, η - broj mutacija, h - broj haplotipova, Hd - raznolikost haplotipova, π - nukleotidna raznolikost, k - prosjek nukleotidnih razlika, DR - Dragonja, PA - Pazinčica, BP - Borutski potok, TR - Trebišnjica, RA - Ravno polje, ZR - Zrmanja, KR - Krka, VR - Vrljika, PB - Prološko blato, NE - Neretva, LJU - Ljuta

Populacija	**N**	**S**	**η**	**h**	**Hd**	**π**	**k**
squalus_DR	6	6	6	6	1,000	0,00321	2,600
squalus_PA/BP	16	1	1	2	0,533	0,00066	0,533
squalus_TR/RA	27	0	0	1	0	0	0
zrmanjae_ZR	4	0	0	1	0	0	0
illyricus_KR	10	0	0	1	0	0	0
microlepis_VR/PB	3	0	0	1	0	0	0
svallize_NE/TR/RA	25	1	1	2	0,480	0,00059	0,480
svallize_LJU	28	2	2	3	0,442	0,00061	0,495

Genska p-udaljenost prema genu za rodopsin

Najveća genska p-udaljenost između sekvenca *rhod* gena pronađena je između vrsta *S. svallize* i *S. squalus* te *S. svallize* i *S. microlepis* (0,9%), dok je najmanja genska p-udaljenost pronađena između vrsta *S. zrmanjae* i *S. illyricus*, *S. microlepis* i *S. illyricus* te *S. svallize* i *S. zrmanjae* (0,1%). Najveća prosječna vrijednost genske p-udaljenosti uočena je između vrsta *S. svallize* i *S. squalus* (0,6%), dok je najmanja prosječna vrijednost zabilježena između vrsta *S. microlepis* i *S. illyricus* (0,1%) (Tablica 38).

Tablica 38. Raspon i srednje vrijednosti (u zagradi) genske p-udaljenosti jezgrinog gena za rodopsin između istraživanih vrsta klenova
Vrijednosti su prikazane u postocima.

Vrsta	*S. squalus*	*S. illyricus*	*S. zrmanjae*	*S. svallize*
S. squalus				
S. illyricus	0,2-0,7 (0,3)			
S. zrmanjae	0,4-0,7 (0,5)	0,1-0,2 (0,2)		
S. svallize	0,4-0,9 (0,6)	0,2-0,4 (0,3)	0,1-0,4 (0,3)	
S. microlepis	0,4-0,9 (0,4)	0,1 (0,1)	0,2-0,4 (0,3)	0,4-0,5 (0,4)

Unutar jadranskih vrsta, *S. illyricus*, *S. microlepis* i *S. illyricus* nije uočena genska udaljenost, dok je vrlo mala genska-p udaljenost zabilježena unutar vrsta *S. squalus* i *S. svallize* (0,1%) (Tablica 39). Najveća je genska p-udaljenost zabilježena unutar vrste *S. squalus*.

Tablica 39. Unutarvrsne genske p-udaljenosti jezgrinog gena za rodopsin istraživanih vrsta klenova jadranskog slijeva
Raspon i srednja vrijednost (u zagradi) prikazani su u postocima.

Vrsta	**Raspon (srednja vrijednost)**
S. squalus	0-0,7 (0,1)
S. illyricus	0
S. zrmanjae	0
S. svallize	0-0,1 (0,1)
S. microlepis	0

Genska diferencijacija prema genu za rodopsin

Rezultati statističkih testova genske diferencijacije gena za rodopsin istraživanih *Squalius* populacija prikazani su u Tablici 40. Vrsta *S. tenellus* predstavljena je samo s jednom sekvencom pa se nije mogao napraviti izračun za tu populaciju iz Rude. Vrste *S. zrmanjae*, *S. microlepis* i *S. illyricus* predstavljene su samo s jednom populacijom pa nije bilo drugih populacija za usporedbu. Testovi genske diferencijacije jezgrinog gena za rodopsin većinom nisu pokazali statistički značajnu razliku između istraživanih populacija. Jedino su *S. squalus* populacije iz Dragonje i Pazinčice pokazale malu statistički značajnu razliku prema većini izračunatih testova, osim za H_S, H_{ST}, K_S i K_{ST} kod kojih značajne razlike nema.

Tablica 40. Rezultati statističkih testova genske diferencijacije populacija klenova prema genu za rodopsin
Sivo obojana polja predstavljaju statistički značajne vrijednosti, dok broj zvjezdica označava razinu statističke značajnosti (*=0,01<P<0,05; **= 0,001<P<0,01; ***= P<0,001).
Značenje kratica: χ^2, H_S, H_{ST} - statistički parametri diferencijacije između subpopulacija temeljeni na haplotipovima, K_S, K_{ST}, K_S^x, K_{ST}^x Z, Z^x, Snn - statistički parametri diferencijacije između populacija temeljeni na nukleotidnim sekvencama, DR - Dragonja, PA - Pazinčica, BP - Borutski potok, MI - Mirna, NE - Neretva, RA - Ravno polje, TR - Trebišnjica

Populacije	**χ^2**	**H_S**	**H_{ST}**	**K_S**	**K_{ST}**	**K_S^x**	**K_{ST}^x**	**Z**	**Z^x**	**Snn**
squalus DR/PABP	13,04 *	0,64	0,07	1,10	0,04	0,55 *	0,11 *	105,46 *	4,47 *	0,71 *
squalus DR/MI	4,44	1,00	-0,12	1,95	0,10	1,18	-0,16	15,73	2,71	0,64
squalus PABP/MI	1,80	0,53	-0,02	0,47	0,09	0,37	-0,02	76,80	4,21	0,80
svallize NE/TRRA	0,23	0,63	0,50	0,50	-0,03	0,34	-0,04	152,02	4,89	0,66
svallize LJU/NETRRA	1,53	0,46	-0,009	0,49	-0,01	0,33	-0,01	691,79	6,41	0,49

Protok jezgrinog gena za rodopsin

U Tablici 41 prikazan je izračun protoka gena prema sekvencama *rhod* gena između jadranskih *Squalius* populacija uz korištenje testa permutacije na 1 000 replikanata. Između populacija *S. squalus* iz Trebišnjice i Ravnog polja nije bilo polimorfnih mjesta pa se protok gena nije mogao izračunati. Vrsta *S. illyricus* zastupljena je samo s jednom populacijom jer nije bilo drugih populacija pa se izračun za tu vrstu također nije mogao napraviti. Mali je broj efektivnih migranata utvrđen između *S. squalus* populacija iz Dragonje i Pazinčice. Između populacija vrste *S. svallize* iz Ljute i neretvanskog slijeva (i obratno) primijećen je veći broj migranata po svim izračunatim testovima. Slično je primijećeno i između populacija iste vrste iz Neretve i Trebišnjice (i Ravnog polja), uz manji broj migranata prema N_{ST} i F_{ST} vrijednostima.

Tablica 41. Protok gena prema sekvencama gena za rodopsin istraživanih populacija klenova Značenje kratica: G_{ST}, δ_{ST} i γ_{ST} - koeficijenti genske diferencijacije, Nm - efektivni broj imigranata po generaciji, N_{ST} - procjenitelj protoka gena, F_{ST} - fiksacijski indeks, DR - Dragonja, PA - Pazinčica, BP - Borutski potok, MI - Mirna, LJU - Ljuta, NE - Neretva, RA - Ravno polje, TR - Trebišnjica

Populacije	**G_{ST}**	**Nm**	**δ_{ST}**	**γ_{ST}**	**Nm**	**N_{ST}**	**Nm**	**F_{ST}**	**Nm**
squalus DR/PABP	0,05	4,82	0,0001	0,12	1,80	0,06	3,93	0,06	3,92
squalus PABP/MI	0,15	1,37	0,00006	0,10	2,25	0,47	0,29	0,47	0,29
svallize LJU/NERATR	-0,009	-28,88	0	0,007	34,66	-0,02	-10,46	-0,02	-10,47
svallize NE/TRRA	-0,02	-12,03	0,00001	0,009	26,59	-0,08	-3,28	-0,08	-3,28

DNA polimorfizam *rag1* gena

Mjere DNA polimorfizma jezgrinog *rag1* gena mogle su se izračunati za sve vrste, osim za vrste *S. microlepis* i *S. zrmanjae* koje su predstavljene samo s jednom sekvencom u uzorku (Tablica 42). Umjerena raznolikost haplotipova zabilježena je unutar vrste *S. squalus* (Hd=0,739), dok je mala raznolikost zabilježena unutar vrste *S. svallize* (Hd=0,211).

Tablica 42. DNA polimorfizam jezgrinog *rag1* gena istraživanih vrsta *Squalius* jadranskoga slijeva
Značenje kratica: N - broj istraživanih sekvenca, S - broj polimorfnih (segregirajućih) mjesta, η - broj mutacija, h - broj haplotipova, Hd - raznolikost haplotipova, π - nukleotidna raznolikost, k - prosjek nukleotidnih razlika

Vrsta	**N**	**S**	**η**	**h**	**Hd**	**π**	**k**
S. illyricus	15	0	0	1	0	0	0
S. squalus	37	30	30	10	0,739	0,00163	2,354
S. svallize	53	8	8	4	0,211	0,00028	0,406
S. tenellus	2	0	0	1	0	0	0

Rezultati unutarpopulacijske analize prikazani su u Tablici 43. Ni za jednu populaciju nije zabilježena velika raznolikost haplotipova *rag1* gena. Umjerena raznolikost haplotipova pronađena je kod populacija vrste *S. squalus* iz Dragonje i Trebišnjice (i Ravnog polja; Hd=0,786), dok je kod populacije iz Pazinčice (i Borutskog potoka) raznolikost haplotipova bila mala (Hd=0,318). Populacije vrste *S. svallize* imaju izrazito nisku raznolikost haplotipova (Hd=0,385), dok populacija iste vrste iz Ljute na čak 26 istraživanih sekvenca posjeduje samo jedan haplotip te raznolikost uopće nije zabilježena. Kod vrste *S. tenellus* također nema zabilježene raznolikosti, ali taj je rezultat najvjerojatnije posljedica malog broja istraživanih sekvenca. Na dovoljnom broju istraživanih sekvenca (15) populacija iz Krke posjeduje isto samo jedan haplotip.

Tablica 43. DNA polimorfizam gena za aktivaciju rekombinacije (*rag1*) jadranskih *Squalius* populacija
Značenje kratica: N - broj istraživanih sekvenca, S - broj polimorfnih (segregirajućih) mjesta, η - broj mutacija, h - broj haplotipova, Hd - raznolikost haplotipova, π - nukleotidna raznolikost, k - prosjek nukleotidnih razlika

Populacija	**N**	**S**	**η**	**h**	**Hd**	**π**	**k**
illyricus_KR	12	0	0	1	0	0	0
squalus_DR	6	1	1	2	0,600	0,00042	0,600
squalus BP/PA	12	21	21	3	0,318	0,00252	3,636
squalus_TR/RA	8	7	7	5	0,786	0,00166	2,393
svallize_NE/TR	21	8	8	4	0,471	0,00069	0,990
svallize_RA	6	0	0	1	0	0	0
svallize_NE/TR/RA	27	8	8	4	0,385	0,00054	0,781
svallize_LJU	26	0	0	1	0	0	0

Genska p-udaljenost prema rag1 genu

Najveće genske p-udaljenosti pronađene su između vrsta *S. squalus* i *S. svallize* (2,8%), dok su najmanje genske p-udaljenosti uočene između vrsta *S. microlepis* i *S. tenellus*, *S. microlepis* i *S. illyricus*, *S. illyricus* i *S. tenellus*, *S. zrmanjae* i *S. svallize*, *S. zrmanjae* i *S. illyricus* te *S. cephalus* i *S. squalus* (0,1%) (Tablica 44). Nerazriješeni haplotip iz Zrmanje pokazuje gensku p-udaljenost od 1,6% u odnosu na drugi dostupan haplotip iz Zrmanje vrste *S. zrmanjae*.

Tablica 44. Genske p-udaljenosti jezgrinog *rag1* gena između istraživanih vrsta *Squalius* Prikazani su rasponi i srednje vrijednosti (u zagradi) genske p-udaljenosti izraženi u postocima. Između vrsta *S. zrmanjae* i *S. microlepis* nije bilo moguće izračunati srednju vrijednost genske p-udaljenosti jer su obje vrste predstavljene samo s jednom sekvencom.

Vrsta	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
S. microlepis (1)								
S. tenellus (2)	0,1 (0,1)							
S. svallize (3)	0,3-0,6 (0,4)	0,3-0,6 (0,4)						
S. squalus (4)	1,0-2,4 (1,2)	1,0-2,4 (1,2)	1,2-2,8 (1,4)					
S. illyricus (5)	0,1 (0,1)	0,1 (0,1)	0,3-0,6 (0,3)	1,0-2,4 (1,1)				
S, zrmanjae (6)	0,2 (-)	0,2 (0,2)	0,1-0,6 (0,2)	1,1-2,5 (1,3)	0,1 (0,1)			
S. cephalus (7)	1,0-1,2 (1,2)	1,0-1,2 (1,2)	1,2-1,6 (1,4)	0,1-1,6 (0,2)	1,0-1,2 (1,1)	1,1-1,3 (1,2)		
RZRM2 (8)	1,5 (1,5)	1,5 (1,5)	1,7-2,0 (1,7)	2,2-2,3 (2,2)	1,5 (1,5)	1,6 (1,6)	2,2-2,4 (2,3)	
RMET1 (9)	1,6 (1,6)	1,6 (1,6)	1,8-2,1 (1,8)	2,0-2,1 (2,1)	1,5 (1,5)	1,7 (1,7)	1,9-2,2 (2,1)	2,2 (2,2)

Unutarvrsne genske p-udaljenosti *rag1* gena prikazane su u Tablici 45. Za vrste *S. zrmanjae* i *S. microlepis* bila je dostupna samo jedna sekvenca za analizu pa se raspon i srednja vrijednost nisu mogli izračunati.

Tablica 45. Unutarvrsne genske p-udaljenosti jezgrinog *rag1* gena jadranskih vrsta *Squalius* Značenje kratice: NA - nije analizirano (dostupna samo jedna sekvenca)

	p-udaljenost
Vrsta	**raspon (srednja vrijednost)**
S. microlepis	NA
S. tenellus	0
S. svallize	0-0,4 (0,05)
S. squalus	0,1-2,5 (0,44)
S. illyricus	0
S. zrmanjae	NA

Genska diferencijacija prema rag1 genu

Testovi genske diferencijacije *rag1* gena izračunati su za populacije iste vrste uz uvjet postojećih višestrukih segregirajućih mjesta, bez kojih se izračun nije mogao napraviti, što je u ovom slučaju vrijedilo samo za vrste *S. svallize* i *S. squalus* (Tablica 46). Naime, za ovaj su gen dobivene još jedino sekvence vrste *S. illyricus* s više lokaliteta, međutim sekvence iz Krke, Prološkog blata i Vrljike nisu imale polimorfna mjesta. Prema *rag1* genu velika statička značajnost prema svim testovima genske diferencijacije dobivena je između *S. svallize* populacija iz Neretve i Trebišnjice (druga ili treća razina st. značajnosti; Snn=0,95). Populacije iste vrste iz Ravnog polja i Trebišnjice pokazale su nešto manju statistički značajnu različitost prema svim izračunatim testovima (druga i prva razina; Snn=0,90). Između *S. squalus* populacija iz Mirne i Pazinčice, Mirne i Dragonje te populacija iz Trebišnjice i Ravnog polja nisu dobivene statistički značajne razlike, što upućuje na sličnost između navedenih populacija. Jedino je između populacija iste vrste iz Dragonje i Pazinčice uočena mala genska različitost prve razine statističke značajnosti u važnijim testovima genske diferencijacije (H_S, H_{ST}, Z, Z*, Snn), s malenom Z vrijednosti (Z=4,13) zbog koje se odbija nulta hipoteza da nema genske različitosti.

Tablica 46. Rezultati statističkih testova genske diferencijacije jezgrinog *rag1* gena između jadranskih *Squalius* populacija
Sivo obojana polja predstavljaju statistički značajne vrijednosti, dok broj zvjezdica označava jačinu statističke značajnosti (*=0,01<P<0,05; **= 0,001<P<0,01; ***= P<0,001). Populacije su nazvane po lokalitetu iz kojeg dolaze, a odvojene su kosom crtom.
Značenje kratica: χ^2, H_S, H_{ST} - statistički parametri diferencijacije između subpopulacija temeljeni na haplotipovima, K_S, K_{ST}, K_S^x, K_{ST}^x Z, Z^x, Snn - statistički parametri diferencijacije između populacija temeljeni na nukleotidnim sekvencama, PA - Pazinčica, BP - Borutski potok, DR - Dragonja, MI - Mirna, TR - Trebišnjica, RA - Ravno polje, NE - Neretva, LJU - Ljuta

Populacije	**χ^2**	**H_S**	**H_{ST}**	**K_S**	**K_{ST}**	**K_S^x**	**K_{ST}^x**	**Z**	**Z^x**	**Snn**
squalus PABP/DR	7,62	0,40 *	0,15 *	2,62	0,04	0,56	0,07	70,78 *	4,13 *	0,71 *
squalus MI/PABP	0,39	0,32	-0,16	3,12	0,001	0,62	-0,16	46,98	3,78	0,73
squalus MI/DR	1,60	0,60	-0,12	0,45	0,16	0,42	-0,12	14,40	2,60	0,63
squalus TR/RA	5,00	0,75	0,05	2,42	-0,01	1,05	0,02	13,58	2,45	0,52
svallize NE/TR	20,00 ***	0,17 ***	0,60 ***	0,80 **	0,17 **	0,21 ***	0,52 ***	71,06 ***	4,18 ***	0,95 ***
svallize RA/NE	0,39	0,10	-0,07	0,09	0	0,07	-0,07	115,72	4,73	0,57
svallize RA/TR	10,00 **	0,17 **	0,72 **	1,40 *	0,16 *	0,35 **	0,49 **	14,25 **	2,51 **	0,90 **
svallize LJU/NERATR	6,52	0,20 *	0,07 *	0,40	0,02	0,19	0,04	679,07 *	6,46 *	0,53

Protok rag1 gena

U Tablici 47 prikazan je izračun protoka gena prema sekvencama *rag1* gena, a napravljen je na 1 000 replikanata. Između svih susjednih *S. squalus* populacija pronađen je veći broj efektivnih migranata po svim testovima, u odnosu na ostale populacije. Osim toga, dva testa (G_{ST} i δ_{ST}) pokazuju veći broj migranata i između populacija vrste *S. svallize* iz Neretve i Ravnog polja, dok ostali testovi ne pokazuju nikakav protok gena.

Tablica 47. Protok gena prema sekvencama jezgrinog *rag1* gena ispitivanih populacija klenova jadranskog slijeva
Značenje kratica: G_{ST}, δ_{ST} i γ_{ST} - koeficijenti genske diferencijacije, Nm - efektivni broj imigranata po generaciji, N_{ST} - procjenitelj protoka gena, F_{ST} - fiksacijski indeks, MI - Mirna, DR - Dragonja, PA - Pazinčica, BP - Borutski potok, TR - Trebišnjica, RA - Ravno polje, NE - Neretva

Populacije	**G_{ST}**	**Nm**	**δ_{ST}**	**γ_{ST}**	**Nm**	**N_{ST}**	**Nm**	**F_{ST}**	**Nm**
squalus MI/DR	0,17	1,20	0,00006	0,20	1,00	0,40	0,38	0,40	0,38
squalus MI/PABP	0,08	3,08	0,00003	0,01	17,50	0,008	29,99	0,008	30,00
squalus PA/BP	0,05	4,50	0,0002	0,10	2,25	0,02	13,49	0,02	13,50
squalus PABP/DR	0,12	1,77	0,0001	0,07	3,23	0,09	2,47	0,09	2,46
squalus TR/RA	0,04	6,00	0,0002	0,13	1,61	-0,02	-14,34	-0,02	-14,50
svallize NE/TR	0,59	0,18	0,0002	0,34	0,49	0,29	0,61	0,29	0,61
svallize RA/NE	0,01	21,12	0	0,02	13,75	0		0	
svallize RA/TR	0,64	0,14	0,0003	0,30	0,58	0,22	0,88	0,22	0,88

5. RASPRAVA

Unatoč brojnim dosadašnjim taksonomskim istraživanjima klenova na ovom području, dobiveni rezultati i dalje upućuju na postojanje neopisanih jedinica i nepotpuno razriješenu taksonomiju. Rezultati ovog istraživanja mijenjaju općenito prihvaćeno saznanje o distribuciji nekih jadranskih vrsta klenova, pa tako i o evolucijskoj prošlosti.

Filogenetički odnosi jadranskih vrsta Squalius i glavni događaji u evolucijskoj prošlosti

Uspoređujući sva četiri ispitivana genska biljega, najbolja filogenetička razlučivost odnosa između jadranskih vrsta *Squalius* dobivena je za mitohondrijski *cyt b* gen, što je i očekivano s obzirom na veću mutacijsku stopu tog gena u odnosu na jezgrine gene. Naime, taj se genski biljeg do sada pokazao vrlo uspješnim u rekonstrukciji monofiletičkih linija europskih vrsta *Squalius* (Brito i sur., 1997., Durand i sur., 1999., Zardoya i sur., 1999., Doadrio i Carmona, 2003., Sanjur i sur., 2003., Doadrio i Carmona, 2006.), što je potvrđeno i ovim istraživanjem za većinu ispitivanih vrsta. Zbog toga će najveći dio diskusije biti posvećen upravo rezultatima dobivenima na temelju mitohondrijskog biljega, dok će o analizi jezgrinih gena biti govora, ali u manjoj mjeri. S druge strane, analiza jezgrinih gena bila je važna za otkrivanje hibridizacijskih događaja koji su također utjecali na oblikovanje evolucijske prošlosti cjelokupnog roda i trenutne genske raznolikosti.

Filogenetička je rekonstrukcija pokazala da istraživani klenovi roda *Squalius* iz Hrvatske i BiH pripadaju dvjema nezavisnim i genski udaljenim grupama, mediteranskoj i *S. cephalus* grupi. Pripadnost prema više filogenetičkih linija upućuje na parafiletičko porijeklo jadranskih vrsta *Squalius*. Prema tome su preci udaljenih vrsta *Squalius* u više navrata kolonizirali rijeke i jezera jadranskog slijeva, što je vrlo slično sa situacijom primijećenom na Pirenejskom poluotoku (Sanjur i sur., 2003., Perea i sur., 2010.). Podaci dobiveni ovim istraživanjem, zajedno s podacima dobivenim od pirenejskih vrsta, potvrđuju hipotezu postupne kolonizacije mediteranskog područja vrstama *Squalius* koja je započela u oligocenu (Doadrio i Carmona, 2003., Levy i sur., 2009., Perea i sur., 2010.). To potvrđuje i velika genska udaljenost između vrsta različitih (velikih) filogenetičkih grupa, što odgovara davnom vremenu njihove divergencije koja se dogodila na prijelazu oligocena u miocen (25,89-19,20 mya). Iz kasnog oligocenskog perioda nema podataka o geodinamici u smislu vikarijantnih događaja s ovih područja, pa se hipotetizira da je osobitost krškog reljefa koji je bio sličan današnjem, ubrzala geografsku izolaciju i proces specijacije na ovom području u tom periodu (Perea i sur., 2010.). S obzirom na hipoteze o porijeklu i kolonizacijskim putevima mediteranskih leuciscina, dobiveni rezultati potvrđuju hipotezu Bănărescua (1992.) o širenju

azijskih slatkovodnih riba riječnim putevima u južne dijelove Europe nakon oligocena. Osim toga, po dobivenim se rezultatima diverzifikacija vrsta *Squalius* događala puno prije mesinske krize saliniteta (MSC; 5,96-5,33 mya) pa se druga hipoteza naglog širenja azijskih predaka preko Mediterana tijekom te jezerske faze Sredozemnog mora (Bianco, 1990.) ne čini vjerojatnom. Jedino se vrijeme divergencije mediteranskih vrsta *S. microlepis*/*S. tenellus* i *S. lucumonis* poklapa s vremenom MSC faze Sredozemnog mora, koja je vjerojatno imala utjecaja na razdvajanje navedenih vrsta. Kao što je do sada i zabilježeno (Perea i sur., 2010.), dobiveni podaci potvrđuju geografsko strukturiranje haplotipova unutar mediteranske grupe na talijansko-jadransku, pirenejsku i grčku skupinu.

Unutar mediteranske filogenetičke grupe na dobivenim filogramima *cyt b* gena vrste pokazuju monofiletičko porijeklo genski udaljenih linija, što znači da trenutna taksonomija unutar ove grupe odgovara molekularnim podacima iz ovog istraživanja. Divergencija jadranskih vrsta od talijanskih i grčkih vrsta te vrsta pirenejskog poluotoka dogodila se tijekom miocena (20,92-14,56 mya). Dobiveni rezultati djelomično se preklapaju s podacima dobivenima od pirenejskih vrsta, gdje je razdvajanje ovih vrsta uslijedilo nešto kasnije u navedenom periodu, oko 14,6 mya (14,9-10,9 mya) (Perea i sur., 2010.), što se može objasniti upotrebom drugačijeg (opuštenog) molekularnog sata i genskih setova na temelju kojih je napravljena analiza, dok su su podaci o vremenu divergencije iz ovog istraživanja rezultat evolucije isključivo jednog gena (*cyt b*). Uzdizanje Alpa i Pireneja tijekom tog perioda izoliralo je vrste s Mediterana i Pirenejskog poluotoka međusobno i od ostatka središnje Europe (Sušnik i sur., 2001., Stefani i sur., 2004., Perea i sur., 2010.). Osim toga, na prijelazu ranog u srednji miocen, postojao je dinarski jezerski sustav (Harzhauser i Mandic, 2008.), čija je fragmentacija i nestanak ubrzala izolaciju i započela specijaciju na balkanskom području, a pogotovo na dalmatinskom području (Perea i sur., 2010.). Dijeljenje zajedničkog pretka između istraživanih jadranskih vrsta s vrstama iz Grčke, Italije i Španjolske upućuje na perimediteransko širenje predaka današnjih mediteranskih vrsta s početkom u srednjem miocenu, prije MSC perioda. Naime, najbliži zajednički predak vrsta *S. tenellus*/*S. microlepis*, *S. lucumonis* te *S. svallize*/*S. zrmanjae* i *S. illyricus* postojao je pred oko 10,33 mya u gornjem miocenu (13,03-8,01 mya). U tom se periodu (11-10 mya) plitko more Paratetisa koje se rasprostiralo od Alpa do Aralskog mora, fragmentiralo na manje oligohaline bazene (Rögl, 1998.) pa se širenje klenova, osim za vrijeme plitkog Mediterana, moglo odvijati i puno prije putem riječnih kopnenih puteva. Međutim, divergencija vrsta *S. tenellus*/*S. microlepis* od *S. lucumonis* dogodila se u periodu kasnog miocena (5,87 mya), a prethodila joj je mesinska kriza saliniteta koja je najvjerojatnije utjecala na izolaciju i divergenciju spomenutih srodno

bliskih vrsta. Mlađi divergencijski događaji zabilježeni su između dalmatinskih vrsta tijekom srednjeg pliocena (5,20-2,69 mya), kada se vrsta *S. illyricus* odvojila od vrsta *S. svallize* i *S. zrmanjae*. U ovom je periodu zabilježena povećana vlažnost u mediteranskoj regiji (Haywood i sur., 2000.) koja je mogla utjecati na diverzifikaciju spomenutih vrsta tijekom kolonizacije novoformiranih slatkovodnih staništa nakon mesinske krize saliniteta. Divergencija najmlađih vrsta unutar mediteranske grupe odvijala se tijekom pleistocena, kada se vrsta *S. tenellus* odvojila od vrste *S. microlepis*. U doba pleistocenskog razdoblja nije zabilježen poseban geološki događaj s kojim bi se povezala divergencija spomenutih vrsta, ali zna se da je geološka aktivnost na tom području bila vrlo intenzivna te se smatra da su pleistocenske glacijacije utjecale na trenutnu distribuciju pojedinih leuciscinskih vrsta (Perea i sur., 2010.).

Nasuprot tome, unutar *S. cephalus* grupe naziru se mnogo složeniji odnosi koji i dalje zahtijevaju sistematsku reviziju. Naime, u ovoj grupi izdvojila se nova filogenetička linija iz Trebišnjice i Ravnog polja, čiji status treba taksonomsku reviziju. Osim toga, parafiletičke odnose pokazuju vrste *S. cephalus*, *S. squalus*, *S. peloponensis* i *S. lepidus*. Iako su na stablu parafiletičkog porijekla, ipak se smatra se da su te vrste monofiletičkog porijekla, a da su drugi razlozi, poput neriješene taksonomije i krive identifikacije uzoraka, odgovorni za ovakav rezultat. Osim toga, i međuvrsna hibridizacija koja se događala kroz evolucijsku prošlost unutar grupe, dodatno komplicira odnose. Na primjer, kod vrste *S. squalus* uočeno je grupiranje *cyt b* sekvenca uzoraka iz Ljute, Trebišnjice i Ravnog polja, kao posljedica hibridizacijskih događaja između vrsta *S. squalus* i *S. svallize*. Dodatno, kod jezgrinog *rag1* gena u jednoj jedinki iz Drave koja morfološki odgovara vrsti *S. cephalus*, pronađen je *S. squalus* haplotip. Nadalje, sekvence iz areala vrste *S. janae* (Dragonja, Pazinčica, Boljunšćica) pripale su filogenetičkoj liniji vrste *S. squalus*, što upućuje na pogrešku u dosadašnjoj taksonomiji, pa prema dobivenim molekularnim podacima ispada da vrsta *S. janae* nije validna vrsta, već se taj naziv može koristiti kao mlađi sinonim vrste *S. squalus*. Od vrsta iz banke gena unutar filogenetičke linije vrste *S. squalus* izdvojili su se i talijanski haplotipovi vrsta *S. cephalus* i *S. albus* za koje je teško utvrditi je li to izdvajanje posljedica krive determinacije vrsta ili međuvrsne hibridizacije, no u svakom slučaju te jedinke sadrže mitohondrijski DNA vrste *S. squalus*. Unutar ove grupe izdvojili su se i haplotipovi iz Drave, koji se izdvajaju u zasebnu filogenetičku liniju vrste *S. cephalus*. Iako su dio crnomorskog slijeva koji nije dio ovog istraživanja, zanimljivo je napomenuti da se ni jedan hrvatski *S. cephalus* haplotip nije izdvojio u liniju s drugim *S. cephalus* haplotipovima preuzetim iz banke gena, već je srodniji s grčkom vrstom *S. vardarensis*. Međutim, hrvatski haplotipovi spomenute vrste dijele zajedničkog pretka sa španjolskim haplotipovima vrste *S. cephalus*,

dok s vrstama iz Italije, Njemačke i Francuske pokazuju veću gensku udaljenost (5,2%, 5,9%, 6,9% vs 4,6%) i gotovo nikakvu srodnost. Parafiletički odnosi srednjoeuropskih i hrvatskih vrsta *S. cephalus* mogu biti posljedica različitih kolonizacijskih ruta navedenih predstavnika zbog utjecaja zadnjih pleistocenskih glacijacija i uzdizanja Alpa u vremenu kada su se izdvojile te hrvatske vrste, što ih je izoliralo od ostatka središnje Europe (Perea i sur., 2010.).

Razdvajanje vrsta unutar *S. cephalus* grupe započinje u srednjem miocenu, pred 17,32-12,17 mya, što se može povezati s tzv. spektakularnom miocenskom radijacijom vrsta, kada je zabilježen velik rast novonastalih vrsta i bioraznolikosti općenito (Harzhauser i Mandic, 2008.). U razdoblju gornjeg miocena (7,81 mya) došlo je do divergencije između grčke vrste *S. peloponensis* i glavne razvojne linije vrste *S. squalus.* Nova izdvojena filogenetička linija iz Trebišnjice i Ravnog polja odvojila se od glavne razvojne linije vrste *S. squalus* u gornjem pliocenu (3,68 mya). U isto su se vrijeme razdvojile i vrste *S. illyricus* i *S. svallize*/*S. zrmanjae* unutar mediteranske grupe. U tom je periodu povećana vlažnost pokrenula diverzifikaciju leuciscina na različitim mediteranskim poluotocima (Haywood i sur., 2000., Perea i sur., 2010.), što je potvrđeno i dobivenim rezultatima. Na prijelazu pliocena u pleistocen na istraživanom području zamijećena je velika geološka aktivnost (Stanley i Wezel, 1985.), što je najvjerojatnije utjecalo na divergenciju navedenih vrsta u tom periodu. U razdoblju između srednjeg i kasnog pleistocena novoizdvojena monofiletička linija iz Trebišnjice i Ravnog polja divergirala je od sestrinske vrste *S. prespensis* (0,78 mya). Zanimljivo je napomenuti kako je ta linija srodnija vrsti *S. prespensis* iz Grčke nego *S. squalus* jedinkama nađenima na istom lokalitetu.

Za razliku od mediteranske grupe, u *S. cephalus* grupi nije primijećeno geografsko strukturiranje haplotipova zbog složenosti odnosa unutar grupe. Jedino je primijećeno djelomično geografsko strukturiranje populacija vrste *S. squalus*, na što je moglo utjecati naglo širenje vrsta uslijed pleistocenskih glacijalnih utjecaja, koje je djelomično prisutno kod navedene vrste čiji se haplotipovi grupiraju na one iz južne Dalmacije (LJUT1-LJUT3, TRE3) i djelomično na sjeverne iz Istre (IST3-IST4), dok se haplotipovi iz Visovca (VIS1-VIS3) i Istre preklapaju (IST1-IST2, IST5), a jedan je haplotip koji je zastupljen u srednjoj Dalmaciji (Visovac) čak pronađen i u istarskim jedinkama (VIS1).

S obzirom na predložen mogući evolucijski scenarij, izgleda da je alopatrijska specijacija, uzrokovana dugotrajnom izolacijom vodenih sustava, glavna sila diverzifikacije jadranskih *Squalius* vrsta. Osim toga, pojava hibridizacije također je utjecala na trenutnu distribuciju i filogenetičke odnose istraživanih vrsta *Squalius*, pogotovo unutar *S. cephalus* grupe, ali u manjoj mjeri. Takav je nalaz u skladu s prethodnim istraživanjima slatkovodnih

riba jadranskog slijeva i južne Europe (Dubut i sur., 2012., Buj i sur., 2015a., Buj i sur., 2017.). U svakom slučaju, vremena divergencije jadranskih vrsta odgovaraju hipotezi postupnog koloniziranja mediteranskog područja, počevši od oligocenskog perioda kada je krenuo prvi kolonizacijski val (Levy i sur., 2009., Perea i sur., 2010.). Fragmentacija Paratetisa na manje oligohaline bazene u gornjem miocenu i mesinska kriza saliniteta tijekom miocena također utječu na divergenciju pojedinih vrsta, nakon čega povećanje vlažnosti na početku pliocena (5,3-2,58 mya) i punjenje Sredozemnog mora slatkom vodom iz Paratetisa donosi novi kolonizacijski val i izolaciju novih formiranih slatkovodnih vrsta. Naposljetku, pleistocenske glacijacije (mlađe od 2,58 mya) određuju trenutnu distribuciju europskih leuciscina (Perea i sur., 2010.).

Prema *cyt b* genu najstarija je jadranska datirajuća filogenetička linija ona mediteranske vrste *S. illyricus,* koja se odvojila najranije, tijekom gornjeg pliocena (5,20-2,69 mya), dok su ostale filogenetičke linije divergirale poslije, tijekom pleistocena (2,16-0,78 mya). Najmlađa datirajuća je nova izdvojena filogenetička linija *S.* sp TR/RA koja je divergirala najkasnije od svih, u pleistocenu (0,78 mya).

Nepodudaranje rezultata između genskih biljega

Glavni razlozi za nepodudaranje topologija i razlučivosti filogenetičkih stabala različitih genskih biljega, posebice između mitohondrijskog *cyt b* gena i jezgrinih genskih biljega, mogu se pripisati različitoj filogenetičkoj učinkovitosti pojedinog gena, koja ovisi o brzini mutacijske stope ispitivanih gena i količini parsimonijski informativnih mjesta. Na filogenetičku učinkovitost utječu i prošli događaji međuvrsne hibridizacije, nepotpuno razvrstavanje linija ili prisutstvo ancestralnih polimorfizama detektiranih u jezgrinim genima. Veća brzina mutacije mitohondrijskog *cyt b* gena očekivano je omogućila bolju učinkovitost u utvrđivanju filogenetičkih odnosa između jadranskih vrsta roda *Squalius*. Slično je potvrđeno i u drugim istraživanjima predstavnika potporodice Leuciscinae (Brito i sur., 1997., Durand i sur., 1999., Zardoya i sur., 1999., Doadrio i Carmona, 2003., Sanjur i sur., 2003., Doadrio i Carmona, 2006., Perea i sur., 2010.). Od jezgrinih biljega, *rag1* gen i nekodirajući intron gena za S7 dali su podjednaku učinkovitost u rezultatima, te su pokazali puno veću filogenetičku razlučivost u odnosu na *rhod* gen. Navedeni su biljezi imali gotovo dvostruko više informativnih mjesta, puno veću dužinu filogenetičkog stabla i manji konzistencijski indeks u odnosu na *rhod* gen, što je rezultiralo većim vrijednostima podržanosti na filogenetičkim stablima. Zbog puno većeg broja istraživanih sekvenca i nukleotida, te manje mogućnosti

pogreške u višestrukom sravnjenju radi nepostojanja praznina (insercija i delecija), kao i zbog veće dužine MP filogenetičkog stabla, *rag1* gen dao je pouzdanije rezultate.

Na filogramima dobivenima filogenetičkom rekonstrukcijom sekvenca *rag1* gena, kao i kod *cyt b* gena, jasno se vidi razdvajanje dviju velikih filogenetičkih grupa. Međutim, za razliku od mitohondrijskog biljega, odnosi unutar velikih grupa nisu potpuno razjašnjeni filogenetičkom rekonstrukcijom *rag1* gena, gdje je primijećeno nepotpuno razvrstavanje linija. Naime, *S. squalus* i *S. cephalus* haplotipovi unutar *S. cephalus* grupe, prema *rag1* genu, nalaze se unutar jedne razvojne linije, gdje je došlo do nepotpunog razvrstavanja linija, s obzirom na to da se smatra da su te vrste zasebnog monofiletičkog porijekla. Isto je uočeno i unutar pripadnika mediteranske grupe, točnije vrsta *S. microlepis, S. illyricus, S. tenellus* i *S. zrmanjae*. Filogenetičkom rekonstrukcijom *rag1* gena nije potvrđeno ni izdvajanje nove filogenetičke linije iz Trebišnjice i Ravnog polja, već su sve odgovarajuće sekvence posjedovale haplotipove vrste *S. squalus*, dok je jedna sekvenca posjedovala *S. svallize* haplotip. Prema *rag1* genu izdvajaju se dva nerazriješena haplotipa iz Zrmanje i Neretve. Nadalje, kod jedne jedinke iz Pazinčice, jedan se alel razlikovao velikim brojem mutacija u odnosu na druge s istog područja, dok je drugi alel bio tipičan za vrstu *S. squalus*. Iako je ta jedinka morfološki prepoznata kao vrsta *S. janae*, njezini se haplotipovi ipak ne izdvajaju izvan *S. squalus* filogenetičke linije. Nerazriješeni haplotip iz Neretve identičan je s haplotipom leuciscidne endemske neretvanske vrste *Chondrostoma knerii* (Schönhuth i sur., 2018.). Potrebno je istaknuti da je ista jedinka i kod introna gena za S7 posjedovala haplotip najsličniji vrstama roda *Chondrostoma* (99% sličnosti), dok za ostale biljege nije bilo sekvenca za analizu, zbog čega nije moguće utvrditi radi li se o kakvom hibridu, a moguće je da je došlo i do pogreške prilikom uzorkovanja. Drugi nerazriješeni *rag1* haplotip pronađen je u Zrmanji, kod jedinke koja je morfološki prepoznata kao vrsta *S. zrmanjae* (što je potvrđeno i s *cyt b* haplotipom) i koja je osim tipičnog alela za navedenu vrstu, imala drugi alel koji je vrlo sličan leuciscidnim vrstama roda *Delminichthys* (99%). Rod *Delminichthys* endemičan je rod predstavljen s četirima vrstama koje žive u području dinarskog krša (Mustafić i sur., 2017.), međutim nikad nije zabilježen na području Zrmanje. S obzirom na tu činjenicu, objašnjenje ovakvog rezultata može se tražiti u ostanku ancestralnih polimorfizama. Naime, moguće je da su drevni leuciscidni geni (koji su prvi divergirali i ostali u najstarijim linijama) ostali u manjoj frekvenciji unutar nekih populacija roda *Squalius.* Naime, linija *Delminichthys* prepoznata je kao najstarija linija unutar potporodice Leuciscinae (Perea i sur., 2010.). Druga moguća pretpostavka koja objašnjava ovu situaciju, može se tražiti u prošlim hibridizacijskim događajima, ali budući da je područje rasprostranjenosti vrsta roda *Delminichthys* oduvijek

odvojeno od areala vrste *S. zrmanjae* (iako kolonizacijske rute još nisu utvrđene za sve populacije), taj je scenarij manje vjerojatan. U svakom slučaju, 99%-tna sličnost nerazriješenog zrmanjskog alela i alela nalik vrsti *Delminichthys* (0,5-0,8% genske p-udaljenosti) najvjerojatnije je posljedica retencije drevnih gena u sadašnjim vrstama. Dobiveni su rezultati u skladu s nezavisnim evolucijskim putevima dviju navedenih vrsta.

Hibridi unutar jadranskih vrsta roda Squalius

Hibridizacija može imati veliku ulogu u evolucijskoj prošlosti slatkovodnih riba (Kottelat i Freyhof, 2007.), zbog čega je bilo važno uočiti hibridizacijske tragove u genomu jadranskih *Squalius* vrsta. Tragovi hibridizacijskih događaja prisutni su u genskom sastavu nekoliko jadranskih *Squalius* vrsta. Hibridizacija je zabilježena u jednoj cijeloj populaciji vrste *S. svallize* iz Ljute, gdje su sve jedinke sadržavale mitohondrijski DNA vrste *S. squalus*, za razliku od jezgrinog DNA koji je bio tipičan za vrstu *S. svallize*. S obzirom da u Ljutoj trenutno živi samo vrsta *S. svallize*, hibridizacija se morala dogoditi prije nego što su preci današnje populacije kolonizirali rijeku. Ista je situacija pronađena i kod jedne jedinke iz Visovca, koja je imala mitohondrijski genom tipičan za vrstu *S. squalus*, dok je haplotip introna gena za S7 tipičan za vrstu *S. svallize* kojeg jedinka dijeli sa sekvencama iz Ljute. Na žalost, za druge jezgrine biljege nije bilo dostupnih sekvenca s tog lokaliteta. Na području Visovca inače obitavaju vrste *S. illyricus* i *S. squalus*, ali postoje stariji nalazi koji govore o prisutnosti vrste *S. svallize* u Krki (Vuković i Ivanović, 1971.), što je poslije opovrgnuto (Bogutskaya i Zupančič, 1999.). Ovakav rezultat mogao bi biti posljedica davnih hibridizacijskih događaja zbog nekadašnjeg većeg areala vrste *S. svallize* (Mrakovčić i sur., 2006.), koji do sada nikada nije bio potvrđen. Osim toga, objašnjenje ovakvog rezultata moguće je i zbog prisutstva ancestralnih polimorfizama, s obzirom na to da je haplotip pronađen na širem geografskom području. Budući da se radi samo o jednoj istraživanoj jedinki za jedan genski biljeg, te da je veća mogućnost pogreške u višestrukom sravnjenju introna gena zbog primijećenih insercija i delecija, ovaj bi se rezultat trebao potvrditi na većem broju uzoraka i jezgrinih genskih biljega. Nadalje, u Krki je pronađena jedinka morfološki prepoznata kao vrsta *S. illyricus*, što je potvrđeno i prema jezgrinim genskim biljezima *rag1* i S7, ali s introgresijom mtDNA vrste *S. zrmanjae*. Budući da u Krki obitavaju obje navedene vrste, hibridizacija je vjerojatno prisutna i danas. U Zrmanji je kod dviju jedinki pronađen mtDNA vrste *S. illyricus*. Budući da se područje rijeke Zrmanje više ne smatra područjem obitavanja vrste *S. illyricus*, nego samo vrste *S. zrmanjae*, introgresija mtDNA vjerojatno je rezultat prošlih hibridizacijskih događaja između navedenih vrsta, dok

su vrste zajedno obitavale na istom području. Hibridne su jedinke još pronađene u Trebišnjici i Ravnom polju, gdje trenutno žive tri genski udaljene jedinice: *S. svallize*, *S. squalus* i *S.* sp. TR/RA. Budući da su sva tri taksona još uvijek prisutna na tim lokalitetima, u vidu roditeljskih i hibridnih populacija kako je dobiveno istraživanjem, hibridizacija je najvjerojatnije prisutna i danas.

Čini se da su svi navedeni hibridi nastali kao posljedica prirodnih okolnosti, a ne ljudskog utjecaja, pa se može reći da fenomen hibridizacije ima važnu ulogu u bioraznolikosti jadranskih *Squalius* vrsta.

Taksonomski doprinos

Dobiveni rezultati i dalje upućuju na to da bi se sva taksonomska istraživanja trebala temeljiti i na morfološkim i na molekularnim genskim biljezima. Morfološka determinacija često dovodi do nejasne taksonomije i ne prikazuje sve postojeće jedinice unutar istraživanog roda, što je slučaj i kod jadranskih vrsta roda *Squalius*, s obzirom na mnoštvo različitih vrsta koje su tijekom povijesti opisane za pojedine lokalitete. Iako su pojedine istarske jedinke genski odskakale unutar vrste *S. squalus*, ni jedan od istraživanih genskih biljega nije ukazao na postojanje vrste *S. janae* kao zasebne taksonomske jedinice, kako su predložili Bogutskaya i Zupančič (2010.). Prema dobivenim podacima iz ovog istraživanja proizlazi da vrsta *S. janae* nije validna vrsta pa se predlaže da se taj naziv koristi kao mlađi sinonim vrste *S. squalus*. S druge strane, nekoliko se jedinki iz Trebišnjice i Ravnog polja razlikuje prema *cyt b* genu od vrste *S. squalus* s kojom žive, te se izdvajaju u zasebnu filogenetičku liniju, dijeleći zajedničkog pretka s vrstom *S. prespensis*. Divergencija od sestrinske vrste *S. prespensis* dogodila se nedavno, što se zaključuje usporedbom s drugim prikazanim divergencijama na stablu. Srodnost spomenutih haplotipova s grčkim *S. prespensis* haplotipom, pa i izdvajanje u novu filogenetičku liniju, upućuje na potrebu revizije populacije iz Trebišnjice i Ravnog polja koja bi uključila i detaljnu analizu morfoloških karakteristika. Takvo je istraživanje potrebno u svrhu otkrivanja identiteta genski udaljene jedinice na razini vrste ili ispod razine vrste, ne isključujući mogućnost introdukcije strane vrste u Trebišnjicu i Ravno polje koja bi potencijalno mogla biti i invazivna za autohtone vrste. Takvi su zaključci veoma važni za donošenje adekvatnih mjera zaštite klenova povezanog sustava rijeka Neretve i Trebišnjice.

Rasprostranjenost Squalius vrsta u rijekama jadranskog slijeva

Rezultati ovog istraživanja mijenjaju općenito prihvaćeno saznanje o distribuciji nekih jadranskih vrsta klenova. Uzorci koji su pripadali vrsti *S. zrmanjae* pronađeni su u Zrmanji gdje je vrsta bila očekivana, te u Ričici (lokalitet Lika) gdje do sada nikada nije bila zabilježena. Zbog toga se pretpostavlja da Ričica nije dio prirodnog područja rasprostranjenosti te vrste, koja je u ličke predjele došla najvjerojatnije vodama kroz reverzibilnu hidroelektranu Orlovac koja odvodi vodu iz Zrmanje u Ričicu. Jedini haplotip vrste *S. zrmanjae* iz Krke pronađen je u hibridne jedinke, morfološki prepoznate kao vrsta *S. illyricus*.

Područje rasprostranjenosti vrste *S. illyricus* obuhvaća sljevove rijeka Cetine i Krke u Hrvatskoj (Kottelat i Freyhof, 2007., Ćaleta i sur., 2015.), a postoje i stariji nalazi koji govore i o slijevu rijeke Soče (Heckel i Kner, 1858.). Prema analizama sekvenca *cyt b* gena ovim je istraživanjem potvrđeno obitavanje vrste *S. illyricus* u Krki i Cetini. Iznenađujuće, tri su jedinke iz Boljunšćice kod analize *cyt b* gena posjedovale *S. illyricus* haplotip kojeg su dijelile sa sekvencama iz Cetine, Visovca i Zrmanje. Na žalost, ni jedna sekvenca iz Boljunšćice nije bila dostupna za analizu jezgrinih gena. Do sada su jednom zabilježene jedinke iz Istre kao vrste *S. zrmanjae* ili *S. illyricus* (Bogutskaya i Zupančič, 1999.), koje poslije Bogutskaya i Zupančič ipak opisuju kao novu vrstu *S. janae* (Bogutskaya i Zupančič, 2010., Zupančič i sur., 2010a.), s distribucijom na području Dragonje, Boljunšćice i Pazinčice. Posjedovanje *S. illyricus* haplotipa kod sekvenca iz Boljunšćice mogla bi biti genska retencija nekadašnje sjeverne filogenetičke linije vrste *S. illyricus* koja je davno, još pred više od 150 godina zabilježena u slijevu Soče (Heckel i Kner, 1858.). Prisutstvo *S. illyricus* u Istri, uz stariji nalaz iz Soče, upućuje na to da se nekada vrsta prostirala na širem području jadranskog slijeva na sjeveru, a areal joj se s vremenom očito smanjio, najvjerojatnije zbog značajnog ljudskog utjecaja na ovom području. Osim navedenih rijeka, *cyt b* haplotip vrste *S. illyricus* (ILI1) pronađen je i u rijeci Zrmanji, najvjerojatnije kao posljedica prijašnjih hibridizacija.

Dobiveni rezultati potvrđuju obitavanje vrste *S. microlepis* u Prološkom blatu (Ćaleta i sur., 2015.), a očekivano je vrsta pronađena i u Vrljici jer se rijeka Vrljika nakon poniranja u Hrvatskoj ponovo pojavljuje kao rijeka Tihaljina u BiH, gdje je do sada i zabilježena (Kottelat i Freyhof, 2007.). Iako postoje zapisi o obitavanju ove vrste u Neretvi (Ćaleta i sur. 2015.), podaci iz ovog istraživanja to ne potvrđuju na većem broju istraživanih uzoraka s tog lokaliteta. Ovim istraživanjem nije obuhvaćen cjelokupni areal ove vrste pa bi za zaključak o stvarnom rasprostranjenju vrste u daljnjim istraživanjima trebalo obuhvatiti i ostala staništa u Hrvatskoj i BiH (Matica, Baćinska jezera, Tihaljina, Trebižat).

Vrsta *S. tenellus* pronađena je jedino u Rudi, što je u skladu s dosadašnjim saznanjima (Ćaleta i sur., 2015.). Područje rasprostranjenosti ove vrste inače je veće i obuhvaća krška polja i jezera u BiH (Livanjsko polje, Buško blato i Mandečko jezero) koja nisu bila uključena u ovo istraživanje, a koja bi ubuduće trebala biti uvrštena kako bi se dobio uvid u trenutno stanje areala ove vrste.

Vrsta *S. svallize* dosad je pronađena u rijeci Ljutoj (Kosić, 1903.), u Istri (Leiner i sur., 1995.), Neretvi, Hutovom blatu, Trebišnjici i Matici (Bogutskaya i Zupančič, 1999., Ćaleta i sur., 2015.). Prema podacima iz ovog istraživanja rasprostranjenost vrste *S. svallize* potvrđena je u Neretvi, Trebišnjici i Hutovom blatu, dok je prema jezgrinim biljezima potvrđeno obitavanje i u rijeci Ljutoj (hibridna populacija). U Neretvi i Hutovom blatu obitava jedino vrsta *S. svallize,* dok je na lokalitetima Trebišnjice i Ravnog polja, osim spomenute vrste, pronađena i vrsta *S. squalus,* uz još jedan takson čiji status treba potvrditi. Ovim istraživanjem nije potvrđeno obitavanje svalića u Krki, što je već i prije odbačeno (Bogutskaya i Zupančič, 1999.), iako je jedna jedinka iz Visovca koja je morfološki prepoznata kao vrsta *S. squalus,* što je potvrđeno i prema *cyt b* genu, imala tipičan *S. svallize* haplotip jezgrinog gena za S7. Ovaj bi se rezultat trebao potvrditi na drugim jezgrinim biljezima za koje nije bilo dostupnih sekvenca, zbog mogućih pogrešaka u višestrukom sravnjivanju sekvenca introna za S7, nakon čega bi se donio valjan zaključak.

Geografska je rasprostranjenost, kao i taksonomski status vrste *S. squalus* predmetom mnogih rasprava. Ta je vrsta pokazala najveću geografsku rasprostranjenost u odnosu na sve ostale istraživane vrste, s fragmentiranom distribucijom. Naime, vrsta je pronađena u svim istraživanim istarskim rijekama (Dragonja, Pazinčica, Mirna, Borutski potok, Raša i Boljunšćica prema mtDNA). U Krki je pronađena isključivo na području Visovca. Rezultati su u skladu s dosadašnjim podacima o rasprostranjenosti vrste od Istre do Krke (Freyhof, 2013.). Osim u navedenim rijekama, haplotipovi vrste *S. squalus* pronađeni su i južnije, na području Trebišnjice i Ravnog polja. Zanimljivo je napomenuti da vrsta nije pronađena u glavnim tokovima rijeka Krke i Neretve, već samo na lokalitetima Visovca, Trebišnjice i Ravnog polja.

Od svih istraživanih lokaliteta Trebišnjica (uz Ravno polje) predstavlja vrlo zanimljiv lokalitet jer u njemu koegzistiraju vrste *S. svallize* i *S. squalus,* uz koje se na temelju analize *cyt b* gena u *S. cephalus* grupi izdvojila i genski udaljena filogenetička linija iz Trebišnjice i Ravnog polja, čiji taksonomski status treba potvrdu. Obitavanje triju genski udaljenih jedinica na istom području upućuje na potrebu ekološkog ispitivanja mehanizama koegzistencije triju taksona na jednom području, što je dovoljan razlog za trenutnu i efektivnu zaštitu područja

Trebišnjice i Ravnog polja, a pogotovo zbog velikog ljudskog utjecaja zabilježenog na ovim lokalitetima (poljoprivreda), na koji su, kako se čini po dobivenim rezultatima, klenovi dosta osjetljivi.

Genska raznolikost klenova jadranskog slijeva

Po svim istraživanim genskim biljezima najveća je genska p-udaljenost očekivano zabilježena između vrsta *S. svallize* i *S. squalus*, koje pripadaju različitim velikim filogenetičkim grupama, što je u skladu s davnim vremenom divergencije njihovih predaka (22,48 mya). Davno vrijeme divergencije omogućilo je navedenim vrstama nakupljanje većeg broja različitih mutacija u svojim sekvencama. Općenito, velika je genska p-udaljenost zabilježena između vrste *S. squalus* iz *S. cephalus* grupe u odnosu na vrste iz mediteranske grupe. Također, nova filogenetička linija iz Trebišnjice i Ravnog polja, koja se izdvojila samo prema *cyt b* genu, pokazuje velike genske udaljenosti u odnosu na vrste mediteranske grupe, dok je manja genska udaljenost zabilježena u odnosu na vrstu *S. squalus*. To je u skladu s kasnijom divergencijom taksona *S.* sp. TR/RA od glavne razvojne linije vrste *S. squalus* (3,68 mya). Zanimljivo je istaknuti da je genska p-udaljenost manja između *S.* sp. TR/RA i vrste *S. prespensis*, s kojom pokazuje veću srodnost u odnosu na ostale vrste u *S. cephalus* skupini. Za objašnjenje ovakvog rezultata potrebno je revidirati neimenovanu taksonomsku jedinicu kako bi se utvrdilo o kojoj se vrsti ili podvrsti (ili hibridu) točno radi jer postoji i mogućnost unosa alohtone vrste na tim područjima. Najmanja je genska p-udaljenost zabilježena između vrsta mediteranske grupe, *S. microlepis* i *S. tenellus*, što je u skladu s nedavnim vremenom divergencije tih dviju vrsta (1,37 mya). Unutar mediteranske grupe najveća je genska udaljenost zabilježena između vrsta *S. microlepis i S. svallize* te *S. microlepis* i *S. zrmanjae* (podjednaka vrijednost od 4,9%). Naime, glavne razvojne linije navedenih vrsta divergirale su najranije, u odnosu na druge mediteranske vrste, oko 10,3 mya (13,03-8,01) pa je najveća udaljenost između ovih vrsta u mediteranskoj grupi očekivana. Sličan je rezultat dobiven i između vrste *S. tenellus* i sestrinskih vrsta *S. svallize* i *S. zrmanjae* zbog istih razloga. Ostale su vrste unutar mediteranske grupe pokazale manju gensku udaljenost, u skladu s kasnijim vremenima divergencije.

Izražene razlike u trenutnom obrascu DNA polimorfizama između geografski bliskih i filogenetički srodnih vrsta upućuju na različite demografske prošlosti te ističu moguće različite vjerojatnosti budućeg opstanka pojedinih vrsta. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem pokazali su da razina genskog polimorfizma, nužnog za budući opstanak svake vrste, nije visoka ni u jedne istraživane vrste. Do sada se smatralo da jadranske vrste roda

Squalius imaju visoku gensku raznolikost, ali to je zaključeno na cjelokupnoj jadranskoj liniji vrsta roda *Squalius* kao istraživanoj jedinici, pa je takav rezultat najvjerojatnije odraz dubokog strukturiranja unutar samog roda (Durand i sur., 1999.). Ovakav je rezultat neočekivan i zabrinjavajući, pogotovo iz razloga što je ovim istraživanjem obuhvaćeno područje južne Dalmacije koje je inače središte velike bioraznolikosti, s obzirom na povijesni refugijalni status u glacijalno doba i povoljne ekološke uvjete koji su omogućili nesmetan razvoj vrsta (Marjanac i Marjanac, 2004.). Naime, druge dalmatinske vrste šaranki s istih područja (red Cypriniformes), kao što su vrste *Telestes* (Buj i sur., 2017.) i *Cobitis* (Buj i sur., 2015b.), pokazuju veliku gensku raznolikost. S obzirom na iste ekološke uvjete u kojima navedene vrste žive, drugačija situacija kod klenova može upućivati na njihovu veću osjetljivost na ljudske utjecaje izražene na ovom području. Bez obzira na to što se genska raznolikost trenutno ne uzima u obzir prilikom donošenja konzervacijskih strategija, dobiveni su rezultati za pojedine vrste zabrinjavajući pa bi se trebali uzeti u obzir prilikom donošenja akcijskih planova zaštite.

Ni za jedan istraživani gen nije primijećena velika raznolikost haplotipova. Iako je predstavljena s malim brojem sekvenca, najveća je raznolikost *cyt b* haplotipova uz veliku nukleotidnu raznolikost zabilježena za vrstu *S. microlepis* iz Prološkog blata i Vrljike. Budući da je na MJ filogenetičkoj mreži primijećeno odvajanje jedne grane iz Prološkog blata od ostalih grana iz Vrljike, s najmanje četiri mutacijska događaja razlike (više nego u drugih istraživanih vrsta), velika bi raznolikost haplotipova mogla biti rezultat strukturiranja unutar vrste. Naime, jedan su haplotip dijelile sekvence iz Vrljike i Prološkog blata, ali su druga dva pronađena isključivo na jednom od tih dvaju lokaliteta. Unutarvrsna p-udaljenost za vrstu *S. microlepis* nije bila velika, ali je dovoljna da potvrdi postojanje razlika unutar vrste. Mali broj istraživanih *S. microlepis* sekvenca mogao je utjecati na dobiveni rezultat pa bi se za donošenje bilo kakvih zaključaka trebalo ponoviti istraživanje na većem broju uzoraka. Moguće je da vrsta *S. microlepis* obuhvaća dvije evolucijski značajne jedinice, što zahtijeva daljnja istraživanja, pogotovo na ostatku areala vrste u krškim rijekama BiH.

Unutar istraživanih vrsta najveća je genska p-udaljenost zabilježena unutar vrste *S. squalus* za sve istraživane gene, što se može objasniti njezinom širokom i fragmentiranom geografskom distribucijom (Istra, Visovac-Krka, južna Dalmacija i Hercegovina). Iako je najveća zabilježena, genska je udaljenost unutar te vrste manja od očekivane. Slična je situacija zabilježena kod raznolikosti haplotipova, gdje je uočena umjerena raznolikost *cyt b*, *rhod* i *rag1* haplotipova vrste *S. squalus*. Umjerena genska raznolikost vjerojatno je rezultat trenutnog raspodjeljivanja i strukturiranja unutar vrste. Najveća raznolikost haplotipova

pronađena je kod populacije vrste *S. squalus* iz Dragonje, dok je populacija iz Pazinčice (i Borutskog potoka) sadržavala samo jedan haplotip na dovoljnom broju analiziranih sekvenca (17 sekvenca). Budući da je u rijeci Pazinčici prisutan povećan antropološki utjecaj u vidu kemijskog zagađenja te uređivanja korita radi poljoprivrede, genska se istovjetnost ove populacije povezuje s pojačanim antropogenim utjecajem. Ovakav rezultat upućuje na to da bi navedenu populaciju zajedno s njezinim staništem trebalo uvrstiti u buduće konzervacijske planove. Svi testovi genske diferencijacije prema *cyt b* genu pokazali su veliku različitost između populacije iz Boljunšćice i populacija ostalih istarskih rijeka (gdje je Snn vrijednost iznosila jedan). Izuzetak je populacija iz Raše koja se ne razlikuje od populacije iz Boljunšćice po niti jednom testu (Snn=0,73). Ovakav se rezultat može objasniti izoliranošću istarskih rijeka i nekadašnjim utjecanjem Boljunšćice u Rašu (Božičević, 2005.). Najveća je genska razlika između *cyt b* sekvenca prema fiksacijskom indeksu (i prema testovima genske diferencijacije gdje je izračunata treća razina st. značajnosti za sve testove) zabilježena između *S. squalus* populacija iz Boljunšćice i Pazinčice (F_{ST}=0,95), što ukazuje na to da te dvije populacije najvjerojatnije nisu potekle od zajedničkog pretka i da su kolonizirale svoja staništa neovisno jedna o drugoj. Populacije iz Dragonje i Pazinčice te Raše i Pazinčice međusobno su pokazivale manje statistički značajnu diferencijaciju, dok se populacije iz Raše, Dragonje i Mirne međusobno ne razlikuju. Između istarskih populacija zabilježen je mali protok *cyt b* gena iz Mirne u Pazinčicu prema svim napravljenim testovima, dok je prema *rag1* genu zabilježen puno veći protok između navedenih populacija (Nm_{NST}=30; Nm_{FST}=30). Budući da su ove dvije rijeke izolirane, ovakav je rezultat vjerojatno dobiven zbog velike genske sličnosti dviju populacija koje su nekoć činile jednu populaciju. Izrazito velik protok *cyt b* gena (Nm_{NST}=-638,5) zabilježen je između populacija iz Pazinčice i Raše, koje ne pokazuju nikakvu gensku razliku prema F_{ST} indeksu, no to nije potvrđeno ostalim testovima. Na takav rezultat vjerojatno je utjecao mali broj analiziranih uzoraka iz Raše koji su pokazali veliku raznolikost haplotipova. Istraživanje bi trebalo ponoviti na većem broju uzoraka i genskih biljega jer za ovo istraživanje nije bilo dostupnih sekvenca jezgrinih gena iz Raše. U daljnjim bi istraživanjima trebalo obuhvatiti i talijanske populacije kako bi se ustanovila stvarna raznolikost vrste kroz cijelo sjeverno područje rasprostranjenosti. Južne populacije vrste *S. squalus* iz Visovca (Krka), Trebišnjice i Ravnog polja pokazuju umjerenu raznolikost haplotipova. Između populacija iz Ljute i Trebišnjice te Trebišnjice i Ravnog polja nije zabilježena značajna genska diferencijacija. To potvrđuje i velika sličnost populacija iz Trebišnjice i Ravnog polja (F_{ST}=0). Između lokaliteta Trebišnjice i Ravnog polja zabilježen je mali protok gena prema sekvencama *cyt b* gena, dok je *rag1* gen pokazao puno veći protok

gena. Razlika između mitohondrijskog i jezgrinog protoka gena najvjerojatnije je vezana uz specifičnost i različitost istraživanih lokusa, odnosno uz manje prosječno vrijeme koalescencije i isključivo maternalno nasljeđivanje mtDNA (Zou i sur., 2013.). Zanimljivo je istaknuti da populacija iz Krke nije pokazala razlike u odnosu na populaciju iz Raše ni po jednom testu. To ukazuje na zajedničko porijeklo i nekadašnju pripadnost jednoj populaciji, nakon čega je najvjerojatnije došlo do fragmentacije staništa uslijed podizanja morske razine u holocenu. Tako je, na primjer, dokazana i periodična povezanost talijanske rijeke Po i Zrmanje tijekom glacijacija kada je razina morske vode bila puno niža nego danas (Surić i Juračić, 2010.).

Niska raznolikost haplotipova vrste *S. svallize* zabilježena je kod svih analiziranih gena. Naime, 22 istraživane *cyt b* sekvence ove vrste posjeduju pet haplotipova, dok 53 analizirane *rhod* sekvence posjeduju samo dva haplotipa, a kod brže evoluirajućeg *rag1* gena 27 analiziranih sekvenca posjeduje samo četiri haplotipa s niskom raznolikosti. Tako niska genska raznolikost nije očekivana za stariju vrstu kakva je *S. svallize*, koja je duže vrijeme prisutna na ovim prostorima, pa je ovakav rezultat vrlo zabrinjavajući. S obzirom na to da je ova vrsta lokalizirana na području južne Dalmacije koja je u doba glacijacija predstavljala refugij sa stabilnim ekološkim uvjetima (Marjanac i Marjanac, 2004.), što je omogućilo nesmetan razvoj južnih populacija (Buj i sur., 2015a.), očekivala se veća raznolikost klenova s tog područja. Do male genske raznolikosti mogao je dovesti značajan ljudski utjecaj na području rasprostranjenja vrste. Kod drugih vrsta riba s istog područja, poput *Cobitis narentana* Karaman, 1928, primijećena je puno veća genska raznolikost (Buj i sur., 2015b.), što ponovo potvrđuje veću osjetljivost klenova na antropološke utjecaje koji su vezani za poljoprivredni kraj okolice Neretve i Trebišnjice (zagađenja pesticidima, regulacija rijeka i melioracije) u odnosu na druge vrste riba. S obzirom na smanjenu gensku raznolikost i manje područje rasprostranjenosti, procjena ugroženosti za vrstu *S. svallize*, koja trenutno nosi status osjetljive vrste, trebala bi se ponovo revidirati uzimajući u obzir i dobivenu procjenu niske genske raznolikosti. Populacija vrste *S. svallize* iz neretvanskog slijeva pokazuje malu raznolikost haplotipova svih ispitivanih gena (*cyt b*: *rhod*:*rag1*=0,386 vs.0,480 vs. 0,385), dok populacija iz Ljute pokazuje još i manju raznolikost (0,228 vs. 0,442 vs. 0). Osim toga, između *S. svallize* populacija iz Neretve i Trebišnjice po *cyt b* i *rhod* genu zabilježen je veći protok gena u oba smjera, uz vrlo mali zabilježeni koeficijent genske diferencijacije te niski fiksacijski indeks, što potvrđuje veliku sličnost među populacijama (slične frekvencije alela unutar populacija). Gen za aktivaciju rekombinacije pak upućuje na vrlo mali protok gena bez genskog razlikovanja populacija, te je razlika u rezultatima između genskih biljega vjerojatno

rezultat specifičnosti ispitivanog lokusa. Budući da ovim istraživanjem nije obuhvaćen cijeli areal vrste, potrebno je ustanoviti cjelokupni areal vrste u Baćinskim jezerima i jezerima pored Vrgorca te u rijekama Rami i Buni u BiH. Malu gensku raznolikost vrste *S. svallize* trebalo bi uzeti u obzir kod procjene o daljnjim ljudskim aktivnostima na tim staništima.

Kod vrste *S. illyricus* zabilježena je umjerena raznolikost *cyt b* haplotipova, dok je kod *rag1* gena prisutan samo jedan haplotip. S obzirom na duže postojanje vrste (od prije 3,87 mya) i široku geografsku rasprostranjenost, za ovu se vrstu također očekivala puno veća unutarvrsna genska p-udaljenost. To je neočekivano niska raznolikost koja upućuje na hitno donošenje konzervacijskih planova za tu vrstu. Bez obzira na širu geografsku rasprostranjenost, unutarvrsno geografsko strukturiranje nije primijećeno pa se ovakav nalaz pripisuje ljudskom utjecaju, slično kao i kod vrste *S. svallize*. Uspoređujući drugu ciprinidnu vrstu *C. dalmatina* Karaman, 1928 s područja Cetine koja je pokazala veliku raznolikost *cyt b* haplotipova (Buj i sur., 2015b.), manja raznolikost klenova potvrđuje veću osjetljivost klenova na antropogene utjecaje u odnosu na druge vrste. Populacija iz Krke pokazuje duplo nižu raznolikost *cyt b* haplotipa u odnosu na populaciju iz Cetine (0,473 vs. 0,821), dok populacije *S. illyricus* iz Boljunšćice i Zrmanje posjeduju samo jedan *cyt b* haplotip (3 i 4 sekvence). Do niske raznolikosti vjerojatno je doveo antropološki utjecaj na rijeci Krki (hidroelektrane). Genska je različitost između populacija iz Cetine i Krke potvrđena i prema svim testovima genske diferencijacije (svi su testovi s najvećom razinom statističke značajnosti, osim $\chi 2$ testa gdje je uočena druga razina statističke značajnosti). Manja je genska diferencijacija uočena i između populacija Krke i Zrmanje te Krke i Boljunšćice, što je potvrđeno i velikim fiksacijskim indeksom ($F_{STcyt\,b}$=0,83). Nasuprot tome, populacije iz Cetine i Zrmanje ne razlikuju se statistički ni za jedan izračunati test genske diferencijacije, što potvrđuje i niski fiksacijski indeks ($F_{STcyt\,b}$=0,19). Zanimljivo je napomenuti da *S. illyricus* sekvence iz Boljunšćice koje se razlikuju od populacija iz Zrmanje i Krke, značajno ne razlikuju od populacije iz Cetine ni prema jednom parametru. To upućuje na nekadašnju povezanost tih staništa putem kojih su populacije najvjerojatnije širile svoj areal prema jugu, što su mogući ostaci sjeverne razvojne linije vrste *S. illyricus* iz Soče (Bogutskaya i Zupančič, 1999.).

Mala raznolikost haplotipova, uz najmanju izračunatu nukleotidnu raznolikost i najmanju unutarvrsnu p-udaljenost, zabilježena je za vrstu *S. zrmanjae*. Bez obzira na mali broj istraživanih sekvenca, malo područje rasprostranjenosti i niska genska raznolikost upućuju na hitnu potrebu donošenja konzervacijskog plana za tu vrstu.

Osim toga, najmanja je genska p-udaljenost gena za citokrom *b* zabilježena i unutar izdvojene filogenetičke linije iz Trebišnjice i Ravnog polja, čime se potvrđuje potreba hitnog donošenja konzervacijskih planova za lokalitet Trebišnjice u kojem je nađena većina odgovarajućih sekvenca.

Kako bi se procijenilo stvarno stanje vrste *S. tenellus,* trebalo bi ponoviti istraživanje na većem broju uzoraka i obuhvatiti cjelokupno područje rasprostranjenosti, uključujući lokalitete u BiH.

6. ZAKLJUČCI

- Filogenetička rekonstrukcija pokazala je da vrste roda *Squalius* iz rijeka jadranskog slijeva Hrvatske i BiH pripadaju dvjema nezavisnim i genetički udaljenim filogenetičkim grupama, mediteranskoj i *S. cephalus* grupi, što upućuje na parafiletičko porijeklo jadranskih klenova.
- Kolonizacija klenova prema jadranskom se slijevu događala u najmanje dva navrata s predstavnicima različitih *Squalius* linija, čime je potvrđena postupna kolonizacija mediteranskog područja.
- Analiza mitohondrijskog *cyt b* gena pokazala je razdvajanje roda *Squalius* na sedam linija u području jadranskog slijeva. Ni jednom analizom filogenetičkih metoda nije potvrđeno izdvajanje haplotipa iz Istre koji bi odgovarao evolucijskoj liniji istarskog klena (*S. janae*), pa se predlaže da se taj naziv koristi kao mlađi sinonim vrste *S. squalus*.
- Unutar mediteranske grupe izdvajaju se dalmatinske vrste - *S. illyricus*, *S. microlepis*, *S. svallize*, *S zrmanjae* i *S. tenellus*. Monofiletičkog su porijekla tako da trenutna taksonomija unutar ove grupe odgovara molekularnim podacima. Primijećeno je geografsko strukturiranje grupe na talijansko-jadransku, pirenejsku i grčku podgrupu.
- Unutar *S. cephalus* grupe izdvojili su se istarski i južnodalmatinski haplotipovi vrste *S. squalus*. Osim toga, u ovoj se grupi prema *cyt b* genu izdvojila zasebna filogenetička linija iz Trebišnjice i Ravnog polja, čiji taksonomski status treba potvrdu. Odnosi unutar ove grupe vrlo su složeni, s parafiletičkim odnosima vrsta *S. squalus*, *S. cephalus*, *S. peloponensis* i *S. lepidus*, zbog čega je potrebna sistematska revizija grupe. Nerazriješena taksonomija, kriva identifikacija uzoraka i hibridizacija razlog su nerazriješenih odnosa pa bi se u daljnjim istraživanjima trebao obuhvatiti veći broj vrsta i genskih biljega. U *S. cephalus* grupi nije primijećeno geografsko strukturiranje haplotipova.
- Dobiveni podaci potvrđuju hipotezu postupne kolonizacije mediteranskog područja predstavnicima *Squalius* vrsta. Divergencija dviju velikih filogenetičkih grupa, mediteranske i *S. cephalus* grupe, započela je na prijelazu oligocena u miocen. Budući da nema dokaza o geodinamici iz tog vremena, vjeruje se da je krški reljef ubrzao geografsku izolaciju i specijaciju.

- Divergencija jadranskih vrsta od španjolskih, talijanskih i grčkih započela je u gornjem miocenu, na što je utjecalo uzdizanje planinskih lanaca Pireneja i Alpi. Na balkanskom je području, s naglaskom na dalmatinsko područje, tada postojao dinarski jezerski sustav, čija je fragmentacija i nestanak utjecala na izolaciju jadranskih vrsta i posljedičnu specijaciju. Zajednički je predak između jadranskih vrsta i talijanske vrste *S. lucumonis* postojao puno prije mesinske krize saliniteta u gornjem miocenu pa se hipoteza o naglom širenju klenova na mediteransko područje zbog navedenog događaja čini manje vjerojatnom. U gornjem se miocenu razdvojila i glavna razvojna linija vrste *S. squalus* od grčke vrste *S. peloponensis*. U srednjem miocenu započinje divergencija vrsta unutar *S. cephalus* grupe. Mesinska kriza saliniteta utjecala je na razdvajanje vrsta *S. tenellus*/*S. microlepis* od talijanske vrste *S. lucumonis*. Povećanje vlažnosti u mediteranskoj regiji u razdoblju pliocena utjecalo je na formiranje novih vodenih staništa i diverzifikaciju vrsta *S. svallize*/*S. zrmanjae* od vrste *S. illyricus*. U istom je periodu zabilježeno izdvajanje nove filogenetičke linije iz Trebišnjice i Ravnog polja od glavne razvojne linije vrste *S. squalus*. U pleistocenu se razdvajaju vrste *S. microlepis* i *S. tenellus* te se novoizdvojena filogenetička linija iz Trebišnjice i Ravnog polja odvaja od sestrinske, grčke vrste *S. prespensis*, što se povezuje s intenzivnom geološkom aktivnosti tog područja. Pleistocenske su glacijacije najvjerojatnije utjecale na današnju distribuciju vrsta roda *Squalius*.
- Najstarija je jadranska vrsta *S. illyricus*, dok je najmlađa nova filogenetička linija iz Trebišnjice i Ravnog polja, čiji status treba potvrditi.
- Alopatrijska specijacija uzrokovana dugotrajnom izolacijom glavna je sila diverzifikacije jadranskih vrsta *Squalius*. Na trenutne filogenetičke odnose i distribuciju jadranskih klenova manji je utjecaj imala i zabilježena pojava hibridizacije. S obzirom na to da su svi pronađeni hibridi prirodnog porijekla, proces hibridizacije ima važnu ulogu u bioraznolikosti jadranskih vrsta *Squalius*.
- Ostaci nekadašnjih hibridizacijskih događaja zabilježeni su u mtDNA cijele populacije vrste *S. svallize* iz Ljute, gdje su sve sekvence *cyt b* gena posjedovale *S. squalus* haplotip. Jedna je jedinka iz Zrmanje posjedovala

haplotip vrste *S. illyricus*, koja više ne živi na tom području te je introgresija mtDNA rezultat prijašnjih hibridizacija.

- Hibridi vrsta *S. zrmanjae* i *S. illyricus* zabilježeni su u rijeci Krki u kojoj žive obje navedene vrste pa se hibridizacija događa i danas. Hibridne jedinke između vrste *S. svallize* i *S. squalus* zabilježene su u Trebišnjici i Ravnom polju, gdje je hibridizacija prisutna i danas.
- Vrsta *S. squalus* pokazuje najveću geografsku rasprostranjenost u odnosu na druge ispitivane vrste. Distribucija je vrste fragmentirana, a jedinke su pronađene u svim istarskim rijekama, na lokalitetu Visovca (Krka) te Trebišnjice i Ravnog polja (neretvanski slijev). Vrsta nije pronađena u glavnim tokovima rijeke Krke i Neretve.
- U Zrmanji živi vrsta *S. zrmanjae*, koja je po prvi put pronađena i u rijeci Ričici. Smatra se da Ričica nije dio prirodnog rasprostranjenja vrste i da je u nju vrsta najvjerojatnije došla odvodnjom vode iz Zrmanje u Ričicu kroz reverzibilnu hidroelektranu Orlovac.
- Vrsta *S. illyricus* obitava u rijekama Cetini i Krki. Mitohondrijski je haplotip ilirskog klena pronađen i u Boljunšćici, najvjerojatnije kao retencija nekadašnje sjeverne linije koja je pred stotinjak godina zabilježena u slijevu Soče. Ovakav rezultat upućuje na nekadašnji veći areal vrste koji je smanjen zbog značajnog ljudskog utjecaja u ovim predjelima.
- Vrsta *S. microlepis* obitava na području Prološkog blata i Vrljike, dok u Neretvi nije pronađena. Budući da je u istraživanje uključen mali broj uzoraka i nepotpuno obuhvaćen areal, za donošenje zaključaka o rasprostranjenosti vrste potrebno je s većim brojem uzoraka obuhvatiti i rijeke Maticu, Tihaljinu, Trebižat i Baćinska jezera.
- Vrsta *S. tenellus* u Hrvatskoj je pronađena na području Rude. Kako bi se dobio uvid o stvarnom stanju rasprostranjenosti, potrebno je obuhvatiti lokalitete Mandečkog jezera, Buškog blata i Livanjskog polja u BiH.
- Vrsta *S. svallize* obitava u Neretvi, Trebišnjici, Ravnom polju, Hutovom blatu i Ljuti (hibridna populacija). Dok je u Neretvi i Hutovom blatu jedina vrsta, u Trebišnjici i Ravnom polju koegzistira s vrstom *S. squalus* i s nepoznatom linijom koja se izdvojila prema mtDNA. Obitavanje triju različitih linija na

jednom području dovoljan je razlog za hitnu i efektivnu konzervaciju tog područja.

- Podaci o distribuciji vrsta upućuju na veliku ulogu alopatrijske fragmentacije koja je dovela do ograničenih životnih područja i visoke razine endemizma u mediteranskoj grupi.
- Izračunata genska udaljenost između vrsta odgovarala je vremenima diveregencije odgovarajućih vrsta. Najveća je genska p-udaljenost pronađena između vrsta *S. svallize* i *S. squalus* te, općenito, između vrsta različitih velikih filogenetičkih grupa. Najmanja je genska p-udaljenost zabilježena između vrsta *S. microlepis* i *S. tenellus*.
- Istraživanje DNA polimorfizma, potrebnog za budućnost opstanka svake vrste, pokazalo je da ni jedna vrsta jadranskog slijeva nema veliku gensku raznolikost.
- Najveća je unutarvrsna genska p-udaljenost zabilježena za vrstu *S. squalus*, što je i očekivano, s obzirom na široku geografsku rasprostranjenost čija je vrijednost manja od očekivane. Umjerena genska raznolikost rezultat je trenutnog raspodjeljivanja i strukturiranja unutar vrste. Jedinke populacije iz Pazinčice ne pokazuju nikakvu gensku raznolikost, što je moguć pokazatelj preosjetljivosti klenova na antropogeni utjecaj. Populaciju iz Pazinčice trebalo bi uzeti u obzir prilikom donošenja konzervacijskih planova za vrstu i lokalitet. Populacija iz Krke ne razlikuje se od populacije iz Raše, što upućuje na nekadašnji veći kontinuirani areal vrste koji je s vremenom rascjepkan.
- Umjerena raznolikost haplotipova i niska genska p-udaljenost unutar vrste *S. illyricus* zabrinjavajući je rezultat s obzirom na starije porijeklo vrste i širu geografsku rasprostranjenost. Populacija iz Krke pokazala je manju gensku raznolikost u odnosu na populaciju iz Cetine. Ovakav je rezultat najvjerojatnije posljedica ljudskog utjecaja pa je potrebno hitno donošenje akcijskih planova za ovu vrstu.
- Niska genska raznolikost vrste *S. svallize,* koja je dugo prisutna na ovim prostorima, neočekivana je i upozoravajuća, a najvjerojatnije je povezana s antropološkim aktivnostima koje su u neretvanskom slijevu ostavile velik trag. Procjenu rizika od izumiranja potrebno je revidirati za tu vrstu, imajući pri tom

na umu izuzetno malu gensku raznolikost koju bi trebalo uzeti u obzir prilikom procjene za daljnje ljudske aktivnosti na tom području.

- Za vrste *S. zrmanjae* i *S. microlepis* unutarvrsni se genski polimorfizam izračunao na malom broju sekvenca pa ih je potrebno potvrditi na većem broju jedinki, dok se za vrstu *S. tenellus*, predstavljenu samo s jednom jedinkom, nije mogao uopće izračunati. S obzirom na malu rasprostranjenost ovih vrsta te malu raznolikost dobivenu za vrstu *S. zrmanjae*, potrebno je donošenje hitnih konzervacijskih mjera, pogotovo za vrste *S. tenellus* i *S. zrmanjae*.

7. POPIS LITERATURE

Akaike H (1974) A new look at the statistical model identification. IEEE Transactions on Automatic Control 19: 716–723.

Almodóvar A, Nicola GG, Leal S, Torralva M, Elvira B (2012) Natural hybridization with invasive bleak *Alburnus alburnus* threatens the survival of Iberian endemic calandino *Squalius alburnoides* complex and Southern Iberian chub *Squalius pyrenaicus*. Biological Invasions 14: 2237–2242.

Alves MJ, Collares-Pereira MJ, Dowling TE, Coelho MM (2002) The genetics of maintenance of an all-male lineage in the *Squalius alburnoides* complex. Journal of Fish Biology 60: 649–662.

Andolfatto P, Scriber JM, Charlesworth B (2003) No association between mitochondrial DNA haplotypes and a female-limited mimicry phenotype in *Papilio glaucus*. Evolution 57: 305–316.

Arbogast BS, Edwards SV, Wakeley J, Beerli P, Slowinski JB (2002) Estimating divergence times from molecular data on phylogenetic and population genetic timescales. Annual Review of Ecology and Systematics 33: 707–740.

Avise JC (1991) Ten unorthodox perspectives on evolution prompted by comparative population genetic findings on mitochondrial DNA. Annual Review of Genetics 25: 45–69.

Avise JC (2000) Phylogeography: The history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, 447 str.

Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. Annual Review of Ecology and Systematics 18: 489–522.

Baensch HA, Riehl R (1997) Aquarien Atlas, Band 5. Mergus Verlag, Melle, Njemačka.

Ballard JWO, Whitlock MC (2004) The incomplete natural history of mitochondria. Molecular Ecology 13: 729–744.

Bănărescu P (1989) Zoogeography and history of the freshwater fish fauna of Europe. U: Holcik J (ed.) The Freshwater Fishes of Europe, vol. 1. Wiesbaden, Aula-Verlag, 88–107.

Bănărescu P (1992) Distribution and dispersal of freshwater animals in North America and Eurasia. U: Zoography of Frehwaters, vol. 2. Aula Verlag,Wiesbaden, 88–107.

Bandelt H-J, Forster P, Sykes BC, Richards MB (1995) Mitochondrial portraits of human populations using median networks. Genetics 141: 743–753.

Bandelt H-J, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology and Evolution 16: 37–48.

Barić A, Madiraca M, Margeta J, Radman G, Bojanić F, Bonacci O, Cetinić P, Dulčić J, Gamulin A, Gamulin M, Kamenjarin J, Kovačević I, Kovačević V, Kuspilić G, Mrčić N, Pavasović S, Petričec M, Piasevoli G, Roje-Bonacci T, Skočibušić M, Štambuk-Giljanović N, Vranješ M, Zorić P (2000) Riječni sliv i pripadajuće obalno područje rijeke Cetine: Ekološki i socio-ekonomski profil. Centar za regionalne aktivnosti Programa prioritetnih akcija, Split, 165 str.

Behrens-Chapuis SF, Herder F, Esmaeili HR, Freyhof J, Hamidan NA, Özuluğ M, Šanda R, Geiger MF (2015) Adding nuclear rhodopsin data where mitochondrial *COI* indicates discrepancies - can this marker help to explain conflicts in cyprinids? DNA Barcodes (Berlin) 3: 187–199.

Berg LS (1949) Freshwater fishes of USSR and adjacent countries, vol. 1-3. IPST Press, Jerusalem.

Bertoša M, Matijašić R (2005) Istarska enciklopedija. Zagreb, Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 944 str.

Bianco P (1990) Potential role of the paleohistory of the Mediterranean and Paratethys basin on the early dispersal of Euro-Mediterranean freshwater fishes. Ichthyological Exploration of Freshwaters 1: 167–184.

Bianco PG, Knežević B (1987) The *Leuciscus cephalus* complex (Pisces, Cyprinidae) in the western Balkanic area. V Congress of European Ichthyologists proceedings, Stockholm: 49–55.

Bogutskaya NG (1994) A description of *Leuciscus lepidus* (Heckel, 1843) with comments on *Leuciscus* and leuciscine-aspinine relationships (Pisces: Cyprinidae). Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien. Serie B für Botanik und Zoologie 96B: 599–620.

Bogutskaya NG (1996) Contribution to the knowledge of leuciscine fishes of Asia Minor. Part 1. Morphology and taxonomic relationships of *Leuciscus borysthenicus* (Kessler, 1859), *L. smyrnaeus* Boulenger, 1896 and *Ladigesocypris ghigii* (Gianferrari, 1927). Publicaciones Especiales Instituto Español de Oceanografia 21: 25–44.

Bogutskaya NG (1997) Contribution to the knowledge of leuciscine fishes of Asia Minor. Part 2. An annotated check-list of leuciscine fishes (Leuciscinae, Cyprinidae) of Turkey with descriptions of a new species and two new subspecies. Mitteilungen aus dem Hamburgischen Zoologischen Museum und Institut 94: 161–186.

Bogutskaya NG (2002) *Petroleuciscus*, a new genus for the *Leuciscus borysthenicus* species group (Teleostei: Cyprinidae). Zoosystematica Rossica 11(1): 235–237.

Bogutskaya NG, Zupančič P (1999) A re-description of *Leuciscus zrmanjae* (Karaman, 1928) and new data on the taxonomy of *Leuciscus illyricus*, *L. svallize* and *L. cephalus* (Pisces: Cyprinidae) in the West Balkans. Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien. Serie B für Botanik und Zoologie 101B: 509–529.

Bogutskaya NG, Zupančič P (2010) *Squalius janae*, a new species of fish from the Adriatic Sea basin in Slovenia (Actinopterygii: Cyprinidae). Zootaxa 2536: 53–68.

Bolić J (1992) Vode Hrvatske - monografija o vodama i vodoprivredi Republike Hrvatske. Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede. Uprava za vodoprivredu: Hrvatska vodoprivreda, Zagreb, 215 str.

Bonacci O (2004) Hazard caused by natural and anthropogenic changes of catchment area in karst. Natural Hazards and Earth System Science, Copernicus Publications on behalf of the European Geosciences Union 4(5/6): 655–661.

Boto L, Cunha C, Doadrio I (2011) A polymorphic microsatellite from the *Squalius alburnoides* complex (Osteichthyes, Cyprinidae) cloned by serendipity can be useful in genetic analysis of polyploids. Genetics and Molecular Biology 34(3): 524–528.

Božičević S (1992) Fenomen krš, Školska knjiga, Zagreb, 104 str.

Božičević S (2005) Boljunščica ili Boljunčica. U: Bertoša M, Matijašić R (eds.) Istarska enciklopedija. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, Zagreb.

Božičević S, Matijašić R (2005) Raša. U: Bertoša M, Matijašić R (eds.) Istarska enciklopedija. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, Zagreb.

Bralić I (1995) Zaštita prostora između Cetine i Neretve. Ekološke monografije 4: Prirodoslovna istraživanja Biokovskog područja. Zbornik radova sa kongresa održanog 11.-16. listopada 1993. u Makarskoj. Hrvatsko ekološko društvo, Zagreb: 341–342.

Briolay J, Galtier N, Brito RM, Bouvet Y (1997) Molecular phylogeny of Cyprinidae inferred from cytochrome *b* DNA sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution 9: 100–108.

Brito RM, Briolay J, Galtier N, Bouvet Y, Coelho MM (1997) Phylogenetic relationships within genus *Leuciscus* (Pisces, Cyprinidae) in Portuguese freshwaters, based on mitochondrial DNA cytochrome *b* sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution 8: 435–442.

Brown WM, Prager EM, Wang A, Wilson AC (1982) Mitochondrial DNA sequence of primates: tempo and mode of evolution. Journal of Molecular Evolution 18(4): 225–239.

Bryant D, Galtier N, Poursat N (2005) Likelihood calculation in molecular phylogenetics. U: Gascuel O (ed.) Mathematics of Evolution and Phylogeny. Oxford, Oxford University Press, 33–62.

Bufalino AP, Mayden RL (2010a) Phylogenetic evaluation of North American Leuciscidae (Actinopterygii: Cypriniformes: Cyprinoidea) as inferred from analyses of mitochondrial and nuclear DNA sequences. Systematics and Biodiversity 8: 493–505.

Bufalino AP, Mayden RL (2010b) Phylogenetic relationships of North American phoxinins (Actinopterygii: Cypriniformes: Leuciscidae) as inferred from S7 nuclear DNA sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution 55(1): 143–152.

Buj I, Marčić Z, Ćaleta M, Mišur A, Mihinjač T, Zanella D, Mustafić P, Mrakovčić M (2015a) Mitochondrial DNA reveals unexpected diversity of chubs (genus *Squalius*, Cypriniformes, Actinopterygii) in the Adriatic basin. Frontiers in Marine Science Conference Abstract: XV European Congress of Ichthyology. doi: 10.3389/conf.FMARS.2015.03.00263.

Buj I, Ćaleta M, Marčić Z, Šanda R, Vukić J, Mrakovčić M (2015b) Different histories, different destinies – impact of evolutionary history and population genetic structure on extinction risk of the adriatic spined loaches (genus: *Cobitis*; Cypriniformes, Actinopterygii). PloS ONE 10(7): e0131580.

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

Cabrera L, Gaudant J (1985) Los ciprinidos (Pisces) del sistema lacustre Oligocénico-Miocénico de los Monegros (Sector SE de la cuenca del Ebro, provincias de Lleida, Tarragona, Huesca y Zaragoza). Acta Geologica Hispanica 20: 219–226.

Carmona JA, Doadrio I (2000) Threatened fishes of the world: *Leuciscus carolitertii* Doadrio, 1988 (Cyprinidae). Environmental Biology of Fishes 57: 96.

Cavender TM, Coburn MM (1992) Phylogenetic relationship of North American Cyprinidae. U: Mayden RL (ed.) Systematics, Historical Ecology and North American Freshwater Fishes. California, Standford University Press, 293–327.

Chan KMA, Levin SA (2005) Leaky prezygotic isolation and porous genomes: rapid introgression of maternally inheritance DNA. Evolution 59: 720–729.

Chen WJ, Bonillo C, Lecointre G (2003) Repeatability of clades as a criterion of reliability: a case study for molecular phylogeny of Acanthomorpha (Teleostei) with larger number of taxa. Molecular Phylogenetics and Evolution 26(2): 262–288.

Choleva L, Musilova Z, Kohoutova-Sediva A, Pac J, Rab P, Janko K (2014) Distinguishing between incomplete lineage sorting and genomic introgressions: complete fixation of allospecific mitochondrial DNA in a sexually reproducing fish (*Cobitis*, Teleostei), despite clonal reproduction of hybrids. PloS ONE 9(6): e80641.

Chow S, Hazama K (1998) Universal primer for S7 ribosomal protein gene intron in fish. Molecular Ecology 7: 1255–1256.

Ciborowski KL, Consuegra S, García de Leániz C, Beaumont MA, Wang J, Jordan WC (2007) Rare and fleeting: an example of interspecific recombination in animal mitochondrial DNA. Biology Letters 3: 554–557.

Clement M, Posada D, Crandall KA (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. Molecular Ecology 9: 1657–1659.

Coad BW (1987) Zoogeography of the freshwater fishes of Iran. U: Krupp F, Schneider W, Kinzelbach R (eds.) Proceedings of the Symposium on the Fauna and Zoogeography of the Middle East. Weisbaden, Beihefte zum. TAVO A 28.

Coad BW (1996) Zoogeography of the fishes of the Tigris-Euphrates basin. Zoology in the Middle East 13: 51–70.

Collares-Pereira MJ, Coelho MM (2010) Reconfirming the hybrid origin and generic status of the Iberian cyprinid complex *Squalius alburnoides*. Journal of Fish Biology 76(3): 707–715.

Crandall KA, Templeton AR (1993) Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. Genetics 134: 959–969.

Creer S (2007) Choosing and using introns in molecular phylogenetics. Evolutionary Bioinformatics 3: 99–108.

Crivelli AJ (1996) The freshwater fish endemic to the Mediterranean region. An action plan for their conservation. Tour du Valat Publication, 171 str.

Crivelli AJ (2006a) *Squalius microlepis*. The IUCN Red List of Threatened Species: e.T61392A12460247.

Crivelli AJ (2006b) *Squalius illyricus*. The IUCN Red List of Threatened Species: e.T61381A12469652.

Crivelli AJ (2006c) *Squalius zrmanjae*. The IUCN Red List of Threatened Species: e.T60794A12399825.

Crivelli AJ (2006d) *Squalius svallize*. The IUCN Red List of Threatened Species: e.T61346A12465656.

Currat M, Ruedi M, Petit RJ, Excoffier L (2008) The hidden side of invasions: massive introgression by local genes. Evolution 62(8): 1908–1920.

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

de la Peña A (1995) Tertiary fishes from the Iberian continental basins: History and fossil record. Coloquios de Paleontologia 47: 25–46.

Degnan JH, Rosenberg NA (2009) Gene tree discordance, phylogenetic inference and the multispecies coalescent. Trends in Ecology & Evolution 24(6): 332–340.

Delsuc F, Brinkmann H, Philippe H (2005) Phylogenomics and the reconstruction of the tree of life. Nature Reviews Genetics 6: 361–375.

Denys GPJ, Dettai A, Persat H, Doadrio I, Cruaud C, Keith P (2013) Status of the Catalan chub *Squalius laietanus* (Actinopterygii, Cyprinidae) in France: input from morphological and molecular data. Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems 408: 04.

Doadrio I (1990) Phylogenetic relationships and classification of west Paleartic species of the genus *Barbus* (Osteichthyes: Cyprinidae). Aquatic Living Resources 3(4): 265–282.

Doadrio I, Carmona JA (1998) Genetic divergence in Greek populations of the genus *Leuciscus* and its evolutionary and biogeographical implications. Journal of Fish Biology 53: 591–613.

Doadrio I, Carmona JA (2003) Testing freshwater Lago Mare dispersal theory on the phylogeny relationships of Iberian Cyprinid genera *Chondrostoma* and *Squalius* (Cypriniformes, Cyprinidae). Graellsia 59(2–3): 457–473.

Doadrio I, Carmona JA (2004) Phylogenetic relationships and biogeography of the genus *Chondrostoma* inferred from mitochondrial DNA sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution 33: 802–815.

Doadrio I, Carmona JA (2006) Phylogenetic overview of the genus *Squalius* (Actinopterygii, Cyprinidae) in the Iberian Peninsula, with description of two new species. Cybium 30(3): 199–214.

Doadrio I, Kottelat M, de Sostoa A (2007a) *Squalius laietanus*, a new species of cyprinid fish from north-eastern Spain and southern France (Teleostei: Cyprinidae). Ichthyological Exploration of Freshwaters 18(3): 247–256.

Doadrio I, Perea S, Alonso F (2007b) A new species of the genus *Squalius* Bonaparte, 1837. (Osteichthyes, Cyprinidae) from Tagus River Basin (Central Spain). Graellsia 63(1): 89–100.

Donnelly P, Tavaré S (1986) The ages of alleles and a coalescent. Advances in Applied Probability 18: 1–19.

Drummond A, Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. BMC Evolutionary Biology 7: 214.

Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. Molecular Biology and Evolution 29: 751–761.

Dubut V, Fouquet A, Voisina A,Costedoat C, Chappaz R, Gilles A (2012) From late Miocene to Holocene: Processes of differentiation within the Teleost genus (Actinopterygii: Cyprinidae). PloS ONE 7(3): e34423.

Dulčić J, Tutman P, Prusina I, Tomšić S, Dragičević B, Hasković E, Glamuzina B (2009) Length-weight relationships for six endemic freshwater fishes from Hutovo Blato wetland (Bosnia and Herzegovina). Journal of Applied Ichthyology 25(4): 499–500.

Duplić A (2008) Slatkovodne ribe. Priručnik za inventarizaciju i praćenje stanja. Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb, 40 str.

Durand JD, Persat H, Bouvet Y (1999) Phylogeography and postglacial dispersion of the chub (*Leuciscus cephalus*) in Europe. Molecular Ecology 8: 989–997.

Durand JD, Unlu E, Doadrio I, Pipoyan S, Templeton AR (2000) Origin, radiation, dispersion and allopatric hybridization in the chub, *Leuciscus cephalus*. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 267: 1687–1697.

Durand JD, Tsigenopoulos CS, Ünlü E, Berrebi P (2002) Phylogeny and biogeography of the family Cyprinidae in the Middle East inferred from cytochrome *b* DNA - evolutionary significance of this region. Molecular Phylogenetics and Evolution 22(1): 91–100.

Economidis PS (1996) *Leuciscus keadicus* (Cyprinidae), a valid species from River Evrotas (Greece). Cybium 20(3): 303–309.

Economidis PS, Bănărescu P (1991) The distribution and origin of freshwater fishes in the Balkan Peninsula, especially in Greece. Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie 76: 257–283.

Edwards SV (2009) Natural selection and phylogenetic analysis. Proceedings of the National Academy of Sciences 106(22): 8799–8800.

Edwards AWF, Cavalli-Sforza LL (1963) The reconstruction of evolution. Heredity18: 553.

Edwards AWF, Cavalli-Sforza LL (1964) Reconstruction of evolutionary trees. U: Heywood VH, McNeill J (eds.) Phenetic and Phylogenetic Classification. London, Systematics Association, 67–75.

Edwards S, Bensch S (2009) Looking forwards or looking backwards in avian phylogeography? A comment on Molecular Ecology 18(14): 2930–2933.

Efron B, Gong G (1983) A leisurely look at the bootstrap, the jackknife, and cross-validation. The American Statistician 37(1): 36–48.

Excoffier L, Smouse PE (1994) Using allele frequencies and geographic subdivision to reconstruct gene trees within a species: molecular variance parsimony. Genetics 136: 343–359.

Excoffier L, Heckel G (2006) Computer programs for population genetics data analysis: a survival guide. Nature Publishing Group 7: 745–758.

Excoffier L, Foll M, Petit R (2009) Genetic consequences of range expansions. Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics 40: 481–501.

Farris JS (1989) The retention index and the rescaled consistency index. Cladistics 5: 417–419.

Felsenstein J (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. Journal of Molecular Evolution 17: 368–376.

Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39: 783–791.

Fisher RA (1930) The genetical theory of natural selection. Clarendon Press, Oxford, 308 str.

Freyhof J (2011a) *Squalius janae*. The IUCN Red List of Threatened Species: e.T188652A8648916.

Freyhof J (2011b) *Squalius squalus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2011: e.T135619A4163501.

Freyhof J (2013) *Squalius squalus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2013: e.T135619A4163501.

Freyhof J, Kottelat M (2008) *Squalius tenellus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T135695A4184809.

Freyhof J, Lieckfeldt D, Pitra D, Ludwig A (2005) Molecules and morphology: Evidence for introgression of mitochondrial DNA in Dalmatian cyprinids. Molecular Phylogenetics and Evolution 37: 347–354.

Fricke R, Bilecenoglu M, Sari HM (2007) Annotated checklist of fish and lamprey species (Gnathostoma and Petromyzontomorphi) of Turkey, including a Red List of threatened and declining species. Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde Serie A (706): 1–172.

Fricke R, Eschmeyer WN, van der Laan R (2018) (eds.) Catalog Of Fishes: Genera, Species, References.
(http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp). Pristup stranici 28.09.2018.

Froese R, Pauly D (eds) (2019) FishBase (version Feb 2018). U: Roskov Y, Ower G, Orrell T, Nicolson D, Bailly N, Kirk PM, Bourgoin T, DeWalt RE, Decock W, Nieukerken E van, Zarucchi J, Penev L (eds.) Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 29. siječanj 2019. www.catalogueoflife.org/col. Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands. ISSN 2405-8858. Pristup stranici 14.02.2019.

Fu Y-X, Li W-H (1993) Statistical tests of neutrality of mutations. Genetics 133: 693–709.

Fu Y-X (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchinking and background selection. Genetics 147: 915–925.

Galtier N, Gouy M (1995) Inferring phylogenies from DNA sequences of unequal base compositions. Proceedings of National Academy of Sciences USA 92: 11317–11321.

Galtier N, Nabholz B, Glémin S, Hurst GDD (2009) Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. Molecular Ecology 18: 4541–4550.

Gantenbein B, Fet V, Gantenbein-Ritter IA, Balloux F (2005) Evidence for recombination in scorpion mitochondrial DNA (Scorpiones: Buthidae). Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences 272: 697–704.

Georgiadis N, Bischof L, Templeton A, Patton J, Karesh W, Western D (1994) Structure and history of African elephant populations: I. Eastern and Southern Africa. Journal of Heredity 85: 100–104.

Gerber AS, Templeton AR (1996) Population sizes and within-deme movement of *Trimerotropis saxatilis* (Acrididae), a grasshopper with a fragmented distribution. Oecologia 105: 343–350.

Gigliarelli L, Caldelli A, Morozzi G, Giannetto D, Panara F, Lorenzoni M, Lucentini L (2013) Nuclear PCR-RFLP detects the brook chub, *Squalius lucumonis* (Leuciscinae: Cyprinidae), and related hybrids with other cyprinid species. Italian Journal of Zoology 80(3): 462–465.

Gilles A, Lecointre G, Faure E, Chappaz R, Brun G (1998) Mitochondrial phylogeny of European cyprinids. Implications for their systematics, reticulate evolution and colonization time. Molecular Phylogenetics and Evolution 10: 130–143.

Gilles A, Lecointre G, Miquelis A, Loerstcher M, Chappaz R, Brun G (2001) Partial combination applied to phylogeny of European Cyprinids using the mitochondrial control region. Molecular Phylogenetics and Evolution 19(1): 22–33.

Gissi C, Iannelli F, Pesole G (2008) Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. Heredity 101: 301–320.

Glamuzina B, Tutman P, Conides A (2001) Report on ichthyological survey on Hutovo Blato wetlands. European Union LIFF. Third Countries Program and the Ministry of Civil Engineering and Nature Protection of Neretva - Herzegovina Cantonal Government/LTCY/035BiH project: „Development of a new management policy for Hutovo Blato wetlands“, Bosnia-Herzegovina, 99 str.

Glamuzina B, Bogut I, Ivanković M (2011) Revitalizacija autohtonih i endemskih neretvanskih pastrva. Federalni agromediteranski zavod Mostar, Mostar, 28 str.

Gómez-Zurita J, Petitpierre E, Juan C (2000) Nested cladistic analysis, phylogeography and speciation in the *Timarcha goettingensis* complex (Coleoptera, Chrysomelidae). Molecular Ecology 9: 557–570.

Gridelli E (1936) I pesci d'acqua dolce della Venezia Giulia. Tipografia Domenico del Bianco e figlio, Udine, 152 str.

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

Harrison CJ, Langdale JA (2006) A step by step guide to phylogeny reconstruction. The Plant Journal 45: 561–572.

Harzhauser M, Mandic O (2008) Neogene lake systems of Central and South-Eastern Europe: Faunal diversity, gradients and interrelations. Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology 260: 417–434.

Hastings WK (1970) Monte Carlo sampling methods using Markov chains and their applications. Biometrika 57: 97–109.

Haywood AM, Sellwood BW, Valdés PJ (2000) Regional warming: Pliocene (3 Ma) paleoclimate of Europe and the Mediterranean. Geology 28(12): 1063–1066.

He S, Mayden RL, Wang X, Wang W, Tang KL, Chen W-J, Chen Y (2008) Molecular phylogenetics of the family Cyprinidae (Actinopterygii: Cypriniformes) as evidenced by sequence variation in the first intron of S7 ribosomal protein-coding gene: Further evidence from a nuclear gene of the systematic chaos in the family. Molecular Phylogenetics and Evolution 46(3): 818–829.

Heckel J, Kner R (1858) Die Süsswasserfische der Osterreichischen Monarchie mit Rucksicht auf der angrenzen Länder. Lepzig, W. Engelmann, 388 str.

Hedin MC (1997) Speciational history in a diverse clade of habitat-specialized spiders (Araneae: Nesticidae: *Nesticus*): inferences from geographic-based sampling. Evolution 51: 1929–1945.

Hennig W (1966) Phylogenetic Systematics. University of Illinois Press, Urbana, Illionis.

Hey J, Wakeley J (1997) A coalescent estimator of the population recombination rate. Genetics 145: 833–846.

Hirt MV, Arratia G, Chen W-J, Mayden RL, Tang KL, Wood RM, Simons AM (2017) Effects of gene choice, base composition and rate heterogeneity on inference and estimates of divergence times in cypriniform fishes. Biological Journal of the Linnean Society 121(2): 319–339.

Hoarau G, Holla S, Lescasse R, Stam WT, Olsen JL (2002) Heteroplasmy and evidence for recombination in the mitochondrial control region of the flatfish *Platichthys flesus*. Molecular Biology and Evolution 19: 2261–2264.

Hsü K, Montadert L, Bernuilli D, Cita MB, Erickson A, Garrison RE, Kidd RB, Mèlierés F, Müller C, Wright R (1977) History of the Mediterranean salinity crisis. Nature 267: 399–403.

Hudson RR (1987) Estimating the recombination parameter of a finite population model without selection. Genetics Research 50: 245–250.

Hudson RR (2000) A new statistic for detecting genetic differentiation. Genetics 155: 2011–2014.

Hudson RR, Kaplan NL (1985) Statistical properties of the number of recombination events in the history of a sample of DNA sequences. Genetics 111: 147–164.

Hudson RR, Kreitman M, Aguadé M (1987) A test of neutral molecular evolution based on nucleotide data. Genetics 116(1): 153–159.

Hudson RR, Boos DD, Kaplan NL (1992a) A statistical test for detecting geographic subdivision. Molecular Biology and Evolution 9(1): 138–151.

Hudson RR, Slatkin M, Maddison WP (1992b) Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. Genetics 132(2): 583–589.

Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics Applications Note 17(8): 754–755.

Huson DH, Bryant D (2006): Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. Molecular Biology and Evolution 23: 254–267.

Huson DH, Scornavacca C (2010) A survey of combinatorial methods for phylogenetic networks. Genome Biology and Evolution 3: 23–35.

Irwin DM, Kocher TD, Wilson AC (1991) Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. Journal of Molecular Evolution 11: 128–144.

IUCN (2019) IUCN Red List of Threatened Species. www.iucnredlist.org

Jukes TH, Cantor CR (1969) Evolution of protein molecules. U: Munro HN (ed.), Mammalian Protein Metabolism. New York, Academic Press, 21–132.

Kapetanović N, Vuković T (1968) Nalaz *Leuciscus svallize* et Kner u estavelama Popovog polja. Croatian Journal of Fisheries 23(3): 67–67.

Karaman S (1928) Beiträge zur Ichthyologie von Jugoslavien. I. Glasnik Skopskog Naučnog Društva 6 (Prirodni Nauk 2): 147–176.

Katurić M (1887) Cenni ittiologico-erpetologici. Glasnik Hrvatskog naravnoslovnog društva 2: 111–118.

Ketmaier V, Bianco PG, Cobolli M, Krivokapić M, Coniglia R, De Matthaeis E (2004) Molecular phylogeny of two lineages of Leuciscinae cyprinids (*Telestes* and *Scardinius*) from the peri-Mediterranean area based on cytochrome *b* data. Molecular Phylogenetics and Evolution 32: 1061–1071.

Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution 16(2): 111–120.

Kimura M (1983) The neutral theory of molecular evolution. Cambridge, Cambridge University Press, 367 str.

Kitching IJ, Forey, PL, Humphries CJ, Williams DM (1998) Cladistics: The Theory and Practice of Parsimony Analysis. 2nd edn. Oxford University Press, Oxford, UK, 228. str.

Kluge AG, Farris JS (1969) Quantitative phyletics and the evolution of anurans. Systematic Zoology 18(1): 1–32.

Kolombatović J (1886) Imenik kralješnjaka Dalmacije II Dio: Dvoživci, Gmazovi i Ribe. Split, Godišnje izvešće e. k. velike realke, 32 str.

Kolombatović J (1907) Contribucioni alla Funa dei Vertebrati della Dalmazia. Glasnik Hrvatskog naravnoslovnog društva 19: 1–24.

Kolz AL, Reynolds JB (1989) Electrofishing, a power related phenomenon. U.S. Fish and Wildlife Service Fish and Wildlife Technical Report 22, Washington D.C., 24 str.

Kosić B (1903) Ribe Dubrovačke. Tisak dioničke tiskare, Zagreb, 48 str.

Kottelat M (1997) European freshwater fishes. An heuristic checklist of the freshwater fishes of Europe (exclusive of former USSR), with an introduction for non-systematists and comments on nomenclature and conservation. Biologia, Section Zoology 52 (Suppl. 5): 1–271.

Kottelat M, Economidis PS (2006) *Squalius orpheus*, a new species of cyprinid fish from Evros drainage, Greece (Teleostei: Cyprinidae). Ichthyological Exploration of Freshwaters 17(2): 181–186.

Kottelat M, Freyhof J (2007) Handbook of European freshwater fishes. Berlin, 646 str.

Krijgsman W, Duermeijer CE, Langereis CG, de Bruijn H, Saraç G, Andriessen PAM (1996) Magnetic polarity stratigraphy of late Oligocene to middle Miocene mammal-bearing continental deposits in Central Anatolia (Turkey). Newsletters on Stratigraphy 34(1): 13–30.

Krijgsman W, Hilgen FJ, Raffi I, Sierro FJ, Wilson DS (1999) Chronology, causes and progression of the Messinian salinity crisis. Nature 400: 652–655.

Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution 33(7): 1870–1874.

Kumazawa Y, Azuma Y, Nishida M (2004) Tempo of mitochondrial gene evolution: Can mitochondrial DNA be used to date old divergences? Endocytobiosis and Cell Research 15: 136–142.

Ladoukakis ED, Zouros E (2001) Direct evidence for homologous recombination in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) mitochondrial DNA. Molecular Biology and Evolution 18: 2127–2131.

Larget B, Simon D (1999) Markov chain Monte Carlo algorithms for the Bayesian analysis of phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 16: 750–759.

Leiner S, Popović J (1984) Rod *Leuciscus* (Cyprinidae, Pisces) u vodama jadranskog sliva s osvrtom na nalaz *L. svallize* (Heckel & Kner, 1858.) i *L. souffia* Risso, 1826 u Cetini. Ichthyologia 16(1–2): 111–120.

Leiner S, Povž M, Mrakovčić M (1995) Freshwater fish in Istrian Peninsula. Annals for Istrian and Mediterranean Studies, Series Historia Naturalis 5(7): 215–222.

Levy A, Doadrio I, Almada VC (2009) Historical biogeography of European leuciscins (Cyprinidae): evaluating the Lago Mare dispersal hypothesis. Journal of Biogeography 36(1): 55–65.

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

Linnaeus C (1758) Systema Naturae. 10th edn. Laurenti Salvii, Stockholm, 102. str.

Lipscomb D (1998) Basics of cladistic analysis. George Washington University, Washington D.C, 75 str.

Lucentini L, Chiesa S, Giannetto D, Pompei L, Natali M, Sala P, Volta P, Lorenzini M, Fontaneto D (2014) Integrative taxonomy does not support the occurence of two species of

the *Squalius squalus* complex (Actinopterygii, Cypriniformes, Cyprinidae) in Italy. Biochemical Systematics and Ecology 56: 281–288.

Lynch M, Crease T (1990) The analysis of population survey data on DNA sequence variation. Molecular Biology and Evolution 7(4): 377–394.

Machordom A, Doadrio I (2001) Evolutionary history and speciation modes in the cyprinid genus *Barbus*. Proceedings of the Royal Society of London, B 268: 1297–1306.

Maddison WP (1997) Gene trees in species trees. Systematic Biology 46(3): 523–536.

Marescalchi O, Falconi R, Manaresi S, Zaccanti F (2008) Ag-NORs. mitochondrial cytochrome b and 16S characterizations in nine Italian freshwater cyprinids (Teleostei, Cyprinidae). Biologia Evoluzionistica Sperimentale, neobjavljeno.

Marjanac Lj, Marjanac T (2004) Glacial history of the Croatian Adriatic and coastal Dinarids. U: Ehlers J, Gibbard PL (eds.) Quaternary Glaciations - Extent and Chronology. Elsevier B.V., 1–26.

Mastrantonio V, Porretta D, Urbanelli S, Crasta G, Nascetti G (2016) Dynamics of mtDNA introgression during species range expansion: insights from an experimental longitudinal study. Scientific Reports 6: 30355.

Mayden RL, Chen W-J (2010) The world's smallest vertebrate species of the genus Paedocypris: A new family of freshwater fishes and the sister group of the world's most diverse clade of freshwater fishes (Teleostei: Cypriniformes). Molecular Phylogenetics and Evolution 57(1): 152–175.

Metropolis N, Rosenbluth AW, Rosenbluth MN, Teller AH, Teller E (1953) Equation of state calculations by fast computing machines. The Journal of Chemical Physics 21: 1087–1092.

Meyer A (1993) Evolution of mitochondrial DNA in fishes. U: Hochachka PW, Mommsen TP (eds.) Biochemistry and Molecular Biology of the Fishes, vol 2. Amsterdam, Elsevier, 1–38.

Miletić A (2014) Struktura i raznolikost zajednica riba rijeke Cetine. Zagreb, Prirodoslovno-matematički fakultet, diplomski rad.

Mitchell SM, Muehlbauer LK, Freedberg S (2016) Nuclear introgression without mitochondrial introgression in two turtle species exhibiting sex-specific trophic differentiation. Ecology and Evolution 6(10): 3280–3288.

Mooers AØ, Harmon LJ, Blum MGB, Wong DHJ, Heard SB (2007) Some models of phylogenetic tree shape. U: Gascuel D, Steel M (eds.) Reconstructing Evolution: New Mathematical and Computational Advances. Clarendon Press, 147–168.

Mrakovčić M, Mišetić S (1989) Značaj i karakteristike ihtiofaune rijeke Krke. U: Kerovec M (ed.) Problemi zaštite Nacionalnog parka Krka, Šibenik, 271–282.

Mrakovčić M, Mišetić S, Povž M (1995) Status of freshwater fish in Croatian adriatic river systems. U: Duffey E (ed.) Endemic freshwater fishes of the Northern Mediterranean region. Biological Conservation 72(2): 179–185.

Mrakovčić M, Schneider D, Kerovec M, Mustafić P, Bukvić I (2000) Change of native fish community after closure of the water reservoir on river Butoniga (Istria, Croatia). U: Collares-Pereira MJ, Coelho M, Cowx I (eds.) Freshwater Fish Conservation: Options for the Future. Lisabon, Faculdade de Ciencias de Lisboa, 67 str.

Mrakovčić M, Kerovec M, Plenković-Moraj A, Mihaljević Z, Mustafić P, Ternjej I, Razlog Grlica J, Radović D, Kovačić D, Ćaleta M, Radić I, Zanella D, Schneider D, Gottstein Matočec S (2001) Vrednovanje bioloških dobara rijeke i porječja Cetine. PMF, Zagreb.

Mrakovčić M, Mustafić P, Kerovec M, Mišetić S, Radović D, Razlog-Grlica J, Mihaljević Z, Ternjej I, Hafner D, Ćaleta M, Zanella D, Buj I (2002) Dio studije utjecaja na okoliš odvodnje viška vode iz Vrgorskog polja. PMF, Zagreb.

Mrakovčić M, Brigić A, Buj I, Ćaleta M, Mustafić P, Zanella D (2006) Crvena knjiga slatkovodnih riba Hrvatske. Ministarstvo kulture Republike Hrvatske, Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb, 256 str.

Mustafić P, Buj I, Opašić M, Zanella D, Marčić Z, Ćaleta M, Šanda R, Horvatić S, Mrakovčić M (2017) Morphological comparison of *Delminichthys ghetaldii* (Steindachner, 1882.), *D. adspersus* (Heckel,1843.), *D. jadovensis* (Zupančič & Bogutskaya, 2002.) i *D. krbavensis* (Zupančič & Bogutskaya, 2002.), endemic species of the Dinaric karst, Croatia. Journal of Applied Ichthyology 33: 256–262.

Mysara M, Vandamme P, Props R, Kerckhof FM, Leys N, Boon N, Raes J, Monsieurs P (2017) Reconciliation between operational taxonomic units and species boundaries. FEMS Microbiology Ecology: 93(4).

Nascimento FF, dos Reis M, Yang Z (2017) A biologist's guide to Bayesian phylogenetic analysis. Nature Ecology & Evolution 1: 1446–1454.

Nagylaki T, Lucier B (1980) Numerical analysis of random drift in a cline. Genetics 94: 497–517.

Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 70: 3321–3323.

Nei M (1982) Evolution of human races at the gene level. U: Bonne-Tamir B, Cohen T, Goodman RM (eds.) Human Genetics, part A: The unfolding genome. New York, Alan R Liss, 167–181.

Nei M (1987) Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York, 512 str.

Nei M, Kumar S (2000) Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York, 348 str.

Nevado B, Koblmüller S, Sturmbauer C, Snoeks J, Usano-Alemany J, Verheyen E (2009) Complete mitochondrial DNA replacement in a Lake Tanganyika cichlid fish. Molecular Ecology 18(20): 4240–4255.

Nielsen R (2005) Molecular signatures of natural selection. Annual Review of Genetics 39: 197–218.

Nipperess DA (2016) The rarefraction of phylogenetic diversity: Formulation, extension and application. U: Pellens R, Grandcolas P (eds.) Biodiversity Conservation and Phylogenetic Systematics: Preserving our Evolutionary Heritage in an Extinction Crisis. Paris, Springer, 198–225.

Özuluğ M, Freyhof J (2011) Revision of the genus *Squalius* in Western and Central Anatolia, with description of four new species (Teleostei: Cyprinidae). Ichthyological Exploration of Freshwaters 22(2): 107–148.

Pala I, Schartl M, Sólveig T, Coelho MM (2009) Sex determination in the *Squalius alburnoides* complex: An initial characterization of sex cascade elements in the context of a hybrid polyploidy genome. PloS ONE 4: e6401.

Pamilo P, Nei M (1988) Relationships between gene trees and species trees. Molecular Biology and Evolution 5: 568–583.

Patten MM, Carioscia SA, Linnen CR (2015) Biased introgression of mitochondrial and nuclear genes: a comparison of diploid and haplodiploid systems. Molecular Ecology 24(20): 5200–5210.

Patwardhan A, Ray S, Roy A (2014) Molecular markers in phylogenetic studies - a review. Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology 2: 2.

Pavelić D, Belak M (2008) Dinarids in north Croatia and Bosnia. U: McCann T (ed.) The Geology of Central Europe - Volume 2 Mesozoic and Cenozoic. London, Geological Society, 1102–1116.

Perdices A, Bohlen J, Doadrio I (2008) The molecular diversity of adriatic spined loaches (Teleostei, Cobitidae). Molecular Phylogenetics and Evolution 46(1): 382–390.

Perea S, Bohme M, Zupančič P, Freyhof J, Sanda R, Ozulug M, Abdoli A, Doadrio I. (2010) Phylogenetic relationships and biogeographical patterns in Circum-Mediterranean subfamily Leuciscinae (Teleostei, Cyprinidae) inferred from both mitochondrial and nuclear data. BMC Evolutionary Biology 10: 265.

Perea S, Vukić J, Šanda R, Doadrio I (2016) Ancient mitochondrial capture as factor promoting mitonuclear discordance in freshwater fishes: a case study in the genus Squalius (Actinopterygii, Cyprinidae) in Greece. PLoS ONE 11(12): e0166292.

Popović J (1985) Zaštitimo naše endemične vrste riba. Ribarstvo Jugoslavije (4–5–6): 92–93.

Porečnik R (1958) Ribe Badaševiške doline. Ribič 15(10): 290–293.

Posada D (2009) Selecting models of evolution. U: Lemey P, Salemi M, Vandamme AM (eds.) The Phylogenetic Handbook. A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing. Cambridge, Cambridge University Press, 256–282.

Posada D, Crandall KA (2001) Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. Trends in Ecology & Evolution 16(1): 37–45.

Povž M (2002) Ribe reke Dragonje (Fish fauna of the Dragonja river). Varstvo Narave (Nature Conservation) 19: 69–75.

Povž M, Sket B (1990) Naše sladkovodne ribe. Ljubljana, Mladinska knjiga, 347 str.

Radović J (1999) Pregled stanja biološke i krajobrazne raznolikosti Hrvatske sa strategijom i akcijskim planovima zaštite. Državna uprava za zaštitu prirode i okoliša. Zagreb, 151 str.

Riđanović J (1983) Hidrogeografske značajke SR Hrvatske. Hrvatski geografski glasnik 45(1): 33–41.

Robalo JI, Sousa-Santos C, Levy A, Almada VC (2007) Molecular insights on the taxonomic position of the paternal ancestor of the *Squalius alburnoides* hybridogenetic complex. Molecular Phylogenetics and Evolution 39(1): 276–281.

Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP (2012) MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Systematic Biology 61(3): 539–542.

Rosenberg NA (2013) Discordance of species trees with their most likely gene trees: a unifying principle. Molecular Biology and Evolution 30(12): 2709–2713.

Routman E, Wu R, Templeton AR (1994): Parsimony, molecular evolution, and biogeography: the case of the North American Giant Salamander. Evolution 48: 1799–1809.

Rögl F (1998) Paleogeographic consideration for Mediterranean and Parathetys seaways (Oligocene to Miocene). Annalen des Naturhistorisches Museum Wien 99A: 279–310.

Rögl F (1999) Mediterranean and Paratethys. Facts and hypotheses of an Oligocene to Miocene paleogeography (short overview). Geologica Carpathica 50: 339–349.

Saitoh K, Sado T, Doosey MH, Bart HL Jr, Inoue JG, Nishida M, Mayden RL, Miya M (2011) Evidence from mitochondrial genomics supports the lower Mesozoic of South Asia as the time and place of basal divergence of cypriniform fishes (Actinopterygii: Ostariophysi). Zoological Journal of the Linnean Society 161: 633–662.

Saitou N, Nei M (1987) The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4(4): 406–425.

Sanjur OI, Carmona JA, Doadrio I (2003) Evolutionary and biogeographical patterns within Iberian populations of the genus *Squalius* inferred from molecular data. Molecular Phylogenetics and Evolution 29: 20–30.

Schaal BA, Hayworth DA, Olsen KM, Rouscher JT, Smith WA (1998) Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. Molecular Ecology 7: 465–474.

Schoelinck C, Roy M, Godbout V, Castelin M, Abbott C, Gagne N (2016) From the barcode to the taxonomic revision: a case-study of Canadian freshwater fish barcoding [Data set]. Barcode of Life Data Systems. https://doi.org/10.5883/ds-cffb

Schönhuth S, Vukić J, Šanda R, Yang L, Mayden RL (2018) Phylogenetic relationships and classification of the Holarctic family Leuciscidae (Cypriniformes: Cyprinoidei). Molecular Phylogenetics and Evolution 127: 781–799.

Schwarz G (1974) Estimating the dimensions of a model. Annals of Statistics 6: 461–464.

Scribner KT, Page KS, Bartron M (2001) Hybridization in freshwater fishes: a review of case studies and cytonuclear methods of biological inference. Reviews in Fish Biology and Fisheries 10: 293–323.

Seeley HG (1886) The freshwater fishes of Europe. London, Cassel & Comp., 444 str.

Shoemaker JS, Fitch WM (1989) Evidence from nuclear sequences that invariable sites should be considered when sequence divergence is calculated. Molecular Biology and Evolution 6: 270–289.

Simonsen KL, Churchill GA, Aquadro CF (1995) Properties of statistical tests of neutrality for DNA polymorphism data. Genetics 141: 413–429.

Slatkin M (1973) Gene flow and selection in cline. Genetics 75: 733–756.

Slatkin M (1985) Gene flow in natural populations. Annual Review of Ecology and Systematics 16: 393–430.

Sneath P (1975) Cladistic representation of reticulate evolution. Systematic Zoology 24(3): 360–368.

Snyder DE (2003) Invited overview: conclusions from a review of electrofishing and its harmful effects on fish. Reviews in Fish Biology and Fisheries 13: 445–453.

Sousa-Santos C, Collares-Pereira MJ, Almada VC (2006) May a hybridogenetic complex regenerate the nuclear genome of both sexes of a missing ancestor? First evidence on the occurrence of a nuclear non-hybrid *Squalius alburnoides* (Cyprinidae) female based on DNA sequencing. Journal of Natural History 40: 1443–1448.

Sousa-Santos C, Gante HF, Robalo JI, Cunha PP, Martins A, Arruda M, Alves MJ, Almada VC (2014) Evolutionary history and population genetics of a cyprinid fish (*Iberochondrostoma olisiponensis*) endangered by introgression from a more abundant relative. Conservation Genetics 15(3): 665–677.

Stanley DJ, Wezel F-C (1985) Geological evolution of the Mediterranean Basin. Springer-Verlag, New York, 571 str.

Stefani F, Galli P, Crosa G, Zaccara S, Calamari D (2004) Alpine and Apennine barriers determining the differentiation of the rudd (*Scardinius erythrophthalmus* L.) in the Italian peninsula. Ecology of Freshwater Fish 13: 168–175.

Steindachner F (1882) Ichthyologische Beitrage (XII). Sitzungberichte der Keiserlichen Akademie der Wissenschaften Math.-naturw. Klasse Wien 1, 86: 61–82.

Stephens M, Scheet P (2005) Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing data imputation. The American Journal of Human Genetics 76: 449–462.

Stephens M, Smith NJ, Donelly P (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. The American Journal of Human Genetics 68: 978–989.

Stomboudi MT, Kottelat M, Barbieri R (2006) The fishes of the inland waters of Lesbos Island, Greece. Ichthyological Exploration of Freshwaters 17(2): 129–146.

Strimmer K, von Haeseler A (2009) Genetic distances and nucleotide substitution models. U: Lemey P, Salemi M, Vandamme A-M (eds.) The Phylogenetic Handbook: a Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing. Cambridge, Cambridge University Press, 111–141.

Strobeck C (1987) Average number of nucleotide differences in a sample from a single subpopulation: a test from population subdivision. Genetics 117: 149–153.

Stout CC, Tan M, Lemmon AR, Lemmon EM, Armbruster JW (2016) Resolving Cypriniformes relationships using an anchored enrichment approach. BMC Evolutionary Biology 16: 244.

Surić M, Juračić M (2010) Late Pleistocene-Holocene environmental changes-records from submerged speleothems along the Eastern Adriatic coast (Croatia). Geologia Croatica 63: 155–169.

Sušnik S, Snoj A, Dovč P (2001) Evolutionary distinctness of grayling (*Thymallus thymallus*) inhabiting the Adriatic river system, as based on mtDNA variation. Biological Journal of the Linnean Society 74(3): 375–385.

Swofford DL (2002) PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), Version 4 [Computer software and manual], Sinauer Associates, Sunderland.

Šafarek G, Šolić T (2011) Rijeke Hrvatske. Veda, Križevci, 326 str.

Šlechtová V, Bohlen J, Freyhof J, Persat H, Delmastro GB (2004) The Alps as barrier to dispersal in cold-adapted freshwater fishes? Phylogeographic history and taxonomic status of the bullhead in the Adriatic freshwater drainage. Molecular Phylogenetics and Evolution 33(1): 225–239.

Štambuk-Giljanović N (1998) Vode Neretve i njezina poriječja. Zavod za javno zdravstvo Županije splitsko-dalmatinske, Split i Hrvatske vode, Zagreb, 639 str.

Štambuk-Giljanović N (2002) Vode Cetine i njezina porječja: Zavod za javno zdravstvo Županije splitsko-dalmatinske, Split i Hrvatske vode, Zagreb, 814 str.

Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics 123: 585–595.

Tamura K (1992) Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C content biases. Molecular Biology and Evolution 9(4): 678–687.

Tamura K, Nei M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Molecular Biology and Evolution 10: 512–526.

Tao W, Mayden RL, He SP (2013) Remarkable phylogenetic resolution of the most complex clade of Cyprinidae (Teleostei: Cypriniformes): A proof of concept of homology assessment and partitioning sequence data integrated with mixed model Bayesian analyses. Molecular Phylogenetics and Evolution 66(3): 603–616.

Tavaré S (1986) Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. American Mathematical Society: Lectures on Mathematics in the Life Sciences 17: 57–86.

Templeton AR, Crandall KA, Sing CF (1992) A cladistic analysis of phenotipic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. Genetics 132: 619–633.

Templeton AR, Routman E, Phillips C (1995) Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the Tiger Salamander, *Ambystoma tigrinum*. Genetics 140: 767–782.

Theocharopoulos KD (2000) Late Oligocene-Middle Miocene *Democricetodon*, *Spanocricetodon* and *Karydomys* n. gen. from the Eastern Mediterranean area, vol. 8. National and Kapodistrian University of Athens. Edition of the Department of Geology, 103 str.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 22(22): 4673–4680.

Tierney L (1994) Markov chains for exploring posterior distributions (with discussion). The Annals of Statistics 22: 1701–1762.

Tsigenopoulos CS, Berrebi P (2000) Molecular phylogeny of north mediterranean freshwater barbs (genus *Barbus*: cyprinidae) inferred from cytochrome *b* sequences: biogeographic and systematic implications. Molecular Phylogenetics and Evolution 14(2): 165–179.

Turan D, Yilmaz BT, Kaya C (2009) *Squalius kottelati*, a new cyprinid species (Teleostei: Cyprinidae) from Orontes River, Turkey. Zootaxa 2270: 53–62.

Turan D, Kottelat M, Doğan E (2013) Two new species of *Squalius, S. adanaensis* and *S. seyhanensis* (Teleostei: Cyprinidae), from the Seyhan River in Turkey. Zootaxa 3637(3): 308–324.

Tutman P, Glamuzina B, Dulčić J, Zovko N (2012) Ihtiofauna močvare Hutovo blato (donji tok rijeke Neretve, Bosna i Hercegovina): stanje i ugroženost. Croatian Journal of Fisheries 70(4): 169–185.

Ujvari B, Dowton M, Madsen T (2007) Mitochondrial DNA recombination in a free-ranging Australian lizard. Biology Letters 3: 189–192.

Vandamme A-M (2009) Basic concepts of molecular evolution. U: Lemey P, Salemi M, Vandamme A-M (eds.) The Phylogenetic Handbook: a Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing. Cambridge, Cambridge University Press, 1–23.

Veenvliet P, Veenvliet JK (2006) Ribe slovenskih celinskih voda - priručnik za določanje. Zavod Symbiosis, Grahovo, Slovenija, 168 str.

Vilá C, Amorim IR, Leonard JA, Posada D, Castroviejo J, Petrucci-Fonseca F, Crandall KA, Ellegren E, Wayne RK (1999) Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the gray wolf *Canis lupus*. Molecular Ecology 8: 2089–2103.

Vuković T (1982) Sistematika riba. U: Bojčić C (ed.) Slatkovodno Ribarstvo. Jugoslavenska medicinska naklada: 99–186.

Vuković T, Ivanović B (1971) Freshwater fishes of Yugoslavia (Slatkovodne ribe Jugoslavije). Zemaljski muzej BiH, Sarajevo, 265 str.

Waap S, Amaral AR, Gomes B, Manuela Coelho M (2011) Multi-locus species tree of the chub genus *Squalius* (Leuciscinae: Cyprinidae) from western Iberia: new insights into its evolutionary history. Genetica 139(8): 1009–1018.

Waelbrock C, Labeyrie L, Michel E, Duplessy JC, McManus JF, Lambeck K, Balbon E, Labracherie M (2002) Sea-level and deep water temperature changes derived from benthic foraminifera isotopic records. Quaternary Science Reviews 21: 295–305.

Wang X, Li J, He S (2007) Molecular evidence for the monophyly of East Asian groups of Cyprinidae (Teleostei: Cypriniformes) derived from the nuclear recombination activating gene 2 sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution 42(1): 157–170.

Watterson GA (1975) On the number of segregating sites in genetical models without recombination. Theoretical Population Biology 7: 256–276.

Watterson GA, Guess HA (1977) Is the most frequent allele the oldest? Theoretical Population Biology 11: 141–160.

Watts PC, Saccheri IJ, Kemp SJ, Thompson DJ (2007) Effective population sizes and migration rates in fragmented populations of an endangered insect (*Coenagrion mercuriale:* Odonata). Journal of Animal Ecology 76: 790–800.

Wolstenholme DR (1992) Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. International Review of Cytology 141: 173–216.

Wright S (1931) Evolution in Mendelian populations. Genetics 16: 97–159.

Xiong J (2006) Essential bioinformatics. Cambridge University Press, New York, 339 str.

Yakovlev VN, Slynko YV, Grechanov IG, Krysanov EY (2000) Distant hybridization in fish. Journal of Ichthyology 40: 298–311.

Zardoya R, Doadrio I (1998) Phylogenetic relationships of Iberian cyprinids: systematic and biogeographical implications. Proceedings of the Royal Society B 265: 1365–1372.

Zardoya R, Doadrio I (1999) Molecular evidence on the evolutionary and biogeographical patterns of European cyprinids. Journal of Molecular Evolution 29: 227–237.

Zardoya R, Economidis PS, Doadrio I (1999) Phylogenetic relationships of Greek Cyprinidae: Molecular evidence for at least two origins of the Greek Cyprinid fauna. Molecular Phylogenetic and Evolution 13: 122–131.

Zhao Z (2011) Multiple sequence alignment. Applied Bioinformatics. http://bioinfo.vanderbilt.edu/zhanglab/lectures/AB2011Lecture04.pdf

Zink RM, Barraclough G (2008) Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. Molecular Ecology 17: 2107–2121.

Zou J, Sun Y, Li L, Wang G, Yue W, Lu Z, Wang Q, Liu J (2013) Population genetic evidence for speciation pattern and gene flow between *Picea wilsonii*, *P. morrisonicola* and *P. neoveitchii*. Annals of Botany 112: 1829–1844.

Zuckerkandl E, Pauling L (1962) Molecular disease, evolution, and genetic heterogeneity. U: Kasha M, Pullman B (eds.) Horizons in Biochemistry. New York, Academic Press, 189–225.

Zupančič P (2008) Rijetke i ugrožene slatkovodne ribe jadranskog sliva Hrvatske, Slovenije i Bosne i Hercegovine. Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana, AZV d.o.o., 79 str.

Zupančič P (2009) Rod klenov *Squalius* (Bonaparte, 1837) v Sloveniji. Vode in Mi 40(7): 30–31.

Zupančič P, Mrakovčić M, Marčić Z, Naseka AM, Bogutskaya NG (2010a) Identity of *Squalius* (Actinopterygii, Cyprinidae) from Istra Peninsula in Croatia (Adriatic Sea basin). ZooKeys 53: 45–58.

Zupančič P, Marić N, Naseka AM, Bogutskaya NG (2010b) *Squalius platyceps*, a new species of fish (Actinopterygii: Cyprinidae) from the Skadar Lake basin. Zoosystematica Rossica 19(1): 154–167.

ŽIVOTOPIS AUTORA

OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Kristina Čavlović
Datum rođenja: 29.02.1984.
Državljanstvo: Hrvatsko
Mjesto rođenja: Rijeka
Adresa stanovanja: Pešćićići 1, 51216 Viškovo, Rijeka

NAZIV INSTITUCIJE: KLINIČKI BOLNIČKI CENTAR U RIJECI
Br. telefona: 051/658-254
Br. mobitela: 098/720-729
E-mail adresa: kristina.cavlovic2@gmail.com

OBRAZOVANJE

2012. g. upisala doktorski studij na Biološkom odsjeku. Na poslijediplomskom studiju odslušala i položila sve propisane kolegije.
2008. g. diplomirala na Zoologijskom Zavodu PMF-a, te stekla zvanja magistra edukacije biologije i magistra biologije. Diplomski rad pod nazivom „Morfološka i alozimska analiza kompleksa zelenih žaba (*Pelophylax* kl. *esculentus* kompleks; Anura, Amphibia) sjeverozapadne Hrvatske“ izrađen je na Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka PMF-a, pod vodstvom prof. dr. sc. Milorada Mrakovčića.
2002. g. upisala studij Biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu.
2002. g. maturirala na Prvoj sušačkoj hrvatskoj gimnaziji u Rijeci.

RADNI ODNOS

2009. g. zaposlena kao klinički embriolog na Zavodu za humanu reprodukciju Klinike za ginekologiju i porodništvo Kliničkog bolničkog centra (KBC) u Rijeci. Od 2010. godine članica Hrvatskog društva kliničkih embriologa (HDKE). Od 2012. - 2018. godine imenovana za Odgovornu osobu za sustav kvalitete na Zavodu za humanu reprodukciju KBC-a u Rijeci. Od 2017. g. licencirana samostalna klinička embriologinja od strane HDKE-a. Osim u laboratorijskim, znanstvenim i kliničkim poslovima aktivno sudjeluje u izvođenju praktikuma iz Humane reprodukcije Medicinskog fakulteta u Rijeci.

PROFESIONALNA AKTIVNOST

2006. g. sudjeluje kao podrška u organizaciji Treće međunarodne konferencije za ribe roda *Cobitis* i ostalih srodnih rodova u Šibeniku. Iste godine sudjeluje u terenskim istraživanjima s Makedonskim ekološkim društvom u projektu inventarizacije planine Jablanice u Makedoniji. 2007. g. podrška organizaciji 12.og Europskog ihtiološkog kongresa u Cavtatu. Sudjelovanje u terenskom istraživanju Makedonskog ekološkog društva „Planine Osogova u balkanskom zelenom pojasu“ u sklopu istraživanja rasprostranjenosti i zaštite podvrsta *Vipera ursinii macrops* i *V. ursinii rakonsiensis* u Hrvatskoj i Makedoniji.

ZNANSTVENA DJELATNOST

Autor na tri znanstvena članka koja su objavljena u časopisima koje citira Current Contents, od kojih je na jednom glavni autor.

Od 2011. godine sudjelovala na tri međunarodna kongresa s posterskim prezentacijama, čiji su sažeci tiskani u Knjigama sažetaka sljedećih kongresa:

1. „6. Hrvatski kongres ginekologa i opstetričara“ održanom u Splitu, 26.–29.05.2011.
2. „7. Hrvatski kongres ginekologa i opstetričara“ održanom u Osijeku, 19.-22.05.2016.
3. „1.st SouthEast European Ichthyological Conference“ održanom u Sarajevu, 27.-29.09.2017.

2014. g. sudjeluje u održavanju radionice iz andrologije na 2. Simpoziju Hrvatskog društva kliničkih embriologa održanom u Opatiji od 28. do 30.11.2014.

2015. g. sudjeluje s govornom prezentacijom na 12. Hrvatskom biološkom kongresu s međunarodnim sudjelovanjem održanom od 18. do 23.09.2015. u Svetom Martinu na Muri.

2016. g. sudjeluje s govornom prezentacijom na 3. Simpoziju Hrvatskog društva kliničkih embriologa s međunarodnim sudjelovanjem pod nazivom „Trendovi i novosti u kliničkoj embriologiji“, održanom u Iloku od 22. do 24.04.2016.

2017. g. održava radionicu analize sjemena na kongresu „International Biomedical Student Congress“ održanom u Rijeci, 02.-04.2017.

Popis znanstvenih radova

Radovi publicirani u časopisima koje citira Current Contents:

1. **Čavlović K**, Buj I, Karaica D, Jelić D, Choleva L (2018) Composition and age structure of the *Pelophylax esculentus* complex (Anura; Ranidae) population in inland Croatia. Salamandra 54(1): 11–20.

2. Karaica D, Buj I, **Čavlović K**, Mičetić-Stanković V (2016) Comparative morphology and ecology of the *Pelophylax esculentus* complex in Croatia. Salamandra 52(2): 161–170.

3. Tramišak Milaković T, Panić Horvat L, **Čavlović K**, Smiljan Severinski N, Vlašić H, Vlastelić I, Ljiljak D, Radojčić Badovinac A (2015) Follicular fluid anti-Müllerian hormone: a predictive marker of fertilization capacity of MII oocytes. Archives of Gynecology and Obstetrics 291: 681–687.

Kongresna priopćenja (sažeci citirani u zbornicima)

1. **Čavlović K**, Buj I, Mustafić P, Marčić Z, Zanella D: Phylogenetic relationships of the genus *Squalius* in the Adriatic sea basin – 1.st SouthEast European Ichthyological Conference; Sarajevo, BiH, 27.-29.09.2017.

2. Sušanj Šepić T, Brnčić Verbić P, Bačić R, **Čavlović K**, Smiljan Severinski N: Povezanost CASA parametara u ocjeni kvalitete sjemena i ishoda liječenja postupkom intrauterine inseminacije zbog blaže muške neplodnosti – 7. Hrvatski kongres ginekologa i opstetričara; Osijek, Hrvatska, 19.-22.05.2016.

3. **Čavlović K**: Laser pulse application in assisted reproduction – 3. Simpozij Hrvatskog društva kliničkih embriologa s međunarodnim sudjelovanjem: Trendovi i novosti u kliničkoj embriologiji; Ilok, Hrvatska, 22.-24.04.2016.

4. **Čavlović K**, Karaica D, Buj I, Mičetić Stanković V, Jelić D, Choleva L: Comparative morphology, ecology and structure analysis of the Pelophylax esculentus complex population in Croatia – 12. Hrvatski biološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem; Sveti Martin na Muri, Hrvatska, 18.-23.09.2015.

5. Tramišak Milaković T, **Čavlović K**, Panić Horvat L, Vlašić H, Radojčić Badovinac A, Smiljan Severinski N, Haller H: Vitrifikacija jajnih stanica – početni rezultati – 6. Hrvatski kongres ginekologa i opstetričara, Split, Hrvatska, 26.–29.05.2011.