Populacijska analiza atlantske plavoperajne tune, Thunnus thynnus (Linnaeus, 1758) u kaveznom uzgoju primjenom mikrosatelitnih lokusa

Ivana, Radonić

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:217:231345

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Ivana Radonić

POPULACIJSKA ANALIZA ATLANTSKE PLAVOPERAJNE TUNE, *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758) U KAVEZNOM UZGOJU PRIMJENOM MIKROSATELITNIH LOKUSA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2019

University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Ivana Radonić

A POPULATION ANALYSIS OF CAGE-REARED ATLANTIC BLUEFIN TUNA, *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758) BY APPLICATION OF MICROSATELLITE LOCI

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2019

Ovaj je doktorski rad je izrađen u Laboratoriju za akvakulturu Instituta za oceanografiju i ribarstvo u Splitu, pod vodstvom mentorice izv. prof. dr. sc. Ivone Mladineo i komentorice izv. prof. dr. sc. Ane Galov, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Informacije o mentorima

IVONA MLADINEO

Prof. dr. sc. Ivona Mladineo je znanstvena savjetnica u trajnom zvanju u Laboratoriju za akvakulturu, Instituta za oceanografiju i ribarstvo u Splitu, gdje je zaposlena od studenog 2009. godine. Doktorirala je na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2004. godine, a bavi se istraživanjem bolesti riba, poglavito nametničkim bolestima i imunosnim odgovorom.

ANA GALOV

Izv. prof. dr. sc. Ana Galov (rođ. Gomerčić) je diplomirala 1996. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu. Magisterij znanosti obranila je 2000. godine na istom fakultetu (naslov rada "Mikrosatelitski lokusi u genotipizaciji konja pasmine hrvatski posavac"), a doktorat znanosti također na istom fakultetu 2007. godine (naslov rada: „Genetička raznolikost populacije dobrog dupina *Tursiops truncatus* s osvrtom na druge vrste kitova (Cetacea) Jadranskog mora"). Područja njenog znanstvenog interesa su istraživanja divljih i domaćih životinjskih vrsta, posebno u području populacijske genetike korištenjem neutralnih i adaptivnih genetičkih biljega. Zaposlena je kao izv. prof. na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Nositelj je kolegija Osnove molekularne ekologije, Metode u imunologiji i Temelji animalne fiziologije. Bila je mentor 18 diplomskih i 6 doktorska rada. Koautor je na 44 znanstvena rada, od čega je njih 24 objavljeno u Q1 i Q2 znanstvenim časopisima (prema WoSCC-u). Udana je i majka dvoje djece.

Zahvale

Mentorici prof. dr. sc. Ivoni Mladineo zahvaljujem na odabiru teme i korisnim savjetima tijekom istraživanja i pisanja ovoga rada. Svojim znanjem uvelike je utjecala na moj istraživački rad te bez njezine podrške izrada ovoga rada ne bi bila moguća.
Komentorici prof. dr. sc. Ani Galov se zahvaljujem na pomoći, korisnim savjetima i ispravcima tijekom pisanja ovog rada.

Veliku zahvalnost dugujem Željki i Tanji na pomoći prilikom obrade uzoraka i statističke obrade rezultata, korisnom usmjeravanju prilikom njihove interpretacije te savjetima koji su u velikoj mjeri utjecali na cjelokupan concept ovog rada.

Ovom prigodom želim zahvaliti svim prijateljima i kolegama koji su na bilo koji način doprinjeli stvaranju ovoga rada, na njihovom razumijevanju i velikoj podršci svih ovih godina.

I na kraju, najveću zahvalnost upućujem roditeljima što su uz mene u svakom trenutku i što su mi podrška u svemu što radim.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doktorski rad

POPULACIJSKA ANALIZA ATLANTSKE PLAVOPERAJNE TUNE, *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758) U KAVEZNOM UZGOJU PRIMJENOM MIKROSATELITNIH LOKUSA

IVANA RADONIĆ

Institut za oceanografiju i ribarstvo
Šetalište I. Meštrovića 63, Split

Sažetak

Atlantska tuna *Thunnus thynnus* je pelagična riba s visokim stupnjem eksploatacije i gospodarskog značaja. Kavezni uzgoj ove vrste koji obuhvaća ulov juvenilnih divljih jedinki, njihov transport do uzgajališta i prilagodbu na kavezne uvjete života, može biti stresan za juvenilne ribe i rezultirati neočekivanim mortalitetima.

U ovom istraživanju razvijen je novi set od 13 EST-SSR za *T. thynnus* kako bi se utvrdilo može li se preživljavanje jedinki kroz uzgojni ciklus pratiti na genetičkoj razini i povezati s genima povezanima s imunitetom i odgovorom na uvjete stresa.

Zabilježena je niska F_{ST} vrijednost (0,005), slična frekvencija alela i niska stopa gubitka alela između uzorkovanih populacija. Dva različita pristupa za identifikaciju lokusa pod selekcijom nisu ukazala na odstupanje novorazvijenih lokusa od neutralnosti, te rezultati istraživanja upućuju na to da se oni ne mogu smatrati informativnim u istraživanom kontekstu.

(135 stranica, 10 slika, 12 tablica, 371 literaturna navoda, jezik izvornika - hrvatski)
Ključne riječi: Atlantska plavoperajna tuna, mikrosateliti, EST-SSR, akvakultura, Jadransko more

Mentor: Prof. dr. sc. Ivona Mladineo (Institut za oceanografiju i ribarstvo, Split)
Komentor: Izv. prof. dr. sc. Ana Galov (Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb)

Ocjenjivači: dr. sc. Helena Ćetković (Institut Ruđer Bošković, Zagreb)
izv. prof. dr. sc. Perica Mustafić (Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb)
doc. dr. sc. Ivana Buj (Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb)

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral thesis

A POPULATION ANALYSIS OF CAGE-REARED ATLANTIC BLUEFIN TUNA, *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758) BY APPLICATION OF MICROSATELLITE LOCI

IVANA RADONIĆ

Institute of Oceanography and Fisheries,
Šetalište I. Meštrovića 63, Split

Abstract

Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* is pelagic fish with a high level of exploitation and economic importance. The capture-based aquaculture that involves the catch of wild individuals, a slow transport to the rearing facilities and adaptation to the captive environment, could be stressful for juvenile fish, consequently resulting in unexpected mortalities.

In this study, a new set of 13 EST-SSRs for *T. thynnus* was developed to explore whether the survival success through the farming cycle might be monitored at the genetic level and linked to several immunity and stress response-associated genes.

The observed FST value was low (0.005), showing similar allele frequencies and no major allele loss between tested populations. Two different approaches for the identification of loci under selection did not indicate departure from neutrality for any of the 13 EST-SSRs, suggesting that they may not be considered informative in the studied context.

(135 pages, 10 figures, 12 tables, 371 references, original in Croatian)

Keywords: Atlantic bluefin tuna, microsatellites EST-SSRs, aquaculture, Adriatic Sea

Supervisor: Prof. dr. sc. Ivona Mladineo (Institute of Oceanography and Fisheries, Split)
Co-supervisor: Prof. dr. sc. Ana Galov (Faculty of Science, Zagreb)

Reviewers: dr. sc. Helena Ćetković (Institut Ruđer Bošković, Zagreb)
izv. prof. dr. sc. Perica Mustafić (Faculty of Science, Zagreb)
doc. dr. sc. Ivana Buj (Faculty of Science, Zagreb)

SADRŽAJ

1. UVOD

1.1. Svrha istraživanja

1.2. Cilj istraživanja

1.3. Opseg rada

1.4. Metode rada

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Sistematika atlantske plavoperajne tune *Thunnus thynnus*

2.2. Rasprostranjenost atlantske plavoperajne tune *Thunnus thynnus*

2.3. Biološko-ekološke osobine atlantske plavoperajne tune *Thunnus thynnus*

2.3.1. Ishrana atlantske plavoperajne tune *Thunnus thynnus*

2.3.2. Razmnožavanje atlantske plavoperajne tune *Thunnus thynnus*

2.4. Regulacija ribolova i uzgoja atlantske plavoperajne tune *Thunnus thynnus*

2.4.1. Kavezni uzgoj atlantske plavoperajne tune *Thunnus thynnus*

2.4.2. Utjecaj kaveznog uzgoja na imunološki sustav atlantske plavoperajne tune *Thunnus thynnus*

2.5. Genska raznolikost

2.5.1. Mikrosatelitni biljezi

2.5.2. Istraživanja genetike riba mikrosatelitnim biljezima

2.6. Istraživanja atlantske plavoperajne tune *Thunnus thynnus*

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Prikupljanje uzoraka atlantske plavoperajne tune *Thunnus thynnus*

3.2. Izolacija ukupne DNA

3.2.1. Postupak izolacije DNA

3.2.2. Određivanje koncentracije i čistoće DNA pomoću UV spektrofotometrije

3.2.3. Razrijeđenje uzoraka DNA na koncentraciju od 10 ng

3.3. Razvijanje novih EST-SSR početnica za atlantsku plavoperajnu tunu *Thunnus thynnus*

3.4. Umnožavanje (amplifikacija) mikrosatelitnih lokusa u lančanoj reakciji polimerazom (PCR)

3.4.1. Provjera umnažanja PCR produkta elektroforezom u agaroznom gelu
3.4.2. Optimizacija združene (engl. multiplex) PCR reakcije
3.5. Statistička obrada podataka

4. REZULTATI
4.1. Analiza novorazvijenih EST-SSR početnica za atlantsku plavoperajnu tunu *Thunnus thynnus*
4.2. Uspješnost genotipizacije mikrosatelitnih lokusa kod atlantske plavoperajne tune *Thunnus thynnus*
4.3. Statistička analiza podataka
4.3.1. Opisna statistika i testiranje Hardy-Weinbergove ravnoteže
4.3.2. Genetička udaljenost između populacija i grupa

5. RASPRAVA

6. ZAKLJUČCI

7. LITERATURA

8. PRILOZI

9. ŽIVOTOPIS

1. UVOD

Atlantska plavoperajna tuna (*Thunnus thynnus*) je velika pelagična riba iz razreda koštunjača i porodice skušovki (Scombridae). Prvi put ju je znanstveno opisao Linnaeus 1758. godine kao *Scomber thynnus* (Ottolenghi, 2008). Budući da je iznimno nutritivno bogata veoma je cijenjen ulov te dostiže visoku tržišnu vrijednost. Na svjetskoj razini ulov tuna i crno tržište su se desetljećima nekontrolirano razvijali, što je dovelo u pitanje njezin opstanak i ugroženost same vrste (Collete i sur., 2011; Benetti i sur., 2016). Zbog toga je osnovana Međunarodna komisija za očuvanje i zaštitu atlantskih tuna (ICCAT) kao međunarodna organizacija koja prati stanje biozaliha tuna i njima sličnih vrsta u Atlantskom oceanu, Sredozemnom moru i pripadajućim rubnim morima.

Uzgoj tuna je profitabilna industrija koja donosi visoku ekonomsku dobit, a kavezni način uzgoja ove vrste se tijekom zadnjih 30 godina znatno povećao te je uspostavljen u zemljama diljem svijeta poput Japana, Australije, Sjeverne Amerike, Dalekog Istoka i Sredozemnog mora (Benetti i sur., 2016; Fernandez-Polanco i Llorente, 2016; Harley i sur., 2013; Ottolenghi, 2008; Sumaila i Huang, 2012). Tuna predstavlja jedan od najvažnijih izvoznih proizvoda, te je pridonijela naglom razvoju ribarstva i marikulture u Hrvatskoj. Međutim, ulov, dugotrajni transport do uzgajališta, adaptacija na kavezne uvjete života, ozljede nastale tijekom manipulacije ribom ili sudaranja i zaplitanja u mrežu kaveza tijekom transporta i uzgoja, u kombinaciji s raznim biotičkim i abiotičkim čimbenicima mogu uzrokovati stres kod juvenilnih jedinki, koji ima snažni suprimirajući učinak na sastavnice urođene imunosti (Balli i sur., 2016; Honryo i sur., 2018; Magnadóttir, 2006; Meyer, 1991; Munday i sur., 2003; Mylonas i sur., 2010; Ottolenghi, 2008). Urođena imunost je temeljni obrambeni mehanizam kod riba te je važna u zaštiti od uzročnika bolesti i održavanju homeostaze (Magnadóttir, 2006). Pad imunosti uslijed stresnih uvjeta dovodi do osjetljivosti na infekcije i razvoja bolesti (Kirchhoff, 2012; Polinski i sur., 2014; Rauta i sur., 2012) što loše utječe na rast i kondiciju (Mladineo i sur., 2006) i u konačnici može rezultirati mortalitetom i velikim gubicima u proizvodnji uzgajališta (Buentello i sur., 2016; Evans, 2015).

Tijekom zadnjih nekoliko desetljeća intenzivno se provode biološka i populacijska istraživanja ekonomski važnih vrsta tuna iz roda Thunnus (*T. thynnus, T. orientalis, T. maccoyii*) korištenjem različitih genetičkih biljega, a prikupljeni podatci su značajni za razumijevanje njihove ekologije i evolucije, prvenstveno u svrhu očuvanja populacija u

prirodnom okolišu, ali i razvoja održivog uzgoja u akvakulturi (Barton, 2002; Barton i Iwama, 1991; Ferrara i sur., 2010; Rooker i sur., 2007).

1.1. Svrha istraživanja

Svrha ovog istraživanja je pridonijeti poznavanju populacijske genetike atlantske plavoperajne tune *T. thynnus* ulovljene u Jadranskom moru, kao i utjecaju uzgojnog ciklusa na prisutnost pojedinih alela u populaciji i posljedično preživljavanje ove vrste. Razvojem i optimizacijom nove skupine mikrosatelitskih biljega za genotipizaciju lokusa koji se nalaze u, ili u blizini kodirajućih regija gena povezanih s imunološkim sustavom i odgovorom na stres, dat će se znanstveni doprinos poznavanju populacijske genetike atlantske plavoperajne tune u kaveznom uzgoju.

1.2. Cilj istraživanja

Cilj ove disertacije je razviti i optimizirati nove potencijalno informativne mikrosatelitne biljege u, ili u blizini kodirajućih regija gena povezanih s imunološkim i staničnim sustavom aktivnog transporta, te pomoću njih istražiti moguće razlike u genotipovima divljih juvenilnih jedinki atlantske plavoperajne tune koje ulaze u kavezni uzgoj i jedinki koje prežive do kraja uzgojnog ciklusa u Jadranskom moru.
Nadalje, pomoću novih mikrosatelitnih biljega cilj je utvrditi potencijalne biljege koji bi mogli poslužili za otkrivanje jedinki u novoulovljenoj populaciji juvenilnih tuna iz Jadranskog mora sklonijih slabijem odgovoru na stres tijekom uzgojnog ciklusa.

1.3. Opseg rada

Istraživanje je provedeno na 334 uzorka atlantske plavoperajne tune iz dva uzastopna uzgojna ciklusa na uzgajalištu u blizini južne strane otoka Brača u središnjem dijelu Jadranskog mora. Također u ovom istraživanju je razvijeno i na uzorkovanim jedinkama tune testirano 25 mikrosatelitnih lokusa.

1.4. Metode rada

U istraživanju je korištena genotipizacija mikrosatelitnih lokusa što je standardna metoda za istraživanje genetičke raznolikosti.

Mikrosateliti ili jednostavni ponavljajući sljedovi (engl. Simple Sequence Repeats; SSRs) su sveprisutni oblik ponavljajuće DNA u eukariotskom i prokariotskom genomu, a zbog mogućnosti brze i jednostavne amplifikacije PCR reakcijom (engl. Polymerase Chain Reaction) (Chistiakov i sur., 2006; Li i sur., 2002) koriste se u raznim područjima genetičkih, ekoloških i medicinskih istraživanja (Antoniou i sur., 2017; Broughton i Gold 1997; Carlsson i sur., 2004, 2007; Chistiakov i sur., 2006; Riccioni i sur., 2010a i b, 2013, 2017). Nalaze se u kodirajućim i nekodirajućim regijama DNA i obuhvaćaju veliki udio genetičkog materijala. Iako se većinom smatraju evolucijski neutralnim biljezima (Li i sur., 2002) mogu biti povezani s kodirajućim regijama gena, poput EST-SSR (engl. Expressed Sequence Tag-Simple Sequence Repeat) biljega, pa njihovi polimorfizmi mogu imati utjecaj na ekspresiju funkcionalnih gena, a time i na fitness jedinki povezan s pripadajućim svojstvima (Chistiakov i sur., 2006; Li i sur., 2011; Vasemägi i sur., 2005). EST (engl. Expressed Sequence Tags) mogu sadržavati brojne mikrosatelite (Ellis i Burke, 2007). To su mali dijelovi DNA sljedova koji se dobiju sekvenciranjem jednog ili oba kraja eksprimiranog gena. Razvoj mikrosatelitnih biljega iz EST pokazao se kao moguća opcija za dobivanje visokokvalitetnih biljega (Gupta i sur., 2003) koji su mnogo očuvaniji unutar taksonomskih granica nego što su to neutralni mikrosateliti, stoga se sve češće koriste u genetičkim istraživanjima (Agostini i sur., 2013; Ellis i Burke, 2007; Vasemägi i sur., 2005).

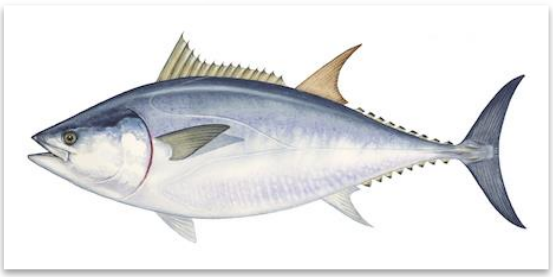
U ovom istraživanju su odabrani mikrosateliti razvijeni na kalupu EST sljedova iz prethodno razvijene normalizirane cDNA (engl. complementary DNA) knjižnice tkiva *T. thynnus* u Laboratoriju za akvakulturu, Instituta za oceanografiju i ribarstvo u Splitu (Trumbić, 2015). Izbor je napravljen prema funkcionalnom opisu sljedova gena na kojima je pronađen mikrosatelitni motiv, a koji se mogu dovesti u vezu s različitim vidovima imunološkog i staničnog sustava aktivnog transporta kod tune kao nemodelnog organizma, te otpornošću na uvjete stresa.

2. LITERATURNI PREGLED

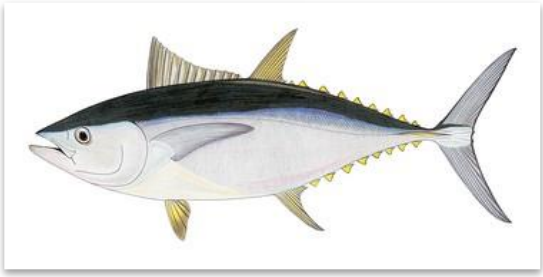
U svjetskim morima žive tri vrste plavoperajne tune: atlantska plavoperajna tuna (*Thunnus thynnus*) koja nastanjuje područje Atlantskog oceana i Sredozemno more; pacifička plavoperajna tuna (*Thunnus orientalis*) koja nastanjuje sjeverni dio Tihog oceana, ali zalazi i u južni dio Tihog oceana, pred obale zapadne Australije i Papuanski zaljev; te južna plavoperajna tuna (*Thunnus maccoyii*) koja nastanjuje južni dio Tihog, Atlantskog i Indijskog oceana (Slika 1; Tablica 1).

a)

b)

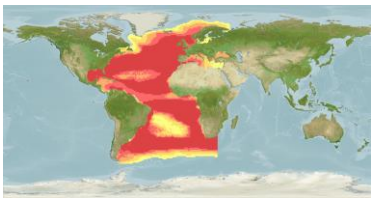
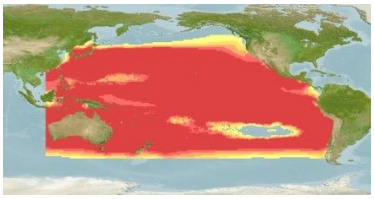
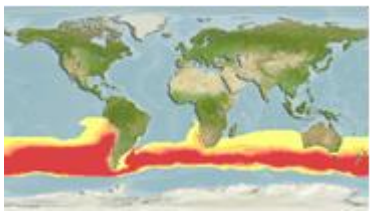


c)



Slika 1. Vrste plavoperajnih tuna: a) atlantska plavoperajna tuna *(Thunnus thynnus*); b) pacifička plavoperajna tuna (*Thunnus orientalis*); c) južna plavoperajna tuna (*Thunnus maccoyii*) (izvor: www.fishbase.org; www.efishalbum.com).

Tablica 1. Geografski raspon, biološke osobitosti i status zaštite Međunarodne unije za očuvanje prirode (engl. The International Union for Conservation of Nature; IUCN) tri vrste plavoperajne tune (izvor: www.fishbase.org)

Vrsta	Geografski raspon	Raspon dubine	Dužina tijela	Masa	Dob	IUCN Status zaštite
Atlantska plavoperajna tuna *(Thunnus thynnus)*		0-985 m	458 cm	684 kg	32 godine	Ugrožena (engl. endangered)
Pacifička plavoperajna tuna (*Thunnus orientalis*)		1-200 m	300 cm	450 kg	15 godina	Ranjiva (engl. vunerable)
Južna plavoperajna tuna (*Thunnus maccoyii*)		50-2743 m	245 cm	260 kg	20 godina	Kritično ugrožena (engl. critically endangered)

2.1. Sistematika atlantske plavoperajne tune *Thunnus thynnus*

Carstvo: Animalia

Koljeno: Chordata

Potkoljeno: Vertebrata

Nadrazred: Gnathostomata

Razred: Actinopterygii

Red: Perciformes

Podred: Scombroidei

Porodica: Scombridae

Rod: *Thunnus*

Vrsta: *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758)

2.2. Rasprostranjenost atlantske plavoperajne tune *Thunnus thynnus*

Atlantska plavoperajna tuna je rasprostranjena u zapadnom dijelu Atlantskog oceana od obala Kanade, Meksičkog zaljeva, Kariba do Venezuele i Brazila, te u istočnom dijelu Atlantskog oceana od obala Norveške do Kanarskih otoka, uključujući Sredozemno more i južni dio Crnog mora (Tablica 1). Duž tog područja migrira desetke tisuća kilometara, prvenstveno u svrhu reprodukcije i potrage za hranom (Slika 2) (Abascal i sur., 2016; Block, 2001; Fromentin i Powers, 2005; Reeb, 2010; Rooker i sur., 2007; Taylor i sur., 2011; Vanderlaan i sur., 2014). Juvenilne jedinke se najčešće kreću u jatima u plićim područjima (epipelagijal), dok adultni primjerci zaranjaju u dublja i hladnija područja (mezopelagijal) (Brill i sur., 1999; Ottolenghi, 2008).

Populacije unutar Atlantskog oceana su podijeljene na dva stoka (istočni i zapadni stok) pomoću 45º meridijana, temeljem različite dobi postizanja spolne zrelosti, odvojenog područja mrijesta, genetičke diferencijacije i ponašanja (Boustany i sur., 2008; Carlsson i sur., 2004; 2007; Fromentin, 2009; Fromentin i Powers 2005; Riccioni i sur., 2010b; Viñas i sur., 2011).

Slika 2. Područje rasprostranjenosti atlantske plavoperajne tune *T. thynnus* u Atlantskom oceanu (svijetloplavo područje), područja mrijesta (narančasto - zapadni stok, modro - istočni stok), crta odvajanja dva stoka 45º meridijanom (žuta isprekidana linija) i migracijski putevi (smeđe strelice) (izvor: www.pewtrusts.org).

2.3. Biološko-ekološke osobine atlantske plavoperajne tune *Thunnus thynnus*

Atlantska plavoperajna tuna je jedna od najvećih koštunjavih riba budući da može dostići dužinu do 3 m, iako najčešće dostiže od 0,5 do 2 metra. Može težiti i do 680 kg te doživjeti dob od 40 godina. U odrasloj dobi rast u dužinu se usporava, dok se masa povećava (Api i sur., 2018; Corriero i sur., 2005; Cort i sur., 2013; Neilson i Campana, 2008; Santamaria i sur., 2009). Juvenilne jedinke nakon godinu dana dostižu masu od oko 4 kg i dužinu od oko 60 cm, tune otprilike 10 godina starosti imaju masu od oko 150 kg i dužinu od oko 200 cm, dok tune starosti 20 godina imaju masu i do 400 kg te dužinu od 300 cm (Fromentin i Powers, 2005). U literaturi je zabilježeno da zapadni stok raste brže nakon dostizanja spolne zrelosti i dostiže veće dužine od istočnog stoka, te da mužjaci rastu brže od ženki pa su proporcionalno češći u ulovu (ICCAT, 2017).

Tuna ima snažno mišićavo tijelo vretenastog oblika, tamno plave boje s leđne, te srebrnkaste s trbušne strane, očima u ravnini s tijelom, adipoznim kapcima, te nizom malih perajica s gornje i donje strane repne peraje koje joj služe za održanje stabilnosti i smanjenje turbulencija prilikom plivanja. Bočna pruga je uočljiva i proteže se duž čitavog tijela. Leđne peraje su razdvojene uskim prostorom, prva je dugačka i trokutasta, a druga kratka i zašiljenog vrha. U prednjoj leđnoj peraji se nalazi 12 do 15 tvrdih žbica, a u drugoj jedna tvrda i 13 mekanih. Prsne peraje su duže od trbušnih, a repna peraja je u obliku polumjeseca i istih dužina na oba kraja. Zubi su maleni i konični, poslagani u jedan red s obje strane čeljusti (Jardas, 1996).

Tuna je „savršeni stroj za plivanje" i spada među najbrže ribe u moru jer prilikom plivanja u potrazi za hranom može razviti veliku brzinu te roniti na velikim dubinama (Kitagawa i sur., 2004). Kreće se tuniformnim načinom plivanja koje karakterizira minimalno bočno pomicanje tijela, te snažne oscilacije repne peraje (Katz i sur., 2001; Shadwick i Syme 2008; Syme i Shadwick, 2002). Ima relativno mali plivaći mjehur stoga stalno mora biti u pokretu kako nebi tonula. To joj omogućava viša stopa aerobnog metabolizma u čemu joj za unošenju dovoljne količine kisika pomaže velika površina škrgi i njihov tanki epitel. Nije u mogućnosti koristiti kontrakcije škržnih mišića operkuluma za izbacivanje vode kroz škrge, stoga se koristi „ram" ventilacijom (kontinuiranim protokom vode kroz otvorena usta i škrge) koja je energetski isplativija (Wegner i sur., 2013). Također, ima veliko i jako srce koje sudjeluje u prijenosu kisika u tkiva održavajući visoki krvni tlak i minutni volumen koji može biti i do tri puta veći nego kod ostalih vrsta riba (Blank, 2004; Brill i Bushnell, 2001; Korsmeyer i Dewar, 2001).

Glavnu masu mišića tvori veliki postrani mišić koji se prostire s obje strane tijela od glave do repa. On se sastoji od mišićnih ploča (miomera) koje tvore oblik slova W i mišićnih septa (miosepta). Mišići se dijele na bijele (siromašni sarkoplazmom, male gustoće vlakana, slabe prokrvljenosti, za snažno kratkotrajno plivanje i anaeroban rad) i crvene (nalaze se površinski i postrano, bogati sarkoplazmom, velike gustoće vlakana, prokrvljeni, za neprekidne plivaće kontrakcije i aeroban rad). Crveni mišići su povezani s krvožilnim protustrujnim sustavom (lat. *rete mirabile*) koji djeluje kao regulator topline omogućavajući metabolički aktivnim tkivima da se zagriju iznad temperature okolne vode. Krvne žile kojima prolazi topla krv mogu prenijeti toplinu na hladnu krv koja dolazi iz škrga i dostavlja kisik u mišiće za plivanje (Blank i sur., 2007; Collette i sur., 2001; Helfman i sur., 2009; Munday i sur., 2003). Ovakav specifičan način termoregulacije pruža tuni mogućnost podnošenja ekstremnih promjena temperatura tijekom potrage za plijenom u hladnijim i dubljim područjima, te doprinosi sposobnosti prekooceanskih migracija duž Atlantskog oceana (Blank, 2004; Block, 2001; Carey i Teal, 1969; Fromentin i Powers, 2005).

2.3.1. Ishrana atlantske plavoperajne tune *Thunnus thynnus*

Kao mnoge morske ribe, ličinke atlantske plavoperajne tune se hrane malim zooplanktonom (kopepodima i nauplijima kopepoda), ličinkama drugih riba, ali mogu biti sklone i kanibalizmu (Laiz-Carrión i sur., 2015; Llopiz i sur., 2015; Uriarte i sur., 2018). Kopepodi su veoma važni za zdravi razvoj ličinki tuna zbog svoje sposobnosti sinteze visoko nezasićenih masnih kiselina iz algi koje konzumiraju (Ajiboye i sur., 2010). Juvenilne i adultne tune su većinom predatori. Ishrana im se sastoji najvećim dijelom od male pelagične ribe poput srdele *Sardina pilchardus*, srdele goleme *Sardinella aurita*, papaline *Sprattus sprattus*, inćuna *Engraulis encrasicolous*, haringe *Clupea harengus*, ali i od glavonožaca i rakova (Battaglia i sur., 2013; Fromentin i Powers, 2005; Karakulak i sur., 2009; Sarà i Sarà, 2007; Sorell i sur., 2017; Uotani i sur., 1990; Varela i sur., 2014). U blizini obale se hrane i morskim zvjezdačama, kelpom i manjim obalnim vrstama riba. Način lova je različit za svaki pojedini plijen, npr. metoda ulova male plave ribe je zalijetanjem u njihova jata izazivajući im dezorijentaciju, a zatim ih naglim ubrzanjima ulove.

2.3.2. Razmnožavanje atlantske plavoperajne tune *Thunnus thynnus*

Atlantska plavoperajna tuna je oviparna i iteroparna vrsta (Corriero i sur., 2005; Heinisch i sur., 2014; Schaefer, 2001). Spolno zrele jedinke se svake godine okupljaju u područjima pogodnim za mrijest kada temperatura mora poraste na oko 24 °C (Block i sur., 2005; Schaefer, 2001). Oplodnja se događa neposredno u morskom stupcu, ikra je pelagična i promjera 1-1,2 mm, a ličinke veličine 3-4 mm izvale se nakon nekoliko dana. One sadrže žumanjčanu vrećicu i relativno nerazvijen oblik tijela. Sadržaj žumanjčane vrećice se potroši u roku od nekoliko dana, a zatim se počinju samostalno hraniti (Fromentin i Powers, 2005). Fekunditet tune je izrazito velik; svaka spolno zrela ženka može ispustiti 10-30 milijuna jaja, međutim postotak preživljavanja embrija do odraslog stadija je veoma nizak (Aranda i sur., 2013).

Postizanje spolne zrelosti i sazrijevanje jaja i ličinki ovisi o području mrijesta i okolišnim čimbenicima poput temperature mora, strujanja, intenziteta svjetlosti i duljine dana (Masuma i sur., 2011; Reglero i sur., 2018). Tune u istočnom dijelu Atlantskog oceana i u Sredozemnom moru dostižu spolnu zrelost u dobi od oko 4 godine kada dostignu dužinu 110-120 cm i masu od 30-35 kg, dok u zapadnom dijelu Atlantskog oceana postaju spolno zrele mnogo kasnije, u dobi od 6-8, te čak i do 11 godina starosti kada dostignu dužinu od oko 200 cm i masu od oko 150 kg (Block i sur., 2005; Corriero i sur., 2003, 2005; Dickhut i sur., 2009; Heinisch i sur., 2015). Kod srodnih vrsta poput pacifičke plavoperajne tune (*T. orientalis*) i južne plavoperajne tune (*T. maccoyii*) zabilježena je slična dob spolne zrelosti kao i kod zapadnog stoka atlantske plavoperajne tune (Caton, 1991; Schaefer, 2001).

Mrijest se odvija u 2 područja; u Meksičkom zaljevu u razdoblju između travnja i lipnja kada se površinska temperatura kreće između 22,6-27,5 °C, te u Sredozemnom moru u razdoblju između lipnja i kolovoza kada se površinska temperatura mora kreće između 22,5-25,5 °C (Boustany i sur., 2008; Cermeño i sur., 2015; Collette i sur., 2011; Corriero i sur., 2003; Ravier, 2001; Richardson i sur., 2016; Rooker i sur., 2007). U Sredozemnom moru zabilježen je mrijest u nekoliko područja; u središnjem dijelu (područje Balearskih otoka i Tirensko more) tijekom lipnja i srpnja te u istočnom dijelu (Levantinsko more) gdje se odvija nešto ranije, tijekom svibnja i lipnja (Boustany i sur., 2008; Corriero i sur., 2003, 2005; Gordoa i sur., 2009; Heinisch i sur., 2014; Medina i sur., 2002; Oray i Karakulak, 2005; Viñas i sur., 2011).

Tijekom prošlog desetljeća nekoliko puta je zabilježen spontani mrijest tune u kavezima uzgajališta duž Sredozemnog mora uključujući i Jadransko more, međutim tek se korištenjem

molekularnih metoda potvrdilo da su ličinke uzorkovane u kavezima u uzgajalištu tune zaista jedinke *T. thynnus* budući da se uobičajena prijašnja karakterizacija ličinki i juvenilnih jedinki većinom temeljila na morfološkoj identifikaciji (Džoić i sur., 2017; Gordoa i sur., 2009; Grubišić i sur., 2013; Medina i sur., 2016; Puncher i sur., 2015). Glavni okidač za mrijest tuna je nagli porast temperature na oko 24 °C (Schaefer, 2001), što je u Jadranskom moru zbog njegove plitkosti česta pojava tijekom ljetnih mjeseci (Lionello i sur., 2012; Lipizer i sur., 2014; Shaltout i Omstedt, 2014).

2.4. Regulacija ribolova i uzgoja atlantske plavoperajne tune *Thunnus thynnus*

Atlantski ocean u kojem obitavaju atlantske plavoperajne tune je pod nadležnošću različitih država, a veliki udio obuhvaćaju i međunarodne vode, stoga je za učinkovitu zaštitu ove vrste bilo potrebno uspostaviti organizaciju čija bi uloga bila koordiniranje i razmjena znanstvenih i ribolovnih podataka. U tu svrhu je 1969. godine u Rio de Janieru osnovana Međunarodna komisija za očuvanje i zaštitu atlantskih tuna (engl. The International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas - ICCAT) čija je glavna zadaća očuvanje i kontrola izlova atlantske plavoperajne tune i ostalih migratornih vrsta u Atlantskom oceanu, Sredozemnom moru te pripadajućim rubnim morima.

Djelovanje ICCAT-a obuhvaća niz aktivnosti, npr. provođenje istraživanja koja uključuju oceanografiju, biometriju i ekologiju s naglaskom na utjecaj ribolova na gustoću stokova u prirodi, prikupljanje i statističku analizu podataka o stanju ribljih fondova u područjima nadležnosti, te prikupljanje podatka o prilovu ulovljenom prilikom lova tune, a koji nije predmet interesa drugih međunarodnih ribarskih udruženja. Jedna od najvažnijih djelatnosti je nadzor stokova tune te propisivanje različitih mjera upravljanja ovom vrstom, među kojima su najznačajnije izlovne kvote. Kvote se odnose na maksimalne dopuštene ulovne veličine u tonama i dodjeljuju se od 1982. godine jednom godišnje, za svaku državu članicu zasebno, na temelju znanstvenih podataka, ali i povijesnih podataka o ulovu i ribolovnoj floti, te se propisuju za svaki ribolovni alat posebno. Države koja nisu članice ICCAT-a tunu ne smiju loviti, uzgajati i stavljati u promet. Kvote nisu vezane za teritorijalno more pojedinih članica, već za same brodove što znači da brodovi mogu loviti bilo gdje u području nadležnosti ICCAT-a, dok su unutar kvote matične države. Osim kvota, ICCAT propisuje i vrijeme lovostaja, minimalne ulovne veličine, način uporabe ribolovnih alata, te način praćenja i prikupljanja podataka o ulovu, nasadu, uzgoju i trgovini tunom. Sve te mjere se mijenjaju tijekom godina na temelju podataka dobivenih znanstvenim istraživanjima koja pokazuju da

se stokovi postepeno oporavljaju (Karakulak i sur., 2016), ali u većini država minimalna veličina ulovnih jedinki je ograničena na masu od 30 kg i veličinu od 115 cm dužine. Za razliku od ostalih država u Sredozemnom moru te činjenice da je Jadransko more specifično područje u koje zalaze manji primjerci tune prvenstveno radi hranjenja malom plavom ribom, ICCAT je 2006. godine Republici Hrvatskoj odobrio ulov tune minimalne ulovne mase od 8 kg, te minimalne izlovne mase od 30 kg (Mylonas i sur., 2010; Katavić i sur., 2003). Ta ulovna masa vrijedi samo za potrebe uzgoja te su ribari zakonski obavezni prehranjivati nedorasle jedinke dok ne dostignu prosječnu masu od minimalno 30 kg. Za postizanje navedenog potrebno je najmanje 18 mjeseci, stoga prosječan uzgoj tune u Republici Hrvatskoj traje dvije do tri godine (Mylonas i sur., 2010; Ottolenghi, 2008).

Kavezni uzgoj je primarno ribarska djelatnost kojom se proizvodi hrana, obavlja se na pomorskom dobru te je potrebna koncesija za gospodarsko korištenje pomorskog dobra za djelatnost uzgoja koja se dobiva od Ministarstva mora, prometa i infrastrukture. Budući da hrvatsko teritorijalno more pripada Sredozemnom moru i Atlantskom oceanu u njemu se može uzgajati samo atlantska plavoperajna tuna koja u to područje dolazi isključivo radi hranjenja. Ribolov i uzgoj tune je reguliran nizom zakonskih propisa od kojih je najvažniji Pravilnik o ulovu, uzgoju i prometu tune (*T. thynnus*), igluna (*Xiphias gladius*) i iglana (*Tetrapturus belone*). Tim pravilnikom se u svrhu racionalnog gospodarenja i zaštite tune propisuje državna ulovna kvota, ukupna izlovna kvota te dopuštena izlovna kvota tuna po pojedinim oblicima ribolova i ribolovnim alatima; zatim mjere obavljanja ribolova, dozvoljeni alati i oprema; mjere upravljanja kapacitetom ribolovne flote za ulov; vremenska zabrana korištenja pojedinih ribolovnih alata, minimalna ulovna veličina; način obavljanja sportskog ribolova tune (*T. thynnus)*, igluna (*X. gladius*) i iglana (*T. belone*); način obavljanja rekreacijskog ribolova tune (*T. thynnus),* igluna (*X. gladius*) i iglana (*T. belone*); način obavljanja radnji prebacivanja, prekrcavanja, stavljanja ribe u kaveze, izlova i iskrcaja; dozvoljen ukupni uzgojni kapacitet; dozvoljena ukupna ulazna količina tuna u uzgajališta; mjere obavljanja uzgoja; obveze izvještavanja te dostava podataka o ulovu, prebacivanju, prekrcaju, iskrcaju i uzgoju; evidencija ulova i unakrižna provjera podataka; upotreba sustava praćenja plovila; program promatrača na ribarskim plovilima i uzgajalištima, te tržišne mjere (NN 4/2017). U pravilniku su također navedeni propisi o vremenu i načinu ribolova, te upute ovlaštenicima povlastice za uzgoj. Izlov se obavlja nakon dostizanja tržišno prihvatljive cijene i veličine ribe, o čemu su ovlaštenici povlastice za uzgoj tune dužni prije planiranog provođenja izlova obavijestiti nadležno ministarstvo. Izlov tuna s uzgajališta, njihov prekrcaj na plovilo za preradu i prijevoz, te ispravnost i usklađenost svih radnji i dokumentacije

kontrolira ribarska inspekcija. Tijekom izlova, u svrhu dobivanja podataka o dužini i masi tuna izlovljenih iz svih instalacijskih kaveza, provodi se znanstveno uzorkovanje 100 jedinki za svakih 100 tona žive tune, odnosno 10% od ukupnog broja tuna u pojedinom uzgojnom kavezu (NN 4/2017).

2.4.1. Kavezni uzgoj atlantske plavoperajne tune *Thunnus thynnus*

Akvakultura je kontrolirani uzgoj vodenih organizama (FAO, 2009). Jedna je od najbrže rastućih aktivnosti u proizvodnji hrane u posljednjih nekoliko godina koja čini skoro polovicu svjetske opskrbe vodenim organizmima za ljudsku prehranu. Marikultura, kao dio akvakulture, podrazumijeva kontrolirani uzgoj riba, rakova, mekušaca i vodenoga bilja u morskoj ili bočatoj vodi. Odvija se u bazenima, plutajućim kavezima ili drugim uzgojnim instalacijama koje se smještaju u zaštićene dijelove priobalnoga mora. U Republici Hrvatskoj uključuje uzgoj bijele i plave ribe i školjkaša. Najznačajnije vrste morskih riba u uzgoju su lubin (*Dicentrarchus labrax*), komarča (*Sparus aurata*) i atlantska plavoperajna tuna (*T. thynnus*), a od školjkaša modra dagnja (*Mytilus galoprovincialis*) i plosnata kamenica (*Ostrea edulis*). Od ostalih vrsta u uzgoju značajne su Jakobova kapica (*Pecten jacobaeus*), hama (*Argyrosomus regius*), pic (*Diplodus puntazzo*), zubatac (*Dentex dentex*), pagar (*Pagrus pagrus*) i romb (*Scophthalmus maximus*) (www.mps.hr).

Atlantska plavoperajna tuna spada u iznimno važne riblje vrste u gospodarstvu te se lovi stoljećima zbog svog ukusnog i hranjivog mesa. Meso joj obiluje skupinama tvari potrebnih ljudskom organizmu poput nezasićenih masnih kiselina (omega-3 masne kiseline), proteina, esencijalnih aminokiselina, vitamina, te elemenata fluora, natrija, kalcija i joda. Smatra se da konzumacija ove namirnice pogoduje reduciranju masnoće u krvi, sprečavanju bolesti kardiovaskularnog sustava, pomoći u prevenciji nastanka tumora i općenito pridonosi boljem zdravstvenom stanju organizma (Garaffo i sur., 2011; Mozaffarian i sur., 2003; Özden i sur., 2018).

Kavezni uzgoj tune ima dva oblika:

a) uzgoj temeljen na ribolovu

b) uzgoj temeljen na induciranom mrijestu

a) Uzgoj tune temeljen na ribolovu je najstarija i najzastupljenija metoda. Osniva se na principu da se juvenilni primjerci tune ulove u svom prirodnom staništu mrežama plivaricama i transportiraju u instalacijske kaveze gdje se hrane (tove) s ciljem povećanja

mase (prirasta) do zadovoljavajuće tržišne mase i kvalitete mesa (Giménez-Casalduero i Sánchez-Jerez, 2006; Mylonas i sur., 2010; Ottolenghi, 2008).

Ovim načinom kaveznog uzgoja tune u Jadranskom moru se započelo 1996. godine od strane povratnika iz Australije, temeljem iskustva uzgoja južne plavoperajne tune (*T. maccoyii*) (Katavić i sur., 2003; Miyake i sur., 2003). Danas u Republici Hrvatskoj djeluje nekoliko uzgajališta na području Zadarske i Splitsko-dalmatinske županije te ova grana gospodarstva ima važan socio-ekonomski značaj, posebice u otvaranju novih radnih mjesta, obnovi ribarske flote, izgradnji kopnene ribarske infrastrukture i logistike, te razvoju pratećih djelatnosti vezanim uz nabavu hrane.

Ova metoda uzgoja se sastoji od nekoliko faza:

1) Ribolov - nabava nasadnog materijala

Ribolov se obavlja posebno opremljenim brodovima - tunolovcima plivaričarima. Potrebno je prvo otkriti jata tuna u otvorenom moru te ih uz pomoć radne brodice (engl. skiff) kojoj je svrha pridržavanje jednog kraja mreže dok plivarica otpuštajući mrežu okružuje jato, uloviti i prebaciti u transportne kaveze.

2) Prijevoz ulovljenih tuna do uzgajališta

Nakon otkrivanja, ulova i prebacivanja u transportne kaveze, tune se tegljačem polagano dovlače do instalacijskih kaveza uzgajališta. Transportni kavezi su armirane konstrukcije s plutajućim elementima povezane s brodom konopom dužine 150-200 m, kako bi se smanjila naprezanja u plovidbi. Brod koji vuče transportni kavez mora se kretati vrlo sporo, brzinom od 1 do najviše 1.5 čvora (Nm/h), pa transport do uzgajališta zna potrajati i do nekoliko tjedana.

3) Uzgoj tuna u instalacijskim kavezima

Nakon prebacivanja tune iz transportnih kaveza u instalacijske kaveze u uzgajalištu slijedi najvažniji dio uzgoja. Vizualnom procjenom ronioca određuje se količina nasadnog materijala, tj. broj ulovljenih jedinki, te njihova dužina i masa. Instalacijski uzgojni kavezi su plutajući kavezi pučinskog (engl. offshore) tipa koji mogu izdržati snažne nalete valova i vjetra. Osnovni parametri na temelju kojih se određuje potrebna površina za uzgajanje određene mase tuna su dubina područja uzgajališta, dubina kaveza za uzgoj, trajanje uzgojnog ciklusa i tehnika sidrenja. Nadalje, potrebno je odabrati miran položaj udaljen od obale, s malim prometom plovila i ostalim potencijalno uznemirujućim aktivnostima te sa što boljom kakvoćom vode i bogato prirodnom hranom. Uz pravilan odabir osobitosti kaveza (oblik, veličina i dubina) sve navedeno utječe na bolji prirast, konverziju hrane, smanjenje

stresnih uvjeta i smrtnosti tijekom uzgojnog ciklusa (Katavić i sur., 2016; Ottolenghi, 2008; Tsuda i sur., 2012).

U uzgajalištima se juvenilne jedinke tune hrane do sitosti nekoliko puta dnevno svježom i odmrznutom malom plavom ribom, glavonošcima, rakovima te haringama iz uvoza u razdoblju od šest mjeseci do tri godine, tj. do postizanja željene konzumne veličine i mase (Buentello i sur., 2016). Dnevna količina hrane koju ribe pojedu ovisi o uzrastu, planskim ciljevima uzgajivača i vanjskim okolišnim uvjetima, pogotovo temperaturi. Konzumacija hrane se najbolje odvija u ljetnim mjesecima te se smanjuje s opadanjem temperature mora (Claireaux i Lagardère, 1999; Klinger i sur., 2016). Vremenska duljina uzgoja ovisi o početnoj masi ribe, zahtjevima i cijeni na tržištu, a naročito o veličini ulovne kvote jer kako se smanjuje kvota, vrijednost ribe raste.

4) Izlov uzgojne tune i priprema za tržište

Nakon određenog perioda uzgoja slijedi zadnji dio uzgojnog ciklusa. Najveći dio uzgojene tune je namijenjen japanskom tržištu gdje se tuna konzumira sirova, stoga su zahtjevi kakvoće mesa veoma visoki. Usmrćivanje ribe treba obaviti brzo, humano i učinkovito, bez izazivanja stresa ili umaranja tune kako bi se minimalizirala koncentracija mliječne kiseline u tkivu koja mesu daje „izgoreni“ okus i znatno snižava cijenu na tržištu. Mliječna kiselina nastaje kada se tuna „bori“ prije smrti zbog prenapučenosti u lovnim mrežama jer tada nema mjesta za plivanje i ne može dobiti odgovarajuću količinu kisika. Postoji nekoliko načina izlova, a izbor ovisi o veličini riba. U hrvatskim uzgajalištima se primjenjuje „Tanguchijeva ili Iki-jime metoda“ koja započinje sakupljanjem jata riba uz bok broda, te se pomoć ronioca svaka jedinka dovodi do platforme gdje je radnici s broda preuzimaju i uz pomoć kuke izvlače na brod. Na brodu slijedi postupak uništavanja mozga i leđne moždine tune ubodom pomoću metalnog šiljka u čeonu kost, te uvlačenjem čelične sonde dužine 1 m čime se uništava središnji živčani sustav, što uzrokuje momentalnu smrt. Ova metoda se smatra najhumanijom, a njenom primjenom kvaliteta mesa ostaje na najvišoj razini. Nakon usmrćivanja presijecaju se lateralne arterije s ciljem odstranjivanja krvi jer ona smanjuje kvalitetu mesa i rok uporabe tune kao proizvoda. Potom se vadi utroba, uklanjanju škrge te se riba smrzava i prebacuje u japanske brodove hladnjače ili odvozi u riboprerađivačke tvrtke na daljnju obradu (Blanc i sur., 2005; Mylonas i sur., 2010; Ottolenghi, 2008).

b) Uzgoj temeljen na umjetnom (induciranom) mrijestu ne koristi roditeljske populacije tuna ulovljene u divljini nego se, imitirajući uvjete u prirodi, tune navodi na mrijest u kavezima i tako zatvora krug uzgoja. To je relativno nova metoda koja pokazuje veliki potencijal za

smanjenje ribolovnog pritisaka na prirodne populacije i zadovoljavanje rastućeg tržišta sushi i sashimi delikatesa, ali zahtjeva značajna novčana sredstva i još mnogo istraživačkog rada prvenstveno zbog složenih reprodukcijskih osobina tune (Masuma i sur., 2011; Ortega i sur., 2013; Purcell i sur., 2013).

Prve pokušaje umjetnog mrijesta pacifičke plavoperajne tune započeli su znanstvenici na japanskom sveučilištu Kindai University 1970-ih godina, ali su u početku sva oplođena jaja i embriji ugibali unutar par tjedana. Nakon niza godina pokušaja, znanstvenici su 2002. godine uspjeli potpuno zatvoriti životni ciklus i uzgojiti ličinke od odrasle umjetno uzgojene pacifičke plavoperajne tune (Kato i sur., 2008; Masuma i sur., 2008, 2011; Sawada i sur., 2005). Posljednjih godina je proizvodnja u ovom sektoru akvakulture u stalnom porastu budući da japanski znanstvenici uspijevaju prevladati većinu izazova na ovom području s kojima se suočavaju ostala uzgajališta diljem svijeta. Međutim, još uvijek je stopa uginuća ličinki vrlo visoka, a glavni razlozi su stres, pothranjenost uslijed loše palatabilnosti hrane, kanibalizam, ozlijede kralježnice i kože uslijed sudaranja sa stijenkama bazena te nemogućnost proizvodnje dovoljnog broja kopepoda za prehranu ličinačkih stadija tune (Benetti i sur., 2016; De Metrio i sur., 2010; Higuchi i sur., 2013; Honryo i sur., 2013; Kadota i sur., 2016; Masuma i sur., 2008, 2011; Miyashita i sur., 2000; Patridge i sur., 2013; Sabate i sur., 2010; Sawada i sur., 2005).

Istraživanja umjetnog mrijesta kod atlantske plavoperajne tune su započela mnogo kasnije u Španjolskoj, Malti, Grčkoj, Hrvatskoj, Egiptu i Turskoj projektima Europske unije: DOTT, REPRODOTT, SELFDOTT i TRANSDOTT (Miyake i sur., 2003; Mylonas i sur., 2010; Zohar i sur., 2016). Prvi projekt DOTT (engl. Domestication of *Thunnus Thynnus*; 2001-2002) je imao za cilj razviti strategiju za provođenje zatvorenog ciklusa uzgoja atlantske plavoperajne tune u Europi. Projektom REPRODOTT (engl. Reproduction of the Bluefin Tuna in Captivity - Feasibility Study for the Domestication of *Thunnus thynnus*; 2003-2005) se istraživala mogućnost reprodukcije tuna u zatočeništvu, projekt SELFDOTT (engl. From Capture-based to Self-sustained Aquaculture and Domestication of Bluefin Tuna, *Thunnus thynnus*; 2008-2011) je bio usmjeren na razvoj protokola za uzgoj hrane za ličinački stadij, a TRANSDOTT (engl. Translation of Domestication of *Thunnus thynnus* into an Innovative Commercial Application; 2012-2014) je obuhvatio rezultate iz prijašnjih projekata kako bi razvio smjernice za komercijalno isplativ uzgoj tune na ovaj način (Böttcher, 2014; De la Gandara i sur., 2010; Ortega i sur., 2013). Međutim, unatoč značajnim uspjesima znanstvenika koji su uspjeli dobiti ličinke tune u zatvorenom ciklusu, do danas još ovakav

način uzgoja nije u potpunosti komercijalno isplativ (Benetti i sur., 2016; Masuma i sur., 2011; Ortega i sur., 2013).

2.4.2. Utjecaj kaveznog uzgoja na imunološki sustav atlantske plavoperajne tune *Thunnus thynnus*

Površina ribe je prekrivena sluzi koja ima baktericidno djelovanje, olakšava ribi kretanje kroz vodu smanjujući trenje te pomaže u kontroli količine vode u tijelu. Prilikom manipulacije ribom tijekom ulova i transporta često dolazi do mjestimičnog gubitka sluzi i ljuski, te mehaničkog oštećenja tkiva što olakšava prodiranje patogena u organizam. To kod juvenilnih riba slabijeg imunološkog sustava predstavlja veliku mogućnost za razvoj bolesti, budući su mnogo osjetljivije od odraslih jedinki koje su tijekom godina razvile otpornost na mnoge infekcije (Munday i sur., 2003; Schreck i sur., 2016).

Tijekom uzgojnog ciklusa jedinke tune su neprestano izložene raznim biotičkim i abiotičkim čimbenicima koji uzrokuju stresne uvjete i utječu na održavanje homeostaze u organizmu. Uzgojne aktivnosti poput praćenja jata brodovima, ulov, transport do uzgajališta, te manipulacija prilikom preseljenja u instalacijske kaveze, izvori su stresa koji negativno utječe na imunološki sustav, čineći ga slabijim što pridonosi nastanku bolesti, gubicima tijekom uzgojnog ciklusa u vidu uginuća ili izostanka odgovarajućeg prirasta preživjelih jedinki (Balli i sur., 2016; Benetti i sur., 2016; Buentello i sur., 2016; Caruso i sur., 2005; Evans, 2015; Higuchi i sur., 2013; Honryo i sur., 2013, 2018; Iversen i sur., 1998; Kirchoff, 2012; Magnadóttir, 2006; Masuma i sur., 2011; Mateus Bonga, 2017; Meyer, 1991; Mylonas i sur., 2010; Ottolenghi, 2008; Rauta i sur., 2012; Wendelaar i sur., 1997). Na rast i zdravlje jedinki tijekom kaveznog uzgoja utječu i različiti čimbenici u okolišu poput temperature, kvalitete i saliniteta mora, kakvoće, količine i sastava hrane, osmotskih prilika, koncentracije ugljičnog dioksida u vodi, prisutnost raznih zagađivača i teških metala, ali i organizacija uzgoja od strane uzgajivača (Kvamme i sur., 2013; Masuma i sur., 2011; Tsuda i sur., 2012). Temperatura mora je važan čimbenik jer utječe na brzinu metaboličkih procesa, sintezu antitijela nakon ulaska patogena u organizam, određuje područje kretanja tuna, pa njena promjena, pogotovo nagli pad, za tune u kavezima može biti izraziti stresor koji povećava rizik od nastanka bolesti (Klinger i sur., 2016; Polinski i sur., 2013, 2014). Također, povećanje količine nasada ribe u kavezima uzrokuje povećanje koncentracije organskih tvari, koncentracije izlučenih tvari (urea, izmet, neprobavljena hrana), te pad kisika što predstavlja idealnu podlogu za razvoj brojnih mikroorganizama i patogena, što povećava rizik od

nastanka bolesti i negativno utječe na prirast ribe (Barton, 2002; Barton i Iwama 1991; Davis, 2010; Kitagawa i sur., 2000; Mladineo i sur., 2008; Mladineo i Tudor, 2004; Moyle i Cech, 2004; Teo i sur., 2007; Terova i sur., 2005). Kod mnogih vrsta plavoperajnih tuna zabilježen je pad urođene imunosti i uginuća uzrokovana dugotrajnom izloženošću virusnim i bakterijskim infekcijama te raznim nametničkim organizmima koji su često prisutni u područjima uzgajališta (Deveney i sur., 2005; Mladineo i Tudor 2004; Mladineo 2006; Mladineo i sur., 2006, 2008; Munday i sur., 2003; Nowak i sur., 2006; Polinski i sur., 2014; Sakthivel i sur., 2016). Jedan od čimbenika koji uzrokuje stres je i sama duljina kaveznog uzgoja. Evans (2015) je u svom istraživanju utjecaja stresa i imunološkog odgovora kod južne plavoperajne tune u kaveznom uzgoju zabilježio više razine pokazatelja stresa kod jedinki koje su duži vremenski period držane u kavezima (18 mjeseci umjesto uobičajenih 6-8) što ukazuje na smanjenje imunokompetencije organizma s duljinom uzgoja (Ellis i sur., 2009; Evans, 2015; Mladineo i sur., 2008). Odgovor organizma na stresne uvjete najčešće je reguliran složenom interakcijom više različitih gena, te je potrebno dobro poznavati ulogu svakog zasebno te njihovu međusobnu povezanost, budući da varijacije u broju alela uzrokovane mutacijama mogu imati ulogu u regulaciji transkripcije, što u konačnici može utjecati na ekspresiju gena, dovesti do promjene u fenotipu ili uzrokovati nastanak oboljenja (Conner i Hartl, 2004; Li i sur., 2004).

Tijekom posljednjih godina uslijed brojnih istraživanja donesene su smjernice za učinkovitiju metodologiju ulova, transporta i uzgoja (Beaz i Núñez, 2003; De Bartolome i Mendez, 2005) koje su rezultirale smanjenjem postotka smrtnosti (Evans, 2015; Katavić i sur., 2003; Nakada, 2008), iako ovaj problem i dalje uzgajivačima predstavlja veliki izazov.

2.5. Genska raznolikost

Genska raznolikost dio je ukupne biološke raznolikosti, a opisuje varijaciju na razini DNA unutar neke populacije ili vrste (Frankham i sur., 2002). Temelj je evolucijskog razvoja jer viša razina raznolikosti omogućava bolju prilagodbu populacija i vrsta u promjenjivom okolišu, a njen gubitak utječe na smanjenje njihove dugoročne prilagodljivosti. Postoje dvije glavne vrste genske raznolikosti: adaptivna i neutralna. Neutralna se analizira različitim molekularno-genetičkim laboratorijskim metodama što znači da otkrivene varijante gena nemaju izravan učinak na fitness. Selektivno je neutralna i ne govori ništa o adaptivnom ili evolucijskom potencijalu vrste ili populacija. Međutim, neutralni biljezi imaju potencijal za istraživanje procesa poput protoka gena, genetičkog pomaka, mutacija i migracija alela. Alel

je alternativni oblik gena koji se nalazi na određenom mjestu, tj. lokusu homolognog para kromosoma. Organizam za svaku osobinu nasljeđuje dva alela, po jedan od svakog roditelja. Jedinke mogu biti homozigotne (imaju identični par alela) ili heterozigotne (imaju dva različita alela). Kada na lokusu postoje dva ili više alela tada je on polimorfan, uz uvjet da se drugi alel javlja u populaciji s frekvencijom 5% ili više. Adaptivna genska raznolikost je pod utjecajem prirodne selekcije te se analizira u kvantitativnim genetičkim eksperimentima pod kontroliranim i ujednačenim uvjetima okoline (Holderegger i sur., 2006; Kirk i Freeland, 2011).

Genska raznolikost nastaje kao posljedica mutacija i rekombinacija. Mutacije utječu na stvaranje novih alela i u kraćem vremenskom razdoblju imaju slab utjecaj na promjenu genetičke strukture neke populacije, međutim, dugoročno u kombinaciji s drugim evolucijsko-adaptacijskim procesima predstavljaju nezaobilazan izvor genetičke raznolikosti u populacijama. Migracije alela, odnosno izmjene alela između različitih populacija, omogućavaju unos novih alela u populaciju, tj. povećavaju njenu genetičku raznolikost, ali kroz dulje vremensko razdoblje mogu utjecati i na smanjenje genetičke diferenciranosti između populacija. Promjena frekvencije (učestalosti) nekog alela u populaciji ovisi o intenzitetu i količini migracije, te o razlikama u frekvencijama alela između dvije populacije. Genetički pomak (engl. genetic drift) je pojava slučajnih promjena frekvencija alela, a time i promjena u genotipskim frekvencijama zbog slučajnog odabira alela iz roditeljske generacije koji se prenose na potomstvo. U izrazito malim populacijama, kakve su obično populacije ugroženih vrsta, genetički pomak može uzrokovati povećanje homozigotnosti i učestalosti letalnih alela tijekom nekoliko generacija (Halligan i Keightley, 2003; Lobo, 2008). Na smanjenje genske raznolikosti značajan utjecaj ima i križanje u srodstvu unutar malih populacija (Frankham i sur., 2002; Markert i sur., 2010), stoga većinu ugroženih populacija karakterizira mala ili opadajuća veličina populacija s nižom genetičkom raznolikošću.

Genska raznolikost neke vrste može pružiti informacije o podrijetlu populacija, razini križanja u srodstvu, prilagodbama lokalnim uvjetima okoline ili širenju staništa, a poznavanje razine, obrasca i uzroka genetičke raznolikosti neke vrste nužna je informacija za njen uzgoj, izradu programa očuvanja ili taksonomska evolucijska i ekološka istraživanja (Geller i sur., 2010).

Genska raznolikosti se istražuje pomoću genetičkih biljega koji isključuju sve subjektivne procjene te omogućuju brže određivanje stupnjeva ugroženosti populacija, praćenje stupnja križanja u srodstvu, stvaranje genetskih mapa, donošenje zaključaka o taksonomskim i filogenetskim odnosima između vrsta, čime se mogućnost pravovremenog djelovanja u

njihovoj zaštiti uvelike povećava (Amaral i sur., 2017; Díaz-Arce i sur., 2016; Frankham i sur., 2002; Hedrick, 2004; Schulman, 2007).

Genetički biljezi označavaju nasljedna svojstva koja pokazuju određeni stupanj varijabilnosti među istraživanim jedinkama, a koja nastaju zbog promjena u nukleotidnom slijedu uslijed djelovanja mutacija. Iako nužno ne moraju biti geni, takvim se smatraju s obzirom da se nasljeđuju po istim načelima, stoga se njihovi različiti oblici nazivaju alelima, a njihovo specifično mjesto na kromosomu lokusom. Neki od najčešće korištenih biljega u molekularnim istraživanjima su: polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata (engl. Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP), nasumično umnožena polimorfna DNA (engl. Random Amplified Polymorphic DNA; RAPD), polimorfizam duljine umnoženih fragmenata (engl. Amplified Fragment Length Polymorphism; AFLP), mikrosateliti ili jednostavni ponavljajući sljedovi (engl. Simple Sequence Repeats; SSR), polimorfizam pojedinačnih nukleotida (engl. Single Nucleotide Polymorphism; SNP), te mitohondrijska DNA (mtDNA). Oni mogu biti dominantni ili kodominantni. Kodominantni biljezi (npr. RFLP, mikrosateliti) su informativniji od dominantnih (npr. RAPD, AFLP) jer omogućavaju razlikovanje heterozigota od homozigota za svaki analizirani lokus i alel što pruža potpuniju informaciju o genetičkoj raznolikosti i strukturi neke populacije.

2.5.1. Mikrosatelitni biljezi

Mikrosatelitni biljezi su molekularni biljezi koji se nazivaju i jednostavni ponavljajući sljedovi (engl. Simple Sequence Repeats; SSR) ili kratka tandemska ponavljanja (engl. Short Tandem Repeats; STR). Označavaju kratke ponavljajuće sljedove nukleotida u eukariotskim i prokariotskim genomima (Ellegren, 2004; Li i sur., 2002; López-Flores i Garrido-Ramos, 2012; Selkoe i Toonen, 2006; Tóth i sur., 2000). Otkriveni su 1980-ih godina i od tad imaju široku primjenu u raznim područjima populacijske genetike, biotehnologije, evolucijske biologije i medicine (Jarne i Lagoda, 1996).

Ponavljajući slijed mikrosatelita čini motiv od jedan do šest parova baza koji se najčešće ponavlja između pet i 40 puta (Hearne i sur., 1992; López-Flores i Garrido-Ramos, 2012; Nagpure i sur., 2013; Page i Holmes, 1998; Selkoe i Toonen, 2006). Međusobno se razlikuju u dužini i složenosti ponavljajućeg slijeda. Struktura mikrosatelitnih ponavljanja može biti „savršena“ kada ponavljanja sadrže jedinice identične dužine i slijeda (npr. CACACACACACA), „prekinuta“ kada se unutar ponavljajućeg motiva pojavi motiv koji ne odgovara motivu slijeda (npr. CACAGCCACA) i „složena“ koja se sastoje od dva ili više

jednostavnih ponavljanja s ponavljajućim jedinicama promjenjive dužine (npr. CACAGCGCGCTATA).

Mikrosateliti se nalaze razmješteni po cijelom genomu, u nekodirajućim, UTR (engl. Untranslated Region) i kodirajućim regijama genoma (Chistiakov i sur., 2006; Li i sur., 2002, López-Flores i Garrido-Ramos, 2012; Tautz i Renz, 1984; Tóth i sur., 2000). Njihova zastupljenost u genomu se povećava sa složenošću organizma, npr. kod jednostavnih organizama poput kvasaca *Cerevisiae elegans* i *Saccharomyces cerevisiae* čine 0,21-0,30% genoma, kod biljaka poput talijinog uročnjaka *Arabidopsis thaliana* i kukuruza *Zea mays* 0,37-0,85%, dok kod viših organizama poput riba napuhača *Fugu rubripes* i *Tetraodon nigroviridis* ili sisavaca čak 2-3% genoma (Ellegren, 2004; Crollius i sur., 2000; Morgante i sur., 2002; Wang i sur., 1994). U nekodirajućim i UTR regijama se nalaze u mnogo većem postotku nego u kodirajućim regijama, te su najbrojnija dinukleotidna ponavljanja koja se većinom koriste u istraživanjima jer se smatraju najpolimorfnijim, dok se tri- i heksa-nukleotidna ponavljanja najčešće pojavljuju u kodirajućim regijama što se može objasniti supresijom ostalih ponavljanja vjerojatno uzrokovanih frame-shift mutacijama ili pomakom okvira čitanja (Ellegren, 2004; Metzgar i sur., 2000; Li i sur., 2004; Tóth i sur., 2000; Wren i sur., 2000). Insercijom najčešće dolazi do umetanja jednog ili dva nukleotida, a delecijom do njihovog gubitka, dok insercijom ili delecijom tri nukleotida ne dolazi do pomaka okvira čitanja.

Mikrosatelitna ponavljanja karakterizira polimorfnost zbog visoke stope mutacija (od 10^{-2} do 10^{-6} mutacija po lokusu u generaciji) kojima su podložni prilikom udvostručenja DNA molekule. Stope mutacija mogu varirati između lokusa i alela istog lokusa ovisno o strukturi mikrosatelita, tj. o duljini motiva, broju ponavljanja, prekidima unutar motiva, sastavu nukleotidnog motiva, te sastavu bočnih sekvenci (Akemi Hoshino i sur., 2012; Ellegren, 2004; Hoffman i Amos, 2004; López-Flores i Garrido-Ramos, 2012; Schug i sur., 1997).

Postoje dva glavna mehanizma mutacija:

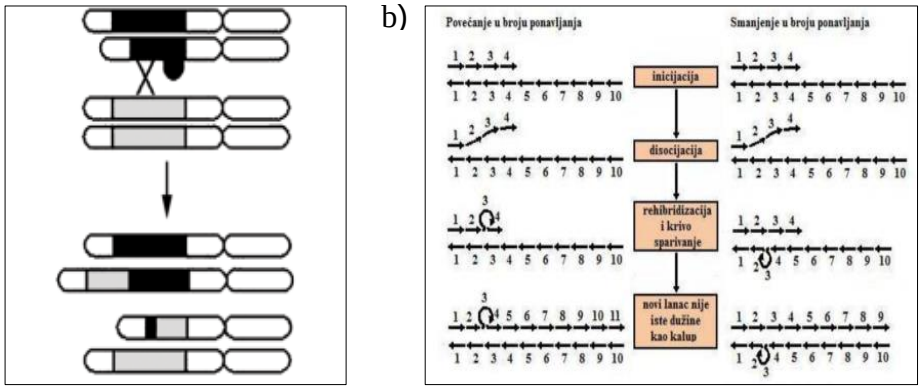
(1) promjena duljine u mikrosatelitnom motivu koji se zasniva na rekombinaciji DNA molekule kroz nejednaki crossing-over (Slika 3a);

(2) pogreške prilikom replikacije DNA molekule (Bruford i Wayne, 1993; Ellegren, 2004; Gemayel i sur., 2010; Selkoe i Toonen, 2006).

Nejednaki crossing-over uzrokuje smanjenje ili potpuni gubitak mikrosatelitnih regija na jednom kromosomu i povećanje njihovog broja na drugom (Slika 3a), a replikacijsko klizanje (engl. replication slippage) pogrešno sparivanje uslijed ispadanja ili umetanja dijela slijeda u novonastali lanac DNA, što uzrokuje da novonastali komplementarni lanac DNA nosi

„omču“ koja u idućim ciklusima replikacije može produljiti novi lanac (engl. forward slippage) ili ga smanjiti (engl. backward slippage) (Slika 3b). Greške koje nastaju prilikom replikacije su najvjerojatniji mehanizam stvaranja mutacija, ali mehanizam njihovih mutacija nije ključan za sve analize jer ne predstavlja važan čimbenik u statističkoj obradi (Neigel, 1997).

a) b)



Slika 3. a) Nejednaki crossing over između homolognih kromosoma (crni i sivi dijelovi označavaju mikrosatelitne regije); b) Replikacijsko klizanje (modificirano prema Ellegren, 2004).

Međutim, ako se korištenjem mikrosatelita žele procijeniti parametri genetičke udaljenosti i diferencijacije populacija kako bi se dobila što jasnija slika genetičke strukture istraživanih populacija, za neke statističke metode je potrebno upotrijebiti teoretske modele mikrosatelita (Balloux i Lugon-Moulin, 2002). Osnovni teoretski modeli mutacijskog mehanizma mikrosatelita su: model beskonačnog broja alela (engl. Infinite Allele Model; IAM) kod kojeg svakom mutacijom nastaje novi alel u populaciji bez obzira od kojeg broja uzastopnih ponavljanja se sastoji mikrosatelit (Kimura i Crow, 1964), model postupnih mutacija (engl. Stepwise Mutation Model; SMM) kod kojeg se dužina lokusa mijenja stalnom brzinom replikacije, dodavanjem ili oduzimanjem jednog ponavljanja (pod pretpostavkom promjene jednog ponavljanja po mutaciji) (Ellegren, 2004; Ohta i Kimura, 1973), te dvofazni model (engl. Two-Phase Model; TPM) koji pretpostavlja da većina mutacija slijedi SMM, ali dozvoljava i određeni postotak promjena po modelu IAM (Di Rienzo i sur., 1994).

Cjelokupni proces mutacija mikrosatelita je vrlo složen jer ne postoji njihova jednolika stopa, one se razlikuju između i unutar vrsta, ali i između lokusa i alela (Ellegren, 2004; López-Flores i Garrido-Ramos, 2012). Varijacija mikrosatelita je uglavnom neutralna i nema

fenotipsku ekspresiju, međutim svaka promjena koja nastaje uslijed djelovanja mutacija unutar ili u blizini kodirajuće regije genoma može utjecati na promjenu u funkciji proteina što je vrlo vjerojatno povezano s evolucijskim razvojem vrsta i nastankom nekih bolesti (Li i sur., 2004). Slijedom toga, mikrosateliti se mogu koristiti za označavanje odgovarajućih funkcionalnih gena ili mapiranje kvantitativnih obilježja lokusa (engl. Quantitative Trait Loci; QTL) što ih čini korisnim i izvan glavne primjene u populacijskoj genetici (Guo i sur., 2007; Hibrand-Saint i sur., 2007; Hung i sur., 2016).

Mikrosateliti se mogu primijeniti u širokom spektru bioloških studija jer su zbog svojih brojnih osobina vrlo učinkoviti biljezi za populacijsku genetiku, analizu podrijetla, mapiranje gena, sudsku identifikaciju, te u medicinskim, konzervacijskim i arheološkim istraživanjima. Kao većinom neutralni biljezi, smatraju se idealnim za istraživanje podrijetla te procesa unutar i između populacija, kao što su izolacija i migracija među populacijama, obzirom da selekcija može relativno brzo utjecati na promjenu učestalosti alela za pojedine lokuse, a time prikriti povijesne obrasce (Amos i sur., 2015; Antoniou i sur., 2017; Beacham i sur., 1996; Bruford i Wayne, 1993; Chistiakov i sur., 2006; Ellegren, 2004; Hung i sur., 2016; Jarne i Lagoda, 1996; Liu i sur., 2004; Mittal i Dubey, 2009).

Obzirom na njihovu široku distribuciju unutar genoma, visoku razinu polimorfizma i kodominantnosti, tj. sposobnosti razlikovanja homozigota od heterozigota (Slika 4), mikrosateliti imaju niz prednosti u odnosu na ostale biljege koji se koriste u istraživanjima populacijske genetike poput RFLP (engl. Restriction Fragment Length Polymorphism), AFLP (engl. Amplified Fragment Length Polymorphism) ili RAPD (engl. Random Amplification of Polymorphic DNA), jer daju mogućnost preciznog izračunavanja frekvencija alela, te potrebe genotipizacije mnogo manjeg broja jedinki za točnu procjenu populacijskih parametara (Lynch i Milligan, 1994; Mariette i sur., 2002).

Nadalje, mogu se razviti za bilo koji organizam, amplifikacija se provodi u uvjetima visoke specifičnosti, za samu analizu je potrebna vrlo mala količina DNA, a može se koristiti čak i djelomično degradirana DNA. Susjedne ili bočne regije (engl. flanking region) na mikrosatelitnom lokusu su manje podložne mutacijama što olakšava sintezu PCR početnica (Beckmann i Soller, 1990).

HOMOZIGOT: mikrosatelitni lokus ima isti broj ponavljanja na oba kromosoma

...TAGCCGGGCTA**GAGAGAGAGAGAGAGAGAGA**AGTCGTTAGCG...
...TAGCCGGGCTA**GAGAGAGAGAGAGAGAGAGA**AGTCGTTAGCG...

...TAGCCGGGCTA**GAGAGAGAGAGAGAGAGAGA**AGTCGTTAGCG...
...TAGCCGGGCTA**GAGAGAGAGAGAGAGAGAGA**AGTCGTTAGCG...
5' bočna regija **ponavljajući motiv** 3' bočna regija

HETEROZIGOT: mikrosatelitni lokus ima različiti broj ponavljanja na kromosomima, npr. na jednom 10 ponavljanja GA motiva, a na drugom 8 ponavljanja GA motiva

...TAGCCGGGCTA**GAGAGAGAGAGAGAGAGAGA**AGTCGTTAGCG...
...TAGCCGGGCTA**GAGAGAGAGAGAGAGAGAGA**AGTCGTTAGCG...

...TAGCCGGGCTA**GAGAGAGAGAGAGAGA**AGTCGTTAGCG...
...TAGCCGGGCTA**GAGAGAGAGAGAGAGA**AGTCGTTAGCG...
5' bočna regija **ponavljajući motiv** 3' bočna regija

Slika 4. Primjer razlike između homozigotnih i heterozigotnih lokusa. Kod organizma koji su homozigotni za neki mikrosatelitni lokus, oba kromosoma imaju isti broj ponavljanja, dok heterozigoti imaju različit broj ponavljanja na kromosomima.

Međutim, unatoč brojnim prednostima, ovi biljezi imaju i nekoliko nedostataka:

- imaju visoku razinu specifičnosti za jednu vrstu ili nekoliko usko srodnih vrsta, te zbog činjenice da se većinom nalaze u nekodirajućim područjima genoma, za istraživanje vrsta koje nemaju veliku ekonomsku važnost najčešće se moraju razviti *de novo* (Zane i sur., 2002). Prvo je potrebno sintetizirati PCR početnice za svaki lokus za što je potrebno klonirati i sekvencirati klonove koji sadrže mikrosatelitni motiv, a zatim izraditi i testirati sve početnice što zahtijeva laboratorijsku stručnost, vrijeme i značajne ekonomske izdatke (Abdelkrim i sur., 2009; Nagpure i sur., 2013; Zane i sur., 2002);
- Taq polimeraza prilikom produžavanja lanca DNA može ponekad dodati nukleotid adenozin na 3’ kraj matičnih i amplificiranih lanaca, što može stvoriti poteškoće pri određivanju stvarne dužine alela. Greška se može dogoditi zbog pojave višestrukih umnoženih lokusa na temelju istog predloška DNA, te zbog pogrešaka pri umnožavanja, ovisno o vrsti elektroforeze, nastaju tzv. “stutter” bendovi koji su kraći od ostalih alela i smatraju se glavnim uzrokom pogrešaka u genotipizaciji zbog problema u pravilnom očitavanju genotipova (Amos i sur., 2006; Butler, 2006). Međutim, napretkom tehnologije,

povećanjem preciznosti polimeraza, te mogućnosti ponavljanja analiza značajno se smanjuje utjecaj ovakvih pogrešaka na rezultate;

- hipervarijabilnost mikrosatelita ponekad nije prednost jer ulomci mikrosatelita istih dužina ne moraju poticati iz iste nasljedne linije, odnosno ne nastaju istim evolucijskim putem. Ta pojava naziva se homoplazija, te može utjecati na točnost procjene genetičkih parametara. Povećanjem stupnja mutacije i vremenom odvajanja od zajedničkog pretka povećava se i stupanj homoplazije (Estoup i sur., 2002). Mogućnost ove pojave dodatno povećavaju i potencijalni mehanizmi selekcije koji ograničavaju raspon mogućih alela. Homoplazija tako dovodi do podcjenjivanja unutarpopulacijskih podjela (subpopulacijske podjele) i genetičke diferencijacije između populacija i vrsta;

- problemi mogu nastati i prilikom analize podataka i izračunavanja frekvencije alela, tj. do pojave nul alela prilikom genotipizacije. Nul aleli predstavljaju smetnje ili potpuni nedostatak umnažanja nekog alela, a uzrokuju ih mutacije u bočnim regijama koje mogu onemogućiti vezivanje početnica što može dovesti do smanjena ili gubitka PCR produkta (Callen i sur., 1993). Prisutnost nul alela utječe na procjenu genetičkih parametara i rezultate molekularnih analiza (Chapuis i Estoup, 2007; Dakin i Avise, 2004; Jones i Ardren, 2003; Pemberton i sur., 1995). Manifestira se kao smanjenje frekvencije heterozigota u odnosu na očekivanu prema Hardy-Weinbergovim uvjetima ravnoteže (engl. Hardy-Weinberg Equilibrium; HWE). Pri razdvajanju elektroforezom, jedinke koje su heterozigoti za nul alel izgledaju kao homozigoti za vidljivi alel, dok se nulti homozigoti pojavljuju kao neuspješne reakcije. Ukoliko se potvrdi pojava takvih alela na određenim lokusima, njih je potrebno isključiti iz više-lokusnih analiza (Dewoody i sur., 2006).

Određivanje dužina alela mikrosatelitnog lokusa se provodi nakon izolacije DNA iz tkiva prema nekom od mnogobrojnih protokola, određivanja njene količine i kakvoće, te umnažanja određenog slijeda PCR reakcijom koristeći specifične početnice za svaki od istraživanih lokusa. Početnice su kratki sintetizirani oligonukleotidi koji prepoznaju određen slijed nukleotida u genomskoj DNA koja služi kao kalup na koji djeluje DNA polimeraza i umnaža željeni dio lanca. Početnice za umnožavanje određenog lokusa se mogu pronaći u literaturi ili samostalno dizajnirati pomoću računalnih programa (npr. Primer3; FullSSR; WebSAT; FastPCR; QDD) tako da hibridiziraju na bočna područja uz sam mikrosatelitni lokus. Uspješnost PCR reakcije se najčešće provjerava metodom elektroforeze na horizontalnom agaroznom gelu, a genotipizacija se provodi metodom kapilarne elektroforeze u kapilarama s polimerima visokog stupnja razlučivanja fragmenta. Kapilarna elektroforeza primjenjuje se u biotehnologiji dugi niz godina za analizu DNA, RNA, proteina i

ugljikohidrata. Karakterizira je kratko vrijeme analize, visoka učinkovitost, različiti mehanizmi razdvajanja, a za analizu su potrebne vrlo male količine uzoraka.

Multipleks ili združeni PCR je izmijenjena metoda PCR reakcije u kojoj se umjesto jednog para početnica u istoj reakcijskoj smjesi koriste dva ili više parova specifičnih početnica obilježenih različitim fluorescentnim bojama s ciljem istovremenog umnažanja dva ili više odsječaka DNA. Produkti združene PCR reakcije analizirani metodom kapilarne elektroforeze prikazani su kao niz vršaka te imaju veću rezoluciju od produkata očitanih na običnom agaroznom gelu gdje su produkti prikazani kao duža, kontinuirana crtica. Umnažanjem više odsječaka te usporedbom odnosa njihovih produkata može se analizirati i odrediti količina svakog produkta što omogućuje određivanje genomskih promjena, te kvantifikaciju stupnja gubitka alela ili eventualnog smanjenja umnožavanja. Iako je takvu reakciju teže optimizirati, njome se štedi vrijeme i kemikalije jer se na taj način nekoliko PCR reakcija i analiza produkata u agaroznom gelu svodi na samo jednu analizu. Prilikom uspostavljanja multipleks PCR-a slijedi se protokol kao i za standardnu PCR reakciju, a jedina razlika je da za nju treba dizajnirati početnice sličnih temperatura sparivanja, a one sličnih dužina označiti različitim fluorescentnim bojama kako bi se njihovi produkti lakše detektirali nakon umnažanja (Pemov i sur., 2005).

Jedan od izvora sljedova za razvoj mikrosatelita su EST, kratki jednostrani slijedovi koji proizlaze iz komplementarnih DNA (cDNA) klonova (Adams i sur., 1991; Chini i sur., 2008; Kirk i Freeland, 2011). Znanstvenici ih sve češće koriste jer predstavljaju kodirajuće regije genoma, korisni su za identifikaciju gena i mapiranje njihovih pozicija u genomu, omogućuju jednostavan i relativno jeftin način pronalaska novih gena ili gena uključenih u neko svojstvo (Adams i sur., 1991; Ellis i Burke, 2007). Mikrosateliti identificirani u EST nazivaju se EST-SSR i kod njih je zabilježena niža stopa varijacije nego kod neutralnih mikrosatelita iz genomske DNA, ali zbog njihove mogućnosti korištenja između srodnih rodova i vrsta (biljezi razvijeni kod jedne vrste/roda se mogu primijeniti i kod drugih), te činjenice da njihova varijacija potencijalno može ukazati na određena svojstva fenotipa jer se nalaze unutar gena, vrijedan su resurs za populacijska i evolucijska istraživanja (Ellis i Burke, 2007; Coulibaly i sur., 2005; Duran i sur., 2009; Ji i sur., 2012). Polimorfizmi u EST-SSR mogu biti jako korisni u istraživanjima bioraznolikosti u uzgojnom ponašanju, te otkrivanje utjecaja selekcije ili istraživanja prilagodljivog ponašanja u širokom rasponu vrsta (Li i sur., 2002; Luikart i sur., 2003; Slate i sur., 2007; Vasemägi i sur., 2005).

U odnosu na druge genomske biljege na osnovi DNA, EST-SSR sadrže niz prednosti:
- jeftiniji razvoj zbog mogućnosti provođenja istraživanja i razvoja biljega na glavnoj ciljanoj vrsti, te njihovog kasnijeg korištenja kod različitih drugih vrsta i rodova, budući da se temelje na genskim sekvencama koje su visoko očuvane. To smanjuje troškove i vrijeme rada povezanih s početnim koracima razvoja mikrosatelita, tj. izgradnji knjižnice i sekvenciranja velikog broja podataka (Coulibaly i sur., 2005; Ellis i Burke, 2007; Gupta i sur., 2003; Pashely i sur., 2006; Pérez i sur., 2005; Serapion i sur., 2004; Varshney i sur., 2005; Yue i sur., 2004);
- dobivanje podataka koje je lakše analizirati zbog manjeg broja nul alela i "stutter" bendova u usporedbi s ostalim genetičkim biljezima (Eujayl i sur., 2004; Pashley i sur., 2006). To se može pripisati kraćim ponavljajućim nizovima pri čemu je smanjeno klizanje DNA polimeraze tijekom PCR reakcije, te početnicama koje su izvedene iz relativno konzerviranih sekvenci (Ellis i Burke, 2007; Liepelt i sur., 2001).
Međutim, unatoč brojnim prednostima, imaju i nekoliko nedostataka:
- za vrste čije se sekvence ne nalaze u postojećim bazama podataka moraju se razviti *de novo*. Za taj postupak je potrebno sakupiti dovoljne količine svježeg tkiva za izolaciju RNA i razvoj cDNA knjižnice što može biti problematično kad se istražuju rijetke vrste malih populacija koje sporo rastu ili im se stanište nalazi na udaljenim lokacijama (Decroocq i sur., 2003);
- karakterizira ih relativno nizak stupanj polimorfizma budući da se nalaze unutar gena, a time su i više konzervirani po vrstama (Dufresnes i sur., 2014; Hung i sur., 2016; Riccioni i sur., 2017; Wang i sur., 2011). Međutim, razine genetičke raznolikosti otkrivene tim biljezima su znatno veće od onih koje su otkrivene korištenjem ostalih tipova biljega, poput alozima, te otkrivaju dovoljnu razinu varijacija za većinu populacijskih genetičkih istraživanja zbog niže alelne raznolikosti, u usporedbi s genomskim mikrosatelitima. Nadalje najčešće nisu pod utjecajem selekcije budući da na jako mali postotak gena utječe pozitivna selekcija čak i kada su povezani s funkcionalnim područjima, iako će neki mali dio svih EST-SSR neizbježno biti podvrgnut selekciji, što može utjecati na procjenu populacijskih genetičkih parametara (Ellis i Burke, 2007).

2.5.2. Istraživanja genetike riba mikrosatelitnim biljezima

Održivo ribarenje komercijalno važnih vrsta riba zahtijeva učinkovitu strategiju upravljanja temeljenu na znanstvenim istraživanjima (Carvalho i Hauser, 1994; Dunlop i sur., 2009; Frankham i sur., 2002). Utjecaj raznih biotičkih i abiotičkih čimbenika, veliki ribolovni

pritisak te opadanje brojnosti populacija morskih riba stvara potrebu za dodatnim istraživanjima o njihovoj biologiji, kretanju, strukturi populacija, te prilagodbi na promjene u okolišu (Johnson i Welch, 2009; Nielsen i sur., 2009; Piroddi i sur., 2017). Morske ribe karakterizira niska genetička raznolikost i slaba prilagođenost lokalnim promjenama u okolišu (Poulsen i sur., 2005; Smedbol i sur., 2002), a područje genetike riba, u usporedbi s drugim kralježnjacima, je još uvijek slabo razvijeno (Chini i sur., 2008; Sundaray i sur., 2016). Većina istraživanja je provedena na modelnim vrstama iz grupe viših riba (Teleostei), npr. zebrici *Danio rerio* i napuhači *Takifugu rubripes* koje su jedne od najistraženijih vrsta, te se njihov u potpunosti mapiran genom može pronaći u bazama podataka (Aparicio, 2002; Lieschke i Currie, 2007; Kishi i sur., 2009). Manjak podataka za nemodelne komercijalno važne vrste, uključujući brojne akvakulturne vrste, predstavlja prepreku za istraživanja njihove funkcionalne genomike, transkriptomike i proteomike. Međutim zadnjih godina napredak tehnologije sekvenciranja doveo je do novih mogućnosti analiza genoma velikom brzinom i razvoja biljega za nemodelne vrste, te se neprestano povećava broj istraživanja kako bi se na svakome kromosomu što točnije mogao precizirati položaj pojedinih gena, odrediti njihove funkcionalne uloge i obrasce evolucije, što će olakšati istraživanje procesa nastanka mnogih bolesti tijekom selekcije ili uzgoja (Basiita i sur., 2015; Chini i sur., 2008; Ji i sur., 2012; Reuter i sur., 2015; Shikano i sur., 2010; Sundaray i sur., 2016).

Mikrosatelitni biljezi su se pokazali veoma dobrim za provođenje genetičkih istraživanja kod riba, pogotovo kod vrsta kod kojih su zabilježene niske razine varijacije korištenjem ostalih biljega (Carlsson i sur., 2004; Chistiakov i sur., 2006; Jarne i Lagoda, 1996; Kalinowski, 2002; Queller i sur., 1993; Ruzzante i sur., 1998). Tijekom zadnjih desetljeća pomoću njih su napravljena mnoga vrijedna istraživanja riba u svrhu istraživanja genetičke diferencijacije između divljih i uzgojnih populacija (Briñez i sur., 2011; Luo i sur., 2012; Pan i Yang, 2010), karakterizacije i identifikacije vrsta (Abdul Rahman i sur., 2014; Nikolić i sur., 2015), određivanje srodstva i evolucijskih odnosa među vrstama (Liao i sur., 2006; Mendonça i sur., 2012; Tong i sur., 2002), te razlikovanja geografski izoliranih podpopulacija (Jarne i Lagoda, 1996). Međutim, još uvijek se većina istraživanja provodi na modelnim vrstama ili malom broju komercijalno važnih vrsta poput žutoperajne tune *T. albacares* (Appleyard i sur., 2001; Takagi i sur., 2001), prugaste tune *Katsuwonus pelamis* (Dammannogoda i sur., 2012; Menezes i sur., 2008), španjolske skuše *Scomberomorus commerson* (Van Herwerden i sur., 2006), lubina *D. labrax* (Garcia de Leon i sur., 1995), šarana *Cyprinus carpio* (Cheng i sur., 2010; Yue i sur., 2004), lososa *Salmo salar* (Koljonen i sur., 2002; Norris i sur., 1999; Portnoy i sur., 2014; Rengmark i sur., 2006), pastrve *Salmo*

trutta (Achrem i sur., 2015), bakalara *Gadus morhua* (Glover i sur., 2011), te je potrebno proširiti broj vrsta i uzoraka na kojima se istražuju ovi biljezi.

2.6. Istraživanja atlantske plavoperajne tune *Thunnus thynnus*

Tunolov atlantske plavoperajne tune, kao važan izvor hrane i prihoda, od davnina je bio dobro razvijen duž područja koje ova vrsta nastanjuje, a razvojem sushi i sashimi tržišta u Japanu 1980-ih godina porasla je potražnja za ovom vrstom te je ona postala visokoprofitabilni ulov (Collette i sur., 2011; Fromentin i sur., 2014; Fromentin i Powers, 2005; Papaconstantinou i Farrugio, 2000). Međutim, industrijalizacija europske ribolovne flote tijekom 20. stoljeća uzrokovala je preveliki ribolovni pritisak, te je do početka 2000-ih procijenjeno da su veličine populacija pale na toliko nisku razinu da im prijeti kolaps (MacKenzie i sur., 2009; Mylonas i sur., 2010; Piroddi i sur., 2017; Safina i Klinger, 2008). Kako bi se uspostavio ispravan i održiv plan obnove i upravljanja bilo je potrebno prikupiti znanje o biologiji ove vrste, njenom načinu ponašanja, prostornoj strukturiranosti populacija, te njihovom miješanju unutar područja koje nastanjuju (Fromentin i sur., 2014; Taylor i sur., 2011). Stoga se već niz desetljeća provode intenzivna istraživanja koristeći razne metode poput standardnih metoda ulova (Fromentin, 2002; Maunder i Punt, 2004), konvencionalnog i elektroničkog tagiranja (označavanja) (Aranda i sur., 2013; Block, 2001; Block i sur., 2005; Cermeño i sur., 2015; Stokesbury i sur., 2004; Walli i sur., 2009), biogeokemijske analize tvrdih struktura (otoliti, kosti, ljuske, bodlje peraja, kralješci) (Luque i sur., 2017; Neilson i Campana, 2008; Rooker i sur., 2003; Santamaria i sur., 2009; Schloesser i sur., 2010), te molekularne metode (Api i sur., 2018; Antoniou i sur., 2017; Boustany i sur., 2008; Carlsson i sur., 2004, 2007; Lockley i Bardsley, 2000; Secor i sur., 2014; Vella i sur., 2016; Viñas i sur., 2011).

Istraživanja ove vrste su započela konvencionalnim tagiranjem jedinki u Atlantskom oceanu, a ponovnim hvatanjem tagiranih jedinki dobili su se podatci o njihovom kretanju. Međutim, broj ponovo ulovljenih jedinki je bio malen, a dobivanje podataka o njihovom hvatanju i kretanju je prvenstveno ovisio o dobroj suradnji s ribarima. Također, podatci o broju i području ponovnog ulova bile su upitne jer se moglo dogoditi da broj označenih jedinki nije pravilno prijavljen ili su uhvaćene u trenutku migracije (Ely i sur., 2002; Rooker i sur., 2007). Elektroničko tagiranje jedinki je omogućilo dobivanje pouzdanijih podataka koji su osim kretanja i strukture stokova uključivali i oceanografske parametre područja u kojem su se jedinke kretale (Block i sur., 2005, 2009; Cermeño i sur., 2015; Galuardi i sur., 2018;

Rooker i sur., 2007; Stokesbury i sur., 2004; Teo i sur., 2007). Ovom metodom je zabilježen povratak tagiranih jedinki u područje njihovog mrijesta uzastopno tijekom nekoliko godina (Abascal i sur., 2016; Block, 2001; Rooker i sur., 2007; Teo i sur., 2007; Vella i sur., 2016). Sličan obrazac ponašanja je zabilježen i kod drugih vrsta morskih riba kao što su bakalar *G. morhua*, haringa *Clupea harengus* i losos *S. salar* (Bekkevold i sur., 2002; Guðjónsson i sur., 2015; Lacroix, 2013; Ruzzante i sur., 2006). Osim podataka o kretanju i strukturi stokova unutar Atlantskog oceana, tagiranjem su dobiveni podatci o područjima mrijesta, migracijskom kretanju i postojanju podpopulacija unutar Sredozemnog mora (Antoniou i sur., 2017; Karakulak i sur., 2004; Oray i Karakulak, 2005; Rodrıguez-Marın i sur., 2005; Vella i sur., 2016; Viñas i sur., 2011). De Metrio i sur. (2005) su prateći kretanje jedinki unutar Sredozemnog mora uočili da one tagirane u zapadnom dijelu nisu zabilježene u Levantinskom, Egejskom i Jadranskom moru, nego su većinom ponovo ulovljene u središnjem dijelu Sredozemnog mora, što je išlo u prilog pretpostavci da u istočnom dijelu postoji zasebna populacija. Aranda i sur. (2013) su pratili rute kretanja i ponašanje tijekom mrijesta u zapadnom dijelu Sredozemnog mora. Ribe tagirane tijekom iste godine kretale su se sličnim smjerom; nakon mrijesta oko Balearskih otoka prešle bi Gibraltarski tjesnac i uputile se prema sjeveroistočnom dijelu Atlantskog oceana. Cermeño i sur. (2015) su pomoću arhivskih podataka i elektroničkog tagiranja zabilježili da se nakon mrijesta u području Sredozemnog mora jedinke određeno vrijeme tu zadržavaju što je potvrdilo važnost tog područja za mrijest i ishranu juvenilnih jedinki.

Biogeokemijske analize u tvrdim strukturama i stabilni izotopi su korišteni za dobivanje podataka o migracijama, razlikama između stokova i dobnih skupina, prehrani te čak i o fizikalno-kemijskim svojstvima okoliša u kojem su ribe boravile (Block, 2001; Block i sur., 2005; Brophy i sur., 2016; Dickhut i sur., 2009; Estrada i sur., 2005; Fromentin i Powers, 2005; García i sur., 2017; Rooker i sur., 2001, 2003, 2007, 2008; Secor, 2002; Thresher, 1999). Rooker i sur. (2003, 2008) su provođenjem kemijskih analiza u otolitima zabilježili miješanje istočnog i zapadnog stoka tuna, te značajno opadanje broja jedinki iz zapadnog stoka u blizini područja mrijesta u Sredozemnom moru što je potvrdilo da jedinke iz zapadnog stoka rijetko ulaze u Sredozemno more, te da se jedinke iz obje populacije vraćaju u područje mrijesta.

Istraživanja korištenjem molekularnih metoda su započela 1960-ih godina i vrlo brzo su se pokazala najučinkovitijim zbog osjetljivosti, objektivnosti, te dobivanja pouzdanih podataka o strukturi i dinamici populacija atlantske plavoperajne tune koji su se mogli previdjeti izravnim promatranjem ili tagiranjem (Alvarado Bremer i sur., 1999; Boustany i

sur., 2008; Broughton i Gold, 1997; Polinski, 2014; Rasmussen i Morrissey, 2008; Vinãs i sur., 2001; Viñas i Tudela, 2009; Teletchea, 2009). Najveći broj istraživanja je proveden kako bi se razjasnila kompleksna struktura populacije atlantske plavoperajne tune unutar Atlantskog oceana. Edmunds i Sammons (1971, 1973), te Thompson i Contin (1980) su proučavajući polimorfizam enzima tetrazolium oksidaze u krvi i tkivu plavoperajnih tuna u Atlantskom oceanu zaključili da u tom području postoji samo jedna populacija. Njihovi rezultati su bili u skladu s istraživanjem Mather (1969) koji je zabilježio da tune iz Biskjaskog zaljeva i zapadnog dijela Atlantskog oceana pripadaju jednoj populaciji koja ima povremene transatlantske migracije. Ward (1995) je koristio alozime za istraživanje struktura stokova atlantske plavoperajne tune *T. thynnus* iz Atlantskog oceana i žutoperajne tuna *T. albacares* iz Tihog oceana, ali nije pronašao značajnu genetičku raznolikost između istraživanih vrsta zbog nedovoljnog polimorfizma alozima. Pujolar i Pla (2000) su između uzorkovanih jedinki iz sjeverozapadnog dijela Atlantskog oceana i Sredozemnog mora pronašli varijacije te su zaključili da su to dvije različite populacije. S druge strane, kod uzoraka iz Sredozemnog mora su zabilježili homogenost što je dovelo do zaključka o vjerojatnom postojanju panmiktične populacije u tom području. Slični rezultati su zabilježeni i u istraživanju Pujolar i sur. (2003) koji su koristeći alozime pronašli male razlike između uzoraka istočnog i zapadnog stoka iz Atlantskog oceana, dok između uzoraka unutar Sredozemnog mora nije bilo razlika. Ti rezultati su vjerojatno bili povezani s malim brojem uzorkovanih jedinki i načinom uzorkovanja budući da su uzorci zapadnog stoka uzeti duž obale Sjedinjenih Američkih Država gdje dolazi do miješanja oba stoka tijekom migracija, što je moglo utjecati na pogrešno razaznavanje njihove strukture (Rooker i sur., 2007). Međutim, unatoč činjenici da su se alozimi pokazali znatno bržim i jeftinijim od metoda koje su koristile DNA, uslijed pojave suprotnih rezultata o strukturi populacije, zaključeno je da su alozimi preslabi kao biljezi za istraživanja populacijske genetike morskih riba (Boustany i sur., 2008; Carlsson i sur., 2004, 2007; Ely i sur., 2002; Ferguson i Danzmann,1998; Kumar i Kocour, 2015; Larsson i sur., 2007; Pujolar i sur., 2003; Takagi i sur., 1999).

Kontrolna regija mtDNA kod roda *Thunnus* je veoma polimorfna stoga su mnogi znanstvenici ovom metodom proučavali razlike između vrsta tuna unutar roda *Thunnus* te varijacije između populacija određene vrste (Alvarado Bremer i sur., 1997; Amaral i sur., 2017; Dalziel i sur., 2005; Nakadate i sur., 2011; Kumar i Kocour, 2015; Viñas i Tudela, 2009; Viñas i sur., 2011), ali rezultati su često bili kontradiktorni. Alvarado Bremer i sur. (1999) su koristeći mtDNA pronašli razlike između populacija iz Sredozemnog mora i zapadnog dijela Atlantskog oceana, ali stupanj raznolikosti je bio slabo definiran te su

naglasili da ga treba potvrditi većim brojem uzoraka. Boustany i sur. (2008) i Carlsson i sur. (2004, 2007) su također pronašli razlike između populacija iz Meksičkog zaljeva i Sredozemnog mora te između uzoraka unutar Sredozemnog mora, ali su istraživanja proveli na juvenilnim "young-of-the-year" tunama (YOY), za koje je osobito da se nakon mrijesta određeno vrijeme zadržavaju u blizini područja mrijesta, i na ribama za koje se točno znalo područje mrijesta što je moglo utjecati na strukturiranost rezultata koje možda ne bi bilo da su uzorkovane odrasle jedinke. Viñas i sur. (2001) su pronašli značajnu raznolikost između uzoraka s tri postaje u Sredozemnom moru, ali budući da je kod jedne postaje uzorkovan mali broj uzoraka, zaključili su da je to moglo imati utjecaj na rezultate. Viñas i Tudela (2009) su istraživanje proveli na tri vrste roda *Thunnus* (*T. thynnus*, *T. orientalis* i *T. obesus*) korištenjem nekoliko genetičkih biljega: mtDNA, mtDNA *citokrom C oksidaze podjedinica 1* (engl. Cytochrome Oxidase subunit I; COI), nuklearne regije rDNA unutrašnjeg transkribiranog prostora (engl. Internal Transcribed Spacer; ITS) i FINS metode (engl. Forensically Informative Nucleotide Sequencing). Kombinacijom FINS metode, te mitohondrijskog i nuklearnog biljega zabilježene su razlike između istraživanih vrsta, dok se *COI* biljeg, često korišten za DNA barkoding (Ko i sur., 2013; Ward i sur., 2005), pokazao preslabim za razlikovanje manjih razlika između vrsta. Iako se mtDNA pokazala veoma korisnom u provođenju genetičkih analiza kod različitih vrsta tuna, utvrđeno je da ipak ima nedovoljnu snagu kao genetički biljeg za otkrivanje razlika među stokova, a budući da se nasljeđuje samo s majčine strane, prati razlike samo u jednom spolu, što također može utjecati na rezultate (Kumar i Kocour, 2015).

Mikrosateliti su se pokazali najpreciznijima za istraživanje genetičkih varijacija kod tuna u Atlantskom oceanu i Sredozemnom moru (Antoniou i sur., 2017; Broughton i Gold 1997; Carlsson i sur., 2004, 2007; Ely i sur., 2002; Ferrara i sur., 2010; Nikolić i sur., 2015; Riccioni i sur., 2010b, 2013, 2017; Viñas i sur., 2001, 2003, 2011). Broughton i Gold (1997) su pomoću novorazvijenih početnica pronašli varijacije između uzoraka iz Meksičkog zaljeva, Sjevernog dijela Atlantskog oceana, Sredozemnog mora i Tihog oceana. Međutim, zbog malog broja uzorkovanih jedinki napomenuli su da se rezultati trebaju interpretirati s oprezom. Slična situacija je zabilježena i kod istraživanja Takagi i sur. (1999) koji su između uzoraka iz sjeverozapadnog dijela Atlantskog oceana i Sredozemnog mora zabilježili raznolikost, ali su komentirali da je za provođenje istraživanja u bliskom području potreban mnogo veći broj uzoraka. Carlsson i sur. (2007) koristeći mtDNA nisu pronašli razlike između uzoraka juvenilnih tuna iz zapadnog dijela Sredozemnog mora i Meksičkog zaljeva, međutim kada su uključili i mikrosatelite, zabilježili su malu, ali značajnu razliku.

Zbog geografskih osobina, relativno zatvorenog područja i zabilježene homogenosti između uzoraka, dugo se smatralo da unutar Sredozemnog mora postoji jedna panmiktična populacija. Međutim, brojna istraživanja su davala suprotne rezultate. Carlsson i sur. (2004) su koristeći devet mikrosatelitnih lokusa i mtDNA zabilježili slabu, ali značajnu genetičku raznolikost između juvenilnih jedinki uzorkovanih u Tirenskom i Jonskom moru, te zaključili da postoje razlike između ta dva područja i da su to očito odvojene populacije. Na razvoj i uzrok tih razlika vjerojatno su utjecali različiti oceanografski uvjeti u tim područjima, naročito salinitet i srednje temperature na površini (Carlsson i sur., 2004; Millot, 1999; Riccioni i sur., 2013; Rooker i sur., 2007). Njihove rezultate su potvrdili Riccioni i sur. (2010b, 2013) koji su uz uključivanje povijesnih podataka pokazali da su razlike unutar Sredozemnog mora zabilježene i davno prije, a mogle su nastati zbog različitih okolišnih parametara u područjima mrijesta. Viñas i sur. (2011) analizom uzoraka iz istočnog i zapadnog dijela Sredozemnog mora pomoću mikrosatelita i mtDNA nisu pronašli značajne različitosti. Međutim, iako su njihovi rezultati generalno potvrdili postojanje jedne panmiktične populacije, te nedostatak diferencijacije unutar Sredozemnog mora, što je u skladu s istraživanjima na velikim pelagičkim vrstama u oceanima (Graves, 1998; Palumbi, 1994), te činjenice o smanjenom broju jedinki u stokovima, autori su predložili odvojen način upravljanja stokovima tuna u istraživanim područjima kako bi se minimalizirala šteta koja može biti učinjena ako ta razlika zaista postoji. Postojanje panmiktične populacije i nepostojanje značajne genetičke diferencijacije između jedinki uzorkovanih duž Sredozemnog mora koristeći mikrosatelite zabilježili su i Vella i sur. (2016) pretpostavivši da dolazi do protoka gena tijekom migracijskog kretanja tuna u razdoblju mrijesta. Naveli su da je nužno provesti dodatna istraživanja migracijskih putova kako bi se razjasnile nedoumice u kolikoj mjeri dolazi do odvajanja genetičkog materijala u različitim područjima mrijesta. Antoniou i sur. (2017) su koristeći mikrosatelite i polimorfizme jednog nukleotida (SNP) usporedili jedinke uzorkovane duž cijelog Sredozemnog mora i obale sjeverne Afrike te pokušali pomoću selektivno neutralnih procesa otkriti postojanje prirodnih barijera i procijeniti razinu protoka gena. Zabilježili su nisku razinu genetičke diferencijacije što je zabilježeno kod migratornih morskih vrsta s visokim potencijalom protoka gena. Riccioni i sur. (2017) su koristeći EST-SSR istraživali genetičku diferencijaciju i dinamiku populacija *T. thynnus* u Sredozemnom moru. Rezultati nisu pokazali prisutnost selektivnog pritiska na EST-SSR niti značajnu različitost među uzorcima što su autori pripisali niskoj stopi polimorfizma EST-SSR biljega te zaključili da oni nisu prikladni za detekciju genetičke različitosti između populacija tuna u usporedbi s neutralnim mikrosatelitima (Riccioni i sur.,

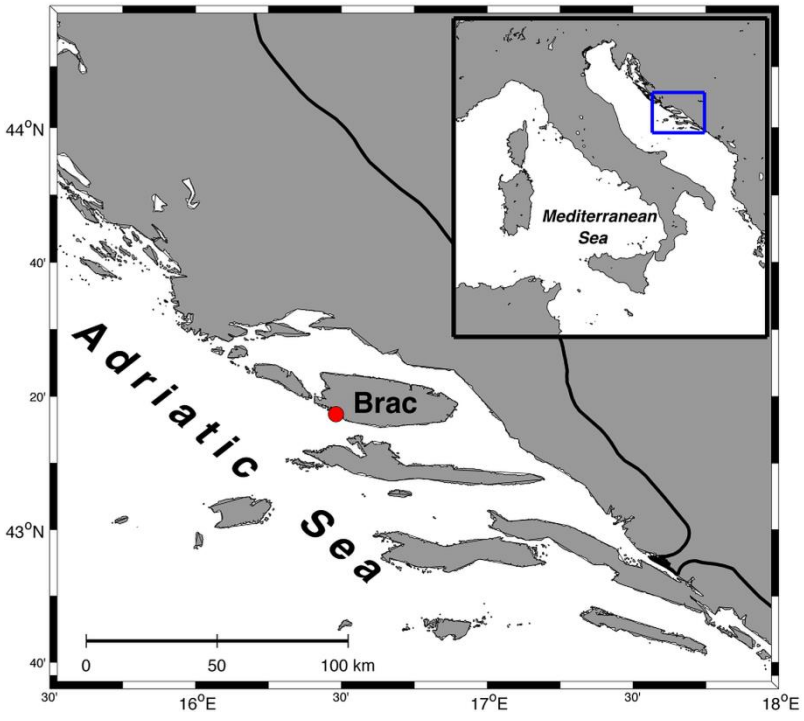
2010b, 2013). Stoga, ni tom metodom populacijska dinamika atlantskih plavoperajnih tuna u Sredozemnom moru nije u potpunosti razjašnjena, te su potrebna daljnja istraživanja koja će uključivati veći broj uzoraka, te uzorkovanje u područjima mrijesta i na YOY tunama kao što su radili Carlsson i sur. (2004, 2007), te Boustany i sur. (2008).

Od navedenih metoda za istraživanje, genetički biljezi i biogeokemijske analize tvrdih struktura su pokazali najveći potencijal u istraživanjima strukturiranosti i dinamike populacija atlantske plavoperajne tune, te bi njihovo korištenje u kombinaciji s ostalim metodama poput terenskog promatranja i elektroničkog tagiranja trebalo proširiti dodatnim brojem uzoraka i standardiziranim metodama uzorkovanja, obrade uzoraka i analize rezultata, kako bi se mogućnost suprotnih rezultata svela na najmanju razinu, te postavio pravilan plan očuvanja ove vrste.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Prikupljanje uzoraka atlantske plavoperajne tune *Thunnus thynnus*

Uzorkovanje je provedeno na uzgajalištu Sardina d.o.o. smještenom u blizini južne obale otoka Brača (43°28'77.04" N, 16°48'28.06" E) u Jadranskom moru u razdoblju između 2009. i 2014. godine (Slika 5). Uzorkovane su repne peraje 334 atlantske plavoperajne tune *T. thynnus* tijekom dva uzastopna ciklusa kaveznog uzgoja; prilikom ulaza novoulovljenih juvenilnih divljih populacija u uzgoj u proljeće 2009 i 2012. godine (divlje populacije, Tablica 2), te prilikom izlova istih populacija nakon uzgojnog ciklusa u trajanju od otprilike 2,5 godine (uzgojne populacije, Tablica 2). Uzorci su pohranjeni u 96% etilnom alkoholu i čuvani na +4 ºC do njihove obrade.



Slika 5. Lokacija uzgajališta atlantske plavoperajne tune *T. thynnus* u blizini južne obale otoka Brača u Jadranskom moru.

Tablica 2. Broj prikupljenih uzoraka atlantske plavoperajne tune *T. thynnus* tijekom dva uzastopna uzgojna ciklusa na uzgajalištu u blizini južne obale otoka Brača u Jadranom moru

Ime populacije	Skraćeni naziv populacije	Godina uzorkovanja	Broj uzoraka	Uzgojni ciklus
Divlja populacija2009	D1	2009	100	1.
Uzgojna populacija2011	U1	2011	95	1.
Divlja populacija2012	D2	2012	55	2.
Uzgojna populacija2014	U2	2014	84	2.

3.2. Izolacija ukupne DNA

Izolacija ukupne genomske DNA (gDNA) je izvršena prema modificiranom protokolu izolacije DNA iz sisavaca korištenjem izopropilnog alkohola (Laird i sur., 1991).
Kemikalije korištene u ovom istraživanju su:

- lizirajući pufer (engl. lysis buffer; 1 M Tris-HCl, 0,5 M EDTA, 5 M NaCl, 10% SDS, pH 7,5)
- enzim proteinaza K (koncentracije 20 mg/ml; Thermo Fisher Scientific, USA)
- etilni alkohol (Sigma Aldrich, SAD)
- izopropilni alkohol (Kemika, Hrvatska)
- TE pufer (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH=8,0)
- Kit 2xType-it Microsatellite PCR Master Mix (QIANGEN, USA). Kit se sastoji od Master Mix-a koji sadrži optimizirane koncentracije HotStarTaq DNA polimeraze, $MgCl_2$, deoksinukleozid trifosfate (dNTP) i pufer koji ima uravnoteženu kombinaciju soli i dodataka tako da osigurava učinkovito vezanje i produljenje svih početnica u reakciji
- agaroza (Sigma-Aldrich, USA)
- SYBR-Safe DNA interkalirajuća boja (Invitrogen, USA)
- LB pufer (engl. loading buffer; 10 mM Tris-HCl (pH= 7,6); 0,03% bromophenol blue, 0,03% xylene cyanol FF; 60% glycerol; 60 mM EDTA, pH=8,0)
- GeneRuler 100 bp; 0,1 μg/ml, 50 μg (ThermoFisher Genomics, EU)
- miliQ voda (engl. double destilated water; ddH_2O)

Oprema i materijal korišteni u ovom istraživanju:

- mikropipete (Gilson, USA)
- 0,2 ml mikrotubice (RNAse, DNAse and PCR inhibitors-free, Sigma-Aldrich, USA)
- 1,5 ml plastične tubice (Eppendorf, EU)
- 96-jažične ploče (Life Technologies, USA)
- mikrocentrifuga (Eppendorf, EU)
- mješalica/vortex (IKA India Private Limited)
- termomješalica (Biosan)
- spektrofotometar (Jenway, Bibby Scientific, UK)
- PCR uređaj MyCycler™ Thermal Cycler System (Bio-rad)
- uređaju za elektoforezu (EPS 600, Pharmacia Biotech)
- UV transiluminator (Vilber Lourmat)
- digitalni fotoaparat
- genski analizator (ABI3730xl DNA Analyzer, Applied Biosystems)

3.2.1. Postupak izolacije DNA

1. Komadić repne peraje (dužine oko 5 mm) je izrezan, usitnjen pomoću škarica u Petrijevoj zdjelici. Nakon svakog uzorka pribor i zdjelica su isprani 70%-tnim etilnim alkoholom.
2. U sterilne plastične tubice (2 ml) dodano je 200 µl lizirajućeg pufera, usitnjeno tkivo repne peraje, 4 µl enzima proteinaze K koncentracije 20 mg/ml koja degradira tkivne proteine. Mješavina je dobro promiješana koristeći vortex uređaj, te inkubirana 12 h u termomiješalici na temperaturi od 55 ºC.
3. Nakon inkubacije lizirani uzorak je kratko izmiješan, te je smjesa centrifugirana 10 minuta na 13000 okretaja/min u mikrocentrifugi.
4. Supernatant je pomoću mikropipete otpipetiran u nove sterilne plastične tubice, dodan je jednaki volumen izopropilnog alkohola, smjesa je dobro promiješana, te ponovo centrifugirana 10 minuta na 13000 okretaja/min kako bi se DNA istaložila.
5. Supernatant je mikropipetom pažljivo odstranjen te su tubice ostavljene oko 15 minuta na zraku kako bi sav izopropilni alkohol ispario.
6. Talog DNA u svakoj tubici je ispran s 500 µl 70%-tnog etilnog alkohola. Smjesa u tubicama je pažljivo promiješana te ponovo centrifugirana 10 minuta na 13000 okretaja/min.
7. 70%-tni etilni alkohol je iz svake tube mikropipetom pažljivo otpipetiran, a tubice su ostavljene na zraku oko 30 minuta kako bi preostali etilni alkohol ispario.

8. Nakon sušenja, talog DNA je otopljen u 20-40 µl TE pufera ovisno o njegovoj veličini. Tubice su označene i ostavljene preko noći na 4 ºC kako bi se DNA potpuno otopila, a sutradan su pohranjene na -20 ºC.

3.2.2. Određivanje koncentracije i čistoće DNA pomoću UV spektrofotometrije

Koncentracija i čistoća izolirane genomske DNA svih uzoraka provjerena je UV spektrofotometrom u odnosu na TE pufer kao slijepu probu.
Koncentracija se odredila mjereći količinu apsorbiranog zračenja od nukleotidnih baza na 260 nm, a izrazila u ng/µl.
Čistoća se odredila temeljem omjera valnih duljina 260/280 nm koji upućuje na kontaminaciju proteinima i idealno iznosi 1,8-2,0. Vrijednosti manje od 1,8 ukazuju na kontaminaciju proteinima ili fenolima, a vrijednosti veće od 2,0 na kontaminaciju s RNA. Nadalje, odredio se omjer 260/230 nm koji poprima vrijednosti >1,8 za čistu DNA, a ako to nije slučaj, upućuje na prisutnost kontaminirajućih spojeva kao što su proteini, polifenoli, ugljikohidrati.

3.2.3. Razrjeđenje uzoraka DNA na koncentraciju od 10 ng/µl

Budući da je za svaki uzorak pomoću UV spektrofotometra očitana različita koncentracija i čistoća izolirane genomske DNA, svi uzorci su razrijeđeni na jedinstvenu koncentraciju od 10 ng/µl. Razrjeđenja su napravljena mikropipetiranjem iz originalne tubice određenog volumena uzorka, izračunatog prema formuli ((a*b)/c), koji se prebacio u novu sterilnu plastičnu tubicu u koju je dodan volumen miliQ vode, izračunat prema formuli (b-((a*b)/c)).
a - ciljana koncentracija uzorka (10 ng/µl)
b - volumen miliQ vode s kojom se uzorak razrjeđuje (50 µl)
c - početna koncentracija uzorka

3.3. Razvijanje novih EST-SSR početnica za atlantsku plavoperajnu tunu *Thunnus thynnus*

EST-SSR molekularni biljezi korišteni u ovoj studiji su prethodno opisani i razvijeni na temelju normalizirane cDNA knjižnice izgrađene od transkripata različitih tkiva vrste *Thunnus thynnus*, kako je opisano u Trumbić, 2015. Za potrebe ovog istraživanja je

odabrano 25 lokusa u blizini gena s potencijalnom ulogom u imunološkom odgovoru, odgovoru na stres ili prijenosu signala na kojima su osmišljene specifične početnice koje omeđuju ponavljajuće regije mikrosatelita korištenjem računalnog programa Primer3 (Untergasser i sur., 2012).

3.4. Umnožavanje (amplifikacija) mikrosatelitnih lokusa u lančanoj reakciji polimerazom (PCR)

Lančanom reakcijom polimeraze (PCR) testirane su sve novorazvijene početnice na različitim temperaturama spajanja početnica (58-62 °C) i slučajno odabranim uzorcima dok nije pronađena optimalna temperatura na kojoj se najveći broj lokusa uspješno umnožio. PCR reakcije su provođene u sterilnim mikrotubicama od 0,2 ml koristeći PCR uređaj. Za PCR reakciju korišten je 2xType-it Microsatellite PCR Master Mix (QIAGEN, USA) koji je razvijen za umnažanje združenih PCR reakcija u analizama minisatelita i mikrosatelita u populacijskoj genetici.
Ukupni volumen PCR smjese je bio 5 µl, a sastavnice reakcijske smjese su navedene u Tablici 3.

Tablica 3. Sastavnice reakcijske smjese za provođenje PCR reakcije testiranja novorazvijenih početnica za atlantsku plavoperajnu tunu *T. thynnus*

Reakcijska smjesa	Volumen za 1 reakciju (µl)	
2xType-it Multiplex PCR Master Mix	2,5	Master mix
Mix početnica (F+R)	0,5	
H_2O	1	
DNA	1	

Svaki par početnica je testiran kroz niz kombinacija, mijenjajući temperaturu spajanja početnica, koncentraciju početnica u PCR reakcijskoj smjesi, te broj ciklusa tijekom PCR reakcije. Nakon nekoliko uzastopnih pozitivnih rezultata umnažanja svakog para početnica zasebno, zabilježeni su njihovi optimalni uvjeti, te su odabrani slijedeći uvjeti za izvođenje PCR reakcije:

1) 95 ºC/ 5 min (početna denaturacija; engl. initial denaturation)
2) 30 ciklusa: 95 ºC/ 30 sek (denaturacija; engl. denaturation)
   60 ºC/ 90 sek (spajanje početnica; engl. annealing)
   72 ºC/ 30 sek (produljenje početnica; engl. elongation)
3) 60 ºC/ 30 min (završno produljenje umnoženih slijedova DNA; engl. final elongation)

3.4.1. Provjera umnažanja PCR produkta elektroforezom u agaroznom gelu

Rezultati umnažanja su provjereni gel elektroforezom u 2% agaroznom gelu. Gel je napravljen otapanjem 1 g agaroze u 50 ml 1X TAE pufera. U otopljenu agarozu je dodano 3 µl SYBR-Safe DNA interkalirajuće boje koja omogućava vizualizaciju DNA na UV transiluminatoru. PCR produkti (5 µl) su pojedinačno izmiješani s LB puferom i naneseni u jažice u agaroznom gelu. U prvu jažicu je nanesen samo biljeg poznatih veličina DNA fragmenata (100 pb, 200 pb, 300 pb, 400 pb, 500 pb, itd., do 1000 pb) koji je poslužio za određivanje duljina umnoženih DNA fragmenata. Elektroforeza se provodila na sobnoj temperaturi u uređaju za elektroforezu pri naponu od 70 V i trajanju od 20 minuta. Gelovi su vizualizirani na UV transiluminatoru te fotografirani pomoću digitalnog aparata.

3.4.2. Optimizacija združene (engl. multiplex) PCR reakcije

Nakon temeljitog testiranja svih početnica odabrano je njih 15 za daljnju analizu i optimizaciju u združenoj PCR reakciji (engl. Multiplex Polymerase Chain Reaction; multiplex PCR). Prema osobinama početnica, kao što je dužinski raspon svakog pojedinog produkta te teoretska optimalna temperatura na kojoj su se lokusi prethodno umnažali, određeno je da se sve početnice koriste u jednoj združenoj reakciji, te su sve uzvodne početnice označene fluorescentnim bojama (NED - žuta boja, PET - crvena boja, VIC - zelena boja, 6FAM - plava boja).
Početnice su naručene od proizvođača (Life Technologies, USA; Applied Biosystems & Invitrogen) te su otopljene u TE puferu prema uputama kako bi se dobila stock otopina koncentracije 100 µM, od koje su napravljene radne otopine početnica. Napravljene su četiri radne otopine početnice kako bi se olakšala priprema združene PCR reakcije; tri otopine koje su sadržavale četiri para početnica i jedna koja je sadržavala tri para početnica, svaka koncentracije 2 µM (Tablica 4).

Tablica 4. Izračun za izradu radnih otopina početnica za provođenje združene (engl. multiplex) PCR reakcije

ŽUTI MIX					
Lokus	F	R	Mix početnica	H_2O	Ukupni volumen
Tth3	2 µl	2 µl	16 µl	34 µl	50 µl
Tth12	2 µl	2 µl			
Tth18	2 µl	2 µl			
Tth19	2 µl	2 µl			

ZELENI MIX					
Lokus	F	R	Mix početnica	H_2O	Ukupni volumen
Tth5	2 µl	2 µl	16 µl	34 µl	50 µl
Tth11	2 µl	2 µl			
Tth15	2 µl	2 µl			
Tth23	2 µl	2 µl			

PLAVI MIX					
Lokus	F	R	Mix početnica	H2O	Ukupni volumen
Tth13	2 µl	2 µl	16 µl	34 µl	50 µl
Tth22	2 µl	2 µl			
Tth24	2 µl	2 µl			
Tth25	2 µl	2 µl			

CRVENI MIX					
Lokus	F	R	Mix početnica	H_2O	Ukupni volumen
Tth1	2 µl	2 µl	12 µl	38 µl	50 µl
Tth2	2 µl	2 µl			
Tth14	2 µl	2 µl			

Združene PCR reakcije su pripremljene u mikrotubicama (0,2 ml), a ukupni volumen reakcijske smjese je bio 5 µl (Tablica 5).

Tablica 5. Sadržaj PCR reakcijske smjese za umnožavanje mikrosatelitnih lokusa u združenoj (engl. multiplex) PCR reakciji

Reakcijska smjesa	Volumen za 1 reakciju (µl)	
2xType-it Microsatellite PCR Master Mix	2,5	Master mix
ŽUTI MIX	0,25	
ZELENI MIX	0,25	
PLAVI MIX	0,25	
CRVENI MIX	0,25	
H_2O	0,50	
DNA	1	

Uvjeti za izvođenje združene (engl. multiplex) PCR reakcije bili su slijedeći:

1) 95 ºC/ 5 min (početna denaturacija; engl. initial denaturation)
2) 28 ciklusa: 95 ºC/ 30 sek (denaturacija; engl. denaturation)
   60 ºC/ 90 sek (spajanje početnica; engl. annealing)
   72 ºC/ 30 sek (produljenje početnica; engl. elongation)
3) 60 ºC/ 30 min (završno produljenje umnoženih slijedova DNA; engl. final elongation)

Nakon završetka PCR reakcije, produkti su pojedinačno prebačeni u označene jažice u sterilnoj 96-jažičnoj ploči i poslani na analizu u Macrogen servis u Republici Koreji, gdje su analizirani u genskom analizatoru (ABI3730xl DNA Analyzer, Applied Biosystems) kako bi se odredila dužina alela mikrosatelitnih lokusa.

3.5. Statistička obrada podataka

Analiza elektroferograma (ispis genskog analizatora) je izrađena u računalnom programu GeneMapper 3.2 (Applied Biosystems). Svaki elektroferogram su očitale dvije osobe kako bi se izbjegle pogreške u očitavanju podataka.

Računalnim programom MICROCHEKER 2.2.3 (Van Oosterhout i sur., 2004) testirano je postojanje pogreški kod umnažanja (nul aleli i lažni aleli), koje nastaju uslijed greški pri rukovanju s uzorcima, pipetiranju i umnažanju tijekom PCR reakcije. Prisutnost i učestalost nul alela dodatno su procjenjeni koristeći računalni program FreeNA (Chapuis i Estoup, 2007) pomoću algoritma očekivanja i maksimizacije (engl. Expectation-Maximization Algorithm). Program primjenjuje metodu korekcije ENA (engl. Excluding Null Alleles) za učinkovito ispravljanje pozitivne pristranosti uzrokovane prisutnošću nul alela u F_{ST} procjeni.
Računalni program POWSIM 4.1 (Ryman i Palm, 2006) korišten je za analizu statističke snage testa (engl. power analysis) kako bi se provjerilo da li je veličina uzorka u ovom istraživanju dovoljna za uočavanje statističke razlike u veličini učinka, ukoliko takva postoji. Snaga testa ovisi o veličini uzorka, veličini učinka, razini značajnosti i snazi korištenog statističkog testa. Njene vrijednosti imaju raspon od 0,0 do 1,0, a vrijednost ≥ 0,80 potvrđuje da promatrani nezavisni t-test ima dovoljnu snagu. Provedene su različite simulacije koje su uključivale 4 podpopulacije F_{ST} raspona od 0,001 do 0,01, te različite kombinacije efektivne veličine populacije (Ne) i broja generacija (t) po vrijednosti F_{ST}-a.
Računalni program ARLEQUIN 3.5 (Excoffier i Lischer, 2010) je korišten za procjenu frekvencija alela, ukupnog broja alela u populaciji, prosječnog broja alela po lokusu, zapažene heterozigotnosti (H_o) i očekivane heterozigotnosti (H_e), te za testiranje Hardy-Weinbergove ravnoteže pri čemu je korišten Markov chain test s 1.000.000 ponavljanja. Ovaj program je također korišten za određivanje stupnja neravnoteže vezanja (engl. Linkage Disequilibrium; LD) korištenjem 10.000 permutacija. Lokusi koji se nalaze relativno blizu često se nasljeđuju zajedno i među njima postoji neravnoteža vezanja pa nisu neovisni jedan od drugoga što znatno smanjuje učinkovitost statističkih testova. Za određivanje razine značajnosti, p vrijednosti su korigirane primjenom Bonferronijeve metode za višestruko testiranje (Rice, 1989). Navedenim programom određen je protok gena između uzorkovanih populacija putem F_{ST} vrijednosti za ukupni set podataka (engl. global F_{ST} value) i za sve parove populacija (engl. pairwise F_{ST} value) (Weir i Cockerham, 1984). Isti softverski paket je korišten i za određivanje razine značajnosti F_{ST} vrijednosti između analiziranih parova populacija uporabom testa permutacija, pri čemu je broj permutacija podešen na 10.000, dok je razina značajnosti određena nakon primjene Bonferronijeve korekcije (Rice, 1989). Genetička diferencijacija između parova populacija je definirana kao niska ukoliko su F_{ST} vrijednosti bile manje od 0,05; F_{ST} vrijednosti u rasponu od 0,05 do 0,15 su ukazivale na srednju razinu diferencijacije između populacija; F_{ST} vrijednosti u rasponu od 0,15 do 0,25 su ukazivale na visoku razinu diferencijacije između populacija, dok su na veoma visoku

diferencijaciju ukazivale F_{ST} vrijednosti veće od 0,25 (Wright, 1978). Razdioba genetičke varijacije između i unutar uzorkovanih populacija pomoću analize molekularne varijance (engl. Analysis of Molecular Variance; AMOVA) i procjenom fiksacijskog indeksa (F_{ST}) određena je korištenjem programa ARLEQUIN 3.5 (Excoffier i Lischer, 2010). Statistička značajnost je procijenjena korištenjem 2000 permutacija.

Računalni program FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2002) je korišten za procjenu alelnog bogatstva (engl. allelic richness), mjere broja alela po lokusu neovisno o veličini uzorka, te za izračun koeficijenta križanja u bliskom srodstvu (engl. Fixation index; F_{IS}).

Multivarijantna diskriminativna analiza glavnih komponenti (DAPC) je korištena za analizu i vizualizaciju genetičke strukture populacija *T. thynnus* iz dva uzastopna ciklusa uzgoja (Jombart, 2008). Optimalan broj glavnih komponenti koje najbolje opisuju većinu izvora varijacija u podatcima s najnižom stopom pogreške je određen postupkom unakrižne validacije pomoću stratificiranog slučajnog uzorkovanja s 1000 iteracija.

Računalni program STRUCTURE 2.3.4 (Falush i sur., 2003; Pritchard i sur., 2000) je korišten za određivanje genetičke strukture populacija i pripadnost jedinki određenom klasteru obradom frekvencije alela svakog ispitivanog lokusa u analiziranim populacijama. To je softverski paket baziran na Bayesovoj klaster metodi s primjenom u analizi genetičke strukture populacija. Parametri korišteni u program su bili: “Length of Burnin Period” 10.000, “Number of MCMC (Monte Carlo Markov Chain) Repeats after Burnin” 100.000, upotrebljen je “admixture“ model, vrijednost broja klastera (K) je podešena na 1-5, a za svaku K vrijednost broj nezavisnih ponavljanja je bio 20. U cilju određivanja najvjerojatnijeg broja klastera (K) u analiziranom uzorku od 334 tune primijenjena je *ad hoc* statistička ΔK metoda (Evanno i sur., 2005) koja se zasniva na pronalaženju promjena u logaritamskoj vjerojatnosti lnP(K) podataka između uzastopnih K vrijednosti. Koristeći online računalni program STRUCTURE HARVESTER 0.6.94 grafički su prikazani dobiveni rezultati (Earl i von Holdt, 2012).

Računalni programi LOSITAN (Antao i sur., 2008) i BayeScan 2.1 (Foll, 2012) su korišteni za utvrđivanje lokusa koji odstupaju od neutralnosti. Program LOSITAN je pokrenut korištenjem modela mutacija u koracima (engl. stepwise mutation model) prema navedenim parametrima: 50.000 simulacija, 95% intervala pouzdanosti, “Force mean F_{ST}" i pogrešnom brzinom otkrivanja (FDR) od 0,05. Za provođenje BayeScan analize korišteni su parametri: “prior odds 10“, „samples size 5000“, „thinning interval 10.000“, „pilot runs 20“, „pilot run length 5000“, „additional burn-in 50.000“. Program provodi Bayesovu metodu za procjenu posteriorne vjerojatnosti da je svaki lokus podložan selekciji. Odluka da li je lokus pod

selekcijom ili ne, donesena je prema tumačenju Bayesovog faktora koji se izračunava za svaki lokus i predstavlja vjerojatnost da je lokus pod djelovanjem selekcije (log10(BF) > 0,5 „substantial“; 1,5-2,0 „very strong“; > 2,0 „decisive“) (Jeffreys, 1998). Ovisno da li Bayesov faktor ima pozitivnu ili negativnu vrijednost, može se zaključiti da li je u pitanju pozitivna ili balansirana selekcija. Pozitivna selekcija će povećati diferencijaciju, a smanjiti varijabilnost unutar određene regije, dok će balansirana selekcija imati suprotan učinak.

4. REZULTATI

4.1. Analiza novorazvijenih EST-SSR početnica za atlantsku plavoperajnu tunu *Thunnus thynnus*

Razvijeno je 25 novih biljega, od kojih se njih 14 nalazilo u kodirajućoj regiji u genomu, a 11 u UTR regijama. U kodirajućoj regiji je deset biljega (Tth8, Tth9, Tth10, Tth14, Tth15, Tth16, Tth21, Tth22, Tth24 i Tth25) imalo trinukleotidna ponavljanja, tri biljega (Tth1, Tth2 i Tth20) su imala tetranukleotidna ponavljanja, a jedan biljeg (Tth5) je imao pentanukleotidno ponavljanje. U UTR regijama su četiri biljega (Tth11, Tth12, Tth13 i Tth23) imala dinukleotidna ponavljanja, tri biljega (Tth17, Tth18 i Th19) su imala trinukleotinda ponavljanja, dva biljega (Tth3 i Tth4) su imala tetranukleotidna ponavljanja, jedan biljeg (Tth7) je imalo pentanukleotidno ponavljanje, a jedan (Tth6) heksanukleotidno ponavljanje.

Nakon testiranja svih novorazvijenih 25 početnica na različitim temperaturama spajanja početnica, za daljnje analize odabrano je njih 15 (Tth1, Tth2, Tth3, Tth5, Tth11, Tth12, Tth13, Tth14, Tth15, Tth18, Tth19, Tth22, Tth23, Tth24 i Tth25) koje su rezultirale uspješnom amplifikacijom i jednim PCR produktom pri temperaturi od 60 ºC (Tablica 6).

Tablica 6. Opis osobitosti testiranih i odabranih mikrosatelitnih početnica za atlantsku plavoperajnu tunu *T. thynnus*

Lokus	Sljedovi uzvodnih (F) i nizvodnih (R) početnica	Fluorescentna boja uzvodne (F) početnice	Mikrosatelitni motiv	Raspon PCR produkta (pb)	Regija u genomu	Oznaka i anotacija gena
Tth1	(F) GTCATCATCTTCGAGAGCGTC (R) GTGTCGGCCATCTTGTTGTAG	PET	$(TCCG)_7$	98-154	Kodirajuća	*slc6a8*; solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, creatine), member 8
Tth2	(F) AGAATGTGTTTGGCTGCTGATA (R) TTCGTCTCTTTCTTTCACGACA	PET	$(AAAC)_5$	148-188	Kodirajuća	*nampta;* nicotinamide phosphoribosyltransferase-like
Tth3	(F) GGGACACAGATTGATAAAGACAC (R) CCACTGACGCCATGACAC	NED	$(CAGA)_6$	81-129	5' UTR	*scn4ba*; sodium channel, voltage-gated, type IV, beta a
Tth4	(F) TGTCCAACTACCCTACCCTAATTTT (R) ACCGACCGACACCAACTAACT	/	$(GTTA)_5$	294-334	3' UTR	*cnn2*; Calponin 2
Tth5	(F) ACGACATCCAGACCAAGAGAAG (R) AGGAAACAAACCACCTGAGTGA	VIC	$(ACTGA)_6$	192-252	Kodirajuća	*polr2d* ; polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide D
Tth6	(F) GTACCGTCCTTCCCTTCCC (R) TCGTTTCGTTCTTACTTCCTTACC	/	$(CCCTTC)_5$	74-134	3' UTR	*nkapl*; NFKB activating protein-like
Tth7	(F) GTTGCCACTGCTCCTCCC (R) GTGGTATCAACGCAGAGTACGG	/	$(TTTTG)_5$	103-153	3' UTR	*mapk1*; mitogen-activated protein kinase 1
Tth8	(F) TATCAACGCAGAGTACGGGG (R) ATTCCTGTCTGGTGAGAGCAGT	/	$(GCT)_{10}$	99-159	Kodirajuća	*cysltr1*; cysteinyl leukotriene receptor 1

Tth9	(F) ACTACGTCACACCTGTCAATCG (R) CTAAGCAGTGGTATCAACGCAG	/	$(AAC)_{11}$	142-208	Kodirajuća	*grb2*; growth factor receptor-bound protein 2
Tth10	(F) TGGATAAGGCCAGTGATGCT (R) TTGGGGTAGTCCATCTTGTACC	/	$(CAG)_8$	159-207	Kodirajuća	*casp3b*; caspase 3, apoptosis-related cysteine protease b
Tth11	(F) ATACAGGTTGGTCTGCCGTC (R) AGTGTCCGTCATCACACAGC	VIC	$(CA)_{11}$	154-199	3' UTR	*cfI*; complement factor I
Tth12	(F) GATTGGTGTCACTGGTGTGC (R) CAAGGAGACAAAGACCCGAG	NED	$(GT)_8$	127-159	5' UTR	*mapk6*; mitogen-activated protein kinase 6
Tth13	(F) AATGCATGTGGGATCAACAA (R) TCTGGCTGAATGGGAAAGTC	6FAM	$(AC)_{11}$	185-229	3' UTR	*ctsf*; cathepsin F
$Tth14^x$	(F) GGAAGAGGAGAAGGACGAGG (R) AAAGTGCTTGACAGCCAGGT	PET	$(AAG)_6$	247-283	Kodirajuća	*hsp90aa1.2*; heat shock protein 90-alpha 2
Tth15	(F) TCCAAGAAGAAGAAGGCGAA (R) TATGCAGGTTTTCTCCACCC	VIC	$(GAG)_5$	114-144	Kodirajuća	*nkap*; NFKB activating protein-like
Tth16	(F) ATGGATAAGGCCAGTGATGC (R) TCTTGTACCGGTAAGGGTCG	/	$(CAG)_8$	147-195	Kodirajuća	*casp3b*; caspase 3, apoptosis-related cysteine protease b
Tth17	(F) AAGCAGTGGTATCAACGCAG (R) GTCGTTCTCTATGCCGTCAG	/	$(GCT)_{10}$	171-231	5' UTR	*cysltr1*; cysteinyl leukotriene receptor 1
Tth18	(F) AGGAAGGAGAGCTGGGTTTC (R) GGGGCTGATGAGATCAAGAA	NED	$(AAC)_{11}$	211-277	3' UTR	*grb2b*; growth factor receptor-bound protein 2b
Tth19	(F) ACGGCACATCTCACAAATGA (R) TGAGTAACGATGGCTTCTGC	NED	$(AAC)_5$	181-211	3' UTR	*tnika*; TRAF2 and NCK interacting kinase a
Tth20	(F) GGTTGGTTAAGGGTAAGGAGTT (R) ACCGACCGACACCAACTAAC	/	$(GTTA)_5$	227-267	Kodirajuća	*cnn2*; calponin 2

Tth21	(F) CTCTGGATTGAGAGCTGCCT (R) AGGATGGCGGTCATCTGTAG	/	$(AGA)_8$	194-242	Kodirajuća	*elovl1a*; elongation of very long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3, yeast)-like 1a
Tth22	(F) CAAACAGAAAAAGAGCCGTCA (R) GCACAGACAGCTGCATTGAG	6FAM	$(ATC)_8$	236-284	Kodirajuća	*pparda*; peroxisome proliferator-activated receptor delta a
Tth23	(F) TCTGCAACAGCCAGTAGAGC (R) GCAACAGCAGCAAGTGAGTG	VIC	$(AC)_{10}$	256-296	3' UTR	*sch1*; SHC-transforming protein 1-like
Tth24[x]	(F) TTTCTCATCATTGCCTGCTG (R) GCCAGAAGAAGAGCCAACAC	6FAM	$(ATG)_6$	94-130	Kodirajuća	*clu*; clusterin (complement lysis inhibitor, SP-40,40, sulfated glycoprotein 2, testosterone-repressed prostate message 2, apolipoprotein J)
Tth25	(F) ATTACAGTGTGCGGAGCATC (R) TGTCAGTGAATGTGACTGCTG	6FAM	$(CAG)_8$	134-182	Kodirajuća	*ldlra*; low density lipoprotein receptor a

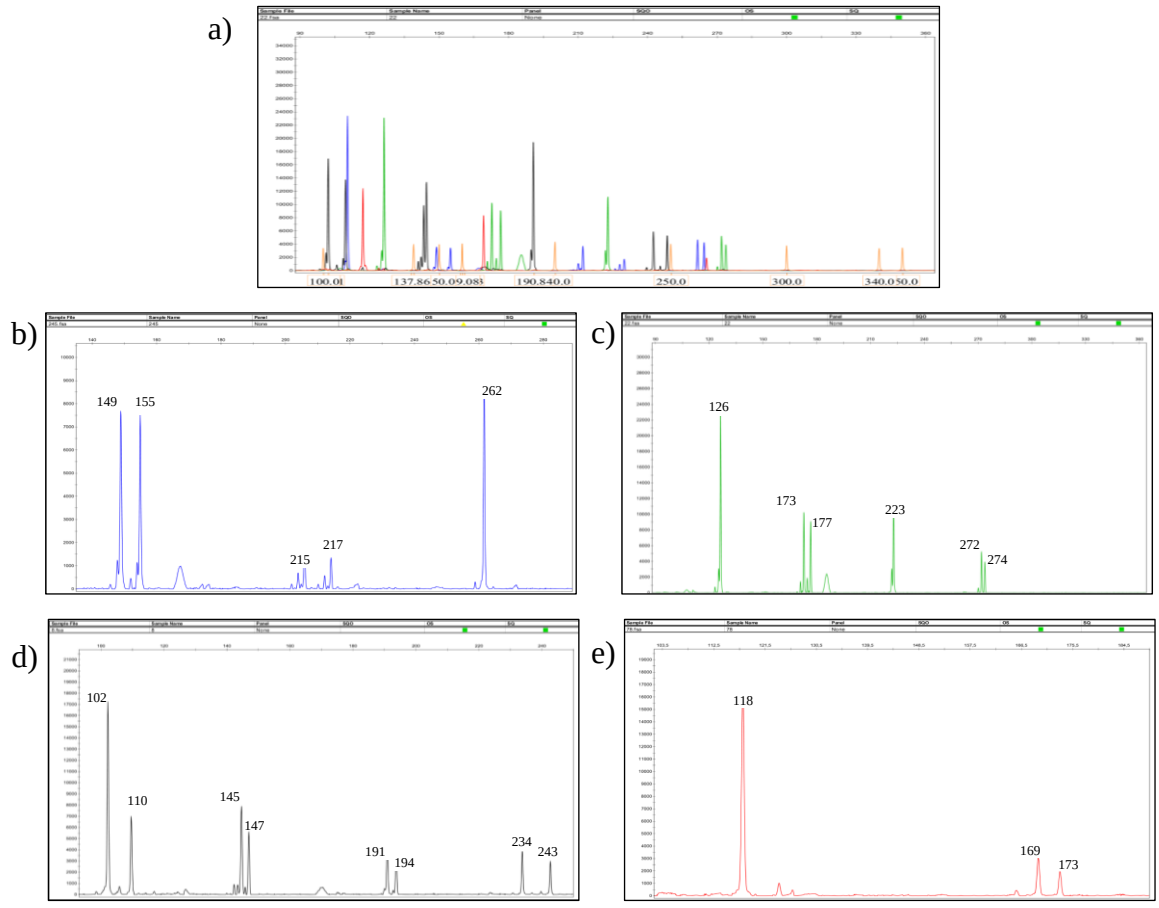
lokusi u kurzivu; odabrani lokusi za daljnju analizu u združenoj PCR reakciji (engl. multiplex PCR). Uzvodne početnice (engl. forward) su obilježene fluorescentnom bojom (NED - žuta boja, PET - crvena boja, VIC - zelena boja, 6FAM - plava boja)

[x] lokusi izbačeni iz daljnjih analiza nakon provedene genotipizacije

4.2. Uspješnost genotipizacije mikrosatelitnih lokusa kod atlantske plavoperajne tune *Thunnus thynnus*

Kako je prikazano na slici 6, plavi vršci prikazuju alele osobite za lokus Tth13, Tth22, Tth24, Tth25; zeleni vršci prikazuju alele osobite za lokus Tth5, Tth11, Tth15, Tth23; crni vršci prikazuju alele osobite za lokus Tth3, Tth12, Tth18, Tth19; crveni vršci prikazuju alele osobite za lokus Tth1, Tth2, Tth14, dok narančasti vršci predstavljaju dužinski standard GS-500 LIZ (Applied Biosystems).

Ukoliko je genotip ispitivanog lokusa bio homozigotan na elektroferogramu je zabilježen samo jedan vršak, a u slučaju heterozigota zabilježena su dva vrška.



Slika 6. Primjeri produkata združene PCR reakcije analiziranih metodom kapilarne elektroforeze i prikazanih kao elektroferogrami:

a) Elektroferogram uzorka UL09_22 za sve lokuse; b) Elektroferogram uzorka UL12_245 za lokus Tth25, Tth13 i Tth22; c) Elektroferogram uzorka UL09_22 za lokus Tth15, Tth11, Tth5 i Tth23; d) Elektroferogram uzorka UL09_8 za lokus Tth3, Tth12, Tth19 i Tth18; e) Elektroferogram uzorka UL09_78 za lokus Tth1 i Tth2.

Većina testiranih uzoraka je uspješno genotipizirana (Prilog A). Nakon očitavanja elektroferograma svih lokusa, lokusi Tth14 i Tth24 su uklonjeni iz daljnjih analiza jer je kod lokusa Tth14 zabilježen veliki broj neočitanih genotipova, a lokus Tth24 je bio monomorfan. Od ukupnog broja uzoraka (N = 334), zabilježeno je 0,92% podataka koji su nedostajali, kod 7 lokusa (Tth1, Tth3, Tth5, Tth12, Tth15, Tth19 i Tth25) je uspješnost genotipizacije bila 100%, dok je kod lokusa Tth13 bila najmanja (91,32%) (Tablica 7).

Genotipovi svih uzoraka atlantske plavoperajne tune su navedeni u Prilogu A.

Računalnim programom MICROCHEKER je na lokusima Tth13 i Tth15 zabilježena mogućnost postojanja nul alela, ali s procjenjenom frekvencijom < 0,1. Budući da je procjena F_{ST} sa i bez korištenja metode ENA (engl. Excluding Null Alleles) dala slične rezultate; F_{ST} = 0,0049 s odgovarajućim $CI_{95\%}$ (0,0021-0,0079) bez ENA i F_{ST} = 0,0050 (0,0027-0,0087) s ENA, lokusi su zadržani u daljnjim statističkim analizama.

Tablica 7. Uspješnost genotipizacije 13 lokusa u uzorcima atlantske plavoperajne tune *T. thynnus* iz dva uzastopna uzgojna ciklusa na uzgajalištu u blizini južne obale otoka Brača u Jadranskom moru

Lokus	Broj uspješno genotipiziranih uzoraka	% uspješno genotipiziranih uzoraka
Tth1	334	100
Tth2	333	99,70
Tth3	334	100
Tth5	334	100
Tth11	333	99,70
Tth12	334	100
Tth13	305	91,32
Tth15	334	100
Tth18	331	99,10
Tth19	334	100
Tth22	329	98,50
Tth23	328	98,20
Tth25	334	100

4.3. Statistička analiza podataka

Analizom statističke snage testa procijenjena je vjerojatnost od 89% (χ^2, Fisherov test) za otkrivanje strukture pri F_{ST} vrijednosti od 0,002, ukazujući da korištene analize u istraživanju mogu otkriti stvarnu strukturu populacija ukoliko su stvarne procjene F_{ST} vrijednosti na ovoj razini ili iznad.

Analiza podataka sakupljenih tijekom dva uzastopna uzgojna ciklusa je provedena usporedbom četiri populacije (dvije divlje i dvije uzgojne populacije iz oba uzgojna ciklusa) (Tablica 8). Uspoređene su D1 (divlja populacija2009) s U1 populacijom (uzgojna populacija2011), te D2 (divlja populacija2012) s U2 populacijom (uzgojna populacija2014) (Tablica 8).

4.3.1. Opisna statistika i testiranje Hardy-Weinbergove ravnoteže

Parametri genetičke raznolikosti četiri populacije divljih i uzgojnih tuna; ukupan broj alela po lokusu, uočena heterozigotnost (H_o), očekivana heterozigotnost (H_e), broj privatnih alela po lokusu (N_{pr}), alelno bogastvo (A_r), fiksacijski indeks (F_{IS}) te p-vrijednost testiranja Hardy-Weinbergove ravnoteže, prikazani su u Tablici 8.

U ovom istraživanju na 13 novorazvijenih i testiranih lokusa ukupno je zabilježena prisutnost 88 alela s prosječnim brojem 6,77 ± 4,21 alela po lokusu. U prvom uzgojnom ciklusu zabilježena je prisutnost 84 alela s prosječnim brojem 6,46 ± 4,29 alela po lokusu, dok je u drugom uzgojnom ciklusu zabilježena prisutnost 77 alela s prosječnim brojem 5,92 ± 3,57 alela po lokusu.

Kod D1 populacije na 13 novorazvijenih i testiranih lokusa ukupno je zabilježena prisutnost 77 alela s prosječnim brojem 5,92 ± 4,25 alela po lokusu. Svi istraženi mikrosatelitni lokusi su bili polimorfni. Isprekidana (disjunktna) distribucija alela je uočena na dva lokusa (Tth13 i Tth19), dok je na svim ostalima (Tth1, Tth2, Tth3, Tth5, Tth11, Tth12, Tth15, Tth18, Tth22, Tth23 i Tth25) distribucija alela bila neprekidna. Najveći broj alela je zabilježen na lokusu Tth13 (18 alela), a najmanji na lokusu Tth15 (dva alela).

Kod U1 populacije na 13 novo razvijenih i testiranih lokusa ukupno je zabilježena prisutnost 81 alela s prosječnim brojem 6,23 ± 4,02 alela po lokusu. Svi istraženi mikrosatelitni lokusi su bili polimorfni. Isprekidana distribucija alela je uočena na dva lokusa (Tth15 i Tth19), dok je na svim ostalima (Tth1, Tth2, Tth3, Tth5, Tth11, Tth12, Tth13,

Tth18, Tth22, Tth23 i Tth25) distribucija alela bila neprekidna. Najveći broj alela je zabilježen na lokusu Tth13 (18 alela), a najmanji na lokusima Tth5 i Tth19 (tri alela).

Srednja vrijednost uočene heterozigotnosti (H_o) u D1 populaciji je iznosila 0,49 ± 0,25, raspona 0,110 (Tth5 i Tth15) - 0,950 (Tth3), dok je ta vrijednost u U1 populaciji je iznosila 0,55 ± 0,26, raspona od 0,115 (Tth5) do 0,947 (Tth3). Srednja vrijednost očekivane heterozigotnosti (H_e) u D1 populaciji je iznosila 0,50 ± 0,25, raspona od 0,104 (Tth5 i Tth15) do 0,871 (Tth13), dok je ta vrijednost u U1 populaciji iznosila 0,52 ± 0,24, raspona od 0,111 (Tth5) do 0,909 (Tth13).

Kod uzoraka iz D1 populacije su zabilježene niže vrijednosti alelnog bogatstva (A_r= 5,41 ± 3,69) u usporedbi s uzorcima iz U1 populacije (A_r= 5,67 ± 3,68).

Srednja vrijednost koeficijenta križanja u srodstvu (F_{IS}) kod D1 populacije je bila pozitivna (0,019 ± 0,18), raspona od -0,454 (Tth3) do 0,389 (Tth13), dok je u U1 populaciji ta vrijednost bila negativna (-0,070 ± 0,17), raspona od -0,480 (Tth3) do 0,212 (Tth13). Na lokusu Tth13 u obe populacije (D1 i U1 populacija) F_{IS} vrijednost je bila značajno veća od nule, dok je na lokusu Tth3 u obe populacije ta vrijednost bila značajno niža od nule.

Značajno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže zabilježeno je kod nekoliko lokusa u D1 (Tth3, Tth12 i Tth13) i U1 populaciji (Tth3, Tth12 i Tth13) nakon korištenja Bonferronijeve korekcije ($p < 0,001$). Nakon primjene Bonferronijeve korekcije nije uočena neravnoteža vezanja između genotipova istraživanih lokusa, što je omogućilo da se daljnje analize mogu provesti uz pretpostavku da su lokusi statistički neovisni.

Od ukupnog broja alela u obe populacije (N = 85) zabilježeno je 12 alela koji su se pojavili ili u D1 populaciji ili u U1 populaciji kao privatni aleli. Među ukupnim uzorcima iz D1 populacije zabilježena je prisutnost četiri alela koji se nisu pojavili među uzorcima iz U1, dok je u U1 populaciji zabilježeno osam takvih alela. Srednja vrijednost broja privatnih alela u D1 populaciji je iznosila 0,30 ± 0,48, dok je u U1 populaciji ta vrijednost iznosila 0,61 ± 0,65. Najveći broj privatnih alela je zabilježen na lokusu Tth15 u U1 populaciji (dva alela) (Tablica 8).

Kod D2 populacije je na 13 novorazvijenih i testiranih lokusa ukupno je zabilježena prisutnost 63 alela s prosječnim brojem 4,85 ± 3,29 alela po lokusu. Kod ove populacije je zabilježen jedan monomorfan alel (Tth 5) koji nije uzet u obzir prilikom daljnjih statističkih analiza, dok su svi ostali bili polimorfni. Isprekidana distribucija alela je uočena na tri lokusa (Tth13, Tth18 i Tth19), dok je na svim ostalima (Tth1, Tth2, Tth3, Tth11, Tth12, Tth15, Tth22, Tth23 i Tth25) distribucija alela bila neprekidna. Najveći broj alela je zabilježen na lokusu Tth13 (13 alela), a najmanji na lokusima Tth15 i Tth19 (dva alela).

Kod U2 populacije na 13 novorazvijenih i testiranih lokusa ukupno je zabilježena prisutnost 74 alela s prosječnim brojem 5,69 ± 3,33 alela po lokusu. Svi istraženi mikrosatelitni lokusi su bili polimorfni. Isprekidana distribucija alela je uočena na dva lokusa (Tth18 i Tth19), dok je na svim ostalima (Tth1, Tth2, Tth3, Tth11, Tth12, Tth13, Tth15, Tth22, Tth23 i Tth25) distribucija alela bila neprekidna. Najveći broj alela je zabilježen na lokusu Tth13 (15 alela), a najmanji na lokusima Tth2, Tth5, Tth15 i Tth19 (tri alela).

Srednja vrijednost uočene heterozigotnosti (H_o) u D2 populaciji iznosila 0,60 ± 0,32 raspona od 0,072 (Tth15) do 0,945 (Tth3), dok je ta vrijednost u U2 populaciji iznosila 0,55 ± 0,29 raspona od 0,059 (Tth15) do 0,976 (Tth3). Srednja vrijednost očekivane heterozigotnosti (H_e) u D2 populaciji iznosila je 0,49 ± 0,25, raspona od 0,070 (Tth15) do 0,840 (Tth13), dok je ta vrijednost u U2 populaciji iznosila 0,55 ± 0,29, raspona od 0,080 (Tth5) do 0,860 (Tth13).

Kod uzoraka iz D2 populacije očitane su niže vrijednosti alelnog bogatstva (A_r= 4,77 ± 3,23) u usporedbi s uzorcima iz U2 populacije (A_r= 5,33 ± 2,95).

Srednja vrijednost koeficijenta križanja u srodstvu (F_{IS}) kod D2 populacije je bila negativna (-0,224 ± 0,21), raspona od -0,512 (Tth3) do 0,196 (Tth1), dok je u U2 populaciji ta vrijednost bila također negativna (-0,097 ± 0,12), raspona od -0,378 (Tth3) do 0,526 (Tth15). Na lokusu Tth15 u U2 populaciji F_{IS} vrijednost je bila značajno veća od nule, dok je na nekoliko lokusa (Tth3, Tth11 i Tth23 u D2 populaciji, te na Tth3 i Tth11 u U2 populaciji) ta vrijednost bila značajno niža od nule.

Značajno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže zabilježeno je kod nekoliko lokusa u D2 populaciji (Tth3, Tth11, Tth12, Tth18, Tth23 i Tth25) i U2 populaciji (Tth3, Tth13 i Tth15) nakon korištenja Bonferronijeve korekcije ($p < 0,001$). Nakon primjene Bonferronijeve korekcije nije uočena neravnoteža vezanja između genotipova istraživanih lokusa, što je omogućilo da se daljnje analize mogu provesti uz pretpostavku da su lokusi statistički neovisni.

Od ukupnog broja alela u obe populacije (N = 77) zabilježeno je 15 alela koji su se pojavili ili u D2 ili u U2 populaciji kao privatni aleli. Među ukupnim uzorcima iz D2 populacije zabilježena je prisutnost tri alela koji se nisu pojavili među uzorcima iz U2 populacije, dok je u U2 populaciji zabilježeno 12 takvih alela. Srednja vrijednost broja privatnih alela u D2 populaciji je iznosila 0,25 ± 0,45 dok je u U2 populaciji iznosila 1,00 ± 0,95. Najveći broj privatnih alela je zabilježen na lokusu Tth13 u U2 populaciji (tri alela) (Tablica 8).

Tablica 8. Parametri genetičke raznolikosti divljih i uzgojnih populacija atlantske plavoperajne tune *T. thynnus* iz dva uzastopna uzgojna ciklusa na uzgajalištu u blizini južne obale otoka Brača u Jadrankom moru

	Prvi uzgojni ciklus														Drugi uzgojni ciklus												
	D1 (Divlja populacija2009)							U1 (Uzgojna populacija2011)							D2 (Divlja populacija2012)							U2 (Uzgojna populacija2014)						
Lokus	N	H_o	H_e	N_{pr}	A_r	F_{IS}	HWEP	N	H_o	H_e	N_{pr}	A_r	F_{IS}	HWEP	N	H_o	H_e	N_{pr}	A_r	F_{IS}	HWEP	N	H_o	H_e	N_{pr}	A_r	F_{IS}	HWEP
Tth1	8	0,440	0,441	1	7,51	0,002	NS	7	0,547	0,569	0	6,38	0,039	NS	7	0,236	0,293	0	6,60	0,196	NS	7	0,488	0,530	0	6,48	0,080	NS
Tth2	3	0,280	0,282	0	3,00	0,008	NS	4	0,221	0,213	1	3,50	-0,037	NS	3	0,111	0,107	0	2,98	-0,036	NS	3	0,261	0,236	0	3,00	-0,106	NS
Tth3	5	0,950	0,654	0	4,73	$-0,454^{x}$	*	5	0,947	0,641	0	4,88	$-0,480^{x}$	*	6	0,945	0,628	1	5,87	$-0,512^{x}$	*	5	0,976	0,709	0	5,00	$-0,378^{x}$	*
Tth5	3	0,110	0,104	0	2,47	-0,048	NS	3	0,115	0,111	0	2,87	-0,043	NS	1	/	/	/	/	/	/	3	0,083	0,080	/	2,56	-0,032	NS
Tth11	4	0,616	0,569	1	3,48	-0,082	NS	4	0,652	0,569	1	3,50	-0,147	NS	3	0,818	0,576	0	3,00	$-0,424^{x}$	*	4	0,785	0,622	1	3,81	$-0,265^{x}$	NS
Tth12	5	0,710	0,714	0	4,99	0,006	*	5	0,715	0,682	0	4,99	-0,049	*	5	0,781	0,655	1	4,87	-0,194	*	6	0,630	0,603	2	5,14	-0,046	NS
Tth13	18	0,533	0,871	1	15,56	$0,389^{+}$	*	18	0,717	0,909	1	16,52	$0,212^{+}$	*	13	0,875	0,840	1	13,0	-0,042	NS	15	0,786	0,860	3	14,53	0,086	*
Tth15	2	0,110	0,104	0	1,99	-0,053	NS	4	0,157	0,176	2	3,47	0,107	NS	2	0,072	0,070	0	2,00	-0,029	NS	3	0,059	0,125	1	2,98	$0,526^{+}$	*
Tth18	10	0,744	0,772	0	8,94	0,035	NS	10	0,768	0,741	0	9,01	-0,037	NS	9	0,796	0,782	0	8,76	-0,018	*	9	0,761	0,738	0	8,07	-0,032	NS
Tth19	3	0,300	0,325	0	2,73	0,078	NS	3	0,336	0,387	0	2,88	0,131	NS	2	0,327	0,276	0	2,00	-0,187	NS	3	0,369	0,331	1	2,92	-0,114	NS
Tth22	6	0,434	0,419	0	5,33	-0,035	NS	7	0,578	0,505	1	5,98	-0,146	NS	4	0,647	0,492	0	4,00	-0,319	NS	6	0,535	0,470	2	5,29	-0,140	NS
Tth23	4	0,535	0,554	0	3,98	0,034	NS	5	0,673	0,541	1	4,23	-0,245	NS	4	0,784	0,541	0	3,99	$-0,456^{x}$	*	5	0,674	0,563	1	4,54	-0,199	NS
Tth25	6	0,660	0,735	1	5,46	0,104	NS	6	0,831	0,739	1	5,44	-0,125	NS	4	0,854	0,672	0	4,00	-0,274	*	5	0,833	0,739	1	5,00	-0,128	NS
$\bar{x} \pm$ SD	5,92 ± 4,25	0,49 ± 0,25	0,50 ± 0,25	0,30 ± 0,48	5,41 ± 3,69	0,019 ± 0,18		6,23 ± 4,02	0,55 ± 0,26	0,52 ± 0,24	0,61 ± 0,65	5,67 ± 3,68	-0,070 ± 0,17		4,85 ± 3,29	0,60 ± 0,32	0,49 ± 0,25	0,25 ± 0,45	4,77 ± 3.23	-0,224 ± 0,21		5,69 ± 3,33	0,55 ± 0,29	0,50 ± 0,24	1.00 ± 0,95	5,33 ± 2,95	-0,097 ± 0,12	

N = ukupan broj alela po lokusu; H_o = uočena heterozigotnost; H_e = očekivana heterozigotnost; N_{pr}= broj privatnih alela po lokusu; A_r = alelno bogastvo; F_{IS} = fiksacijski indeks; HWEP = rezultati testiranja Hardy Weinbergove ravnoteže; NS = non-significant (nije statistički značajno); $\bar{x}$ = srednja vrijednost; $p < 0,001$ vrijednost statističke značajnosti nakon Bonferronijeve korekcije; $^{+/x}$: p = vrijednost za F_{IS} unutar uzoraka (temeljeno na 1040 randomizacija i indikativnoj prilagođenoj nominalnoj vrijednosti (5%) od 0,00096); $^{+}$ = udio randomizacija koje su pokazale viši F_{IS} od uočenog; ^{x} = udio randomizacija koje su pokazale niži F_{IS} od uočenog; *lokusi u kurzivu se nalaze u kodirajućoj regiji genoma*, a podcrtani u UTR regiji

Broj, dužine i frekvencije alela za novorazvijene mikrosatelitne lokuse su prikazani u Tablici 9 i na Slici 7.

Tablica 9. Prikaz broja, dužine i frekvencije alela za novorazvijene mikrosatelitne lokuse za atlantsku plavoperajnu tunu *T. thynnus* iz dva uzastopna uzgojna ciklusa na uzgajalištu u blizini južne obale otoka Brača u Jadranskom moru. Svjetlo siva polja obilježavaju frekvencije privatnih alela između uzgojne i divlje populacije istog uzgojnog ciklusa

Lokus	Ukupni broj alela na lokusu	Dužina alela	Frekvencija alela u prvom uzgojnom ciklusu		Frekvencija alela drugom uzgojnom ciklusu	
			D1	U1	D2	U2
Tth1	8	110	0,04000	0,03684	0,00909	0,03571
		114	0,04500	0,10526	0,01818	0,09524
		118	0,74000	0,63158	0,83636	0,66667
		122	0,08500	0,12105	0,09091	0,11905
		126	0,04500	0,08421	0,02727	0,05952
		130	0,02000	0,01579	0,00909	0,01786
		134	0,01000	0,00526	0,00909	0,00595
		138	0,01500	0,00000	0,00000	0,00000
Tth2	4	164	0,06000	0,05789	0,03636	0,08333
		168	0,84000	0,88421	0,92727	0,86905
		172	0,10000	0,05263	0,01818	0,04762
		176	0,00000	0,00526	0,00000	0,00000
Tth3	6	98	0,01000	0,01579	0,04545	0,06548
		102	0,48500	0,50000	0,48182	0,45238
		106	0,10000	0,08421	0,04545	0,16667
		110	0,30500	0,31053	0,37273	0,22024
		114	0,10000	0,08947	0,04545	0,09524
		118	0,00000	0,00000	0,00909	0,00000

Tth5	3	215	0,00500	0,01579	0,00000	0,00595
		220	0,94500	0,94211	1.00000	0,95833
		225	0,05000	0,04211	0,00000	0,03571
Tth11	5	170	0,00500	0,00000	0,00000	0,00000
		172	0,07000	0,07895	0,08182	0,13690
		174	0,48000	0,52105	0,45455	0,44048
		176	0,43500	0,39474	0,46364	0,41071
		178	0,00000	0,00526	0,00000	0,01190
Tth12	7	141	0,04000	0,03684	0,00909	0,00000
		143	0,25000	0,30000	0,16364	0,22024
		145	0,43000	0,45263	0,52727	0,57738
		147	0,16000	0,14211	0,13636	0,08929
		149	0,12000	0,06842	0,16364	0,10119
		151	0,00000	0,00000	0,00000	0,00595
		153	0,00000	0,00000	0,00000	0,00595
Tth13	19	200	0,00500	0,00000	0,00000	0,00000
		202	0,00000	0,01053	0,00000	0,00000
		204	0,01000	0,03684	0,00000	0,02381
		206	0,23500	0,17895	0,12727	0,15476
		208	0,06000	0,07895	0,20000	0,14881
		210	0,17000	0,11579	0,24545	0,23810
		212	0,05500	0,11579	0,06364	0,03571
		214	0,06500	0,07368	0,04545	0,03571
		216	0,05500	0,05263	0,04545	0,02976
		218	0,00500	0,01053	0,00000	0,01190
		220	0,02500	0,01053	0,00000	0,01786
		222	0,01000	0,00526	0,00909	0,01190

		224	0,03000	0,03684	0,00909	0,02976
		226	0,05000	0,05789	0,03636	0,02976
		228	0,06500	0,07368	0,02727	0,04167
		230	0,03500	0,05263	0,02727	0,07143
		232	0,01500	0,02632	0,01818	0,01190
		234	0,00500	0,02105	0,01818	0,00000
		236	0,00500	0,01053	0,00000	0,00000
Tth15	4	122	0,00000	0,02632	0,00000	0,03571
		125	0,94500	0,90526	0,96364	0,93452
		128	0,05500	0,06316	0,03636	0,02976
		134	0,00000	0,00526	0,00000	0,00000
Tth18	10	233	0,03500	0,03684	0,00909	0,02381
		236	0,10000	0,10000	0,18182	0,11905
		239	0,12500	0,10000	0,17273	0,10714
		242	0,40000	0,45263	0,36364	0,44643
		245	0,16500	0,15789	0,10909	0,17857
		248	0,08000	0,10526	0,09091	0,08929
		251	0,03000	0,01053	0,02727	0,02381
		254	0,03500	0,01579	0,01818	0,00595
		257	0,00500	0,00526	0,00000	0,00000
		260	0,00500	0,01579	0,00909	0,00595
Tth19	3	184	0,01000	0,01579	0,00000	0,01786
		190	0,80000	0,74737	0,83636	0,79762
		193	0,19000	0,23684	0,16364	0,18452
Tth22	7	255	0,01000	0,00526	0,00000	0,00595
		258	0,01500	0,03158	0,02727	0,02976
		261	0,73500	0,66842	0,61818	0,68452

		264	0,16500	0,21579	0,23636	0,25000
		267	0,05500	0,04211	0,04545	0,01786
		270	0,01000	0,03158	0,00000	0,01190
		273	0,00000	0,00526	0,00000	0,00000
Tth23	5	268	0,03000	0,01053	0,01818	0,04167
		270	0,35000	0,45263	0,37273	0,39881
		272	0,56000	0,50526	0,50909	0,51786
		274	0,05000	0,02632	0,02727	0,02381
		276	0,00000	0,00526	0,00000	0,00595
Tth25	7	147	0,34000	0,33158	0,39091	0,32143
		150	0,21000	0,25263	0,15455	0,22619
		153	0,10500	0,11053	0,06364	0,09524
		156	0,31000	0,27895	0,39091	0,31548
		159	0,03000	0,02105	0,00000	0,04167
		162	0,00000	0,00526	0,00000	0,00000
		165	0,00500	0,00000	0,00000	0,00000

Na lokusu Tth1, na kojem je utvrđeno osam različitih alela, alel dužine 118 pb je prevladavao u odnosu na ostale alele u svim populacijama, dok je alel dužine 138 pb zabilježen samo u D1 populaciji.

Na lokusu Tth2, na kojem su utvrđena četiri različita alela, alel dužine 168 pb je prevladavao u odnosu na ostale alele u svim populacijama, dok je alel dužine 176 pb zabilježen samo u U1 populaciji.

Na lokusu Tth3, na kojem je utvrđeno šest različitih alela, alel dužine 102 pb je prevladavao u odnosu na ostale alele u svim populacijama, dok je alel dužine 118 pb zabilježen samo u D2 populaciji.

Na lokusu Tth5, na kojem su utvrđena tri različita alela, alel dužine 220 pb je prevladavao u odnosu na ostale alele u svim populacijama. U D2 populaciji zabilježen je samo jedan alel dužine 220 pb.

Na lokusu Tth11, na kojem je utvrđeno pet različitih alela, aleli dužine 174 i 176 pb su prevladavali u odnosu na ostale alele u svim populacijama, dok je alel dužine 170 pb zabilježen samo u D1 populaciji, a alel dužine 178 pb samo u uzgojnim populacijama.

Na lokusu Tth12, na kojem je utvrđeno sedam različitih alela, alel dužine 145 pb je prevladavao u odnosu na ostale alele u svim populacijama. Aleli od 151 i 153 pb su zabilježeni samo u U2 populaciji.

Na lokusu Tth13, na kojem je utvrđen najveći broj različitih alela, aleli dužine 206 i 210 pb su prevladavali u odnosu na ostale alele u svim populacijama. Alel dužine 200 pb je zabilježen samo u D1 populaciji, dok je alel dužine 202 pb zabilježen samo u U1 populaciji. U D2 populaciji nisu zabilježeni aleli od 200, 202, 204, 218, 220 i 236 pb.

Na lokusu Tth15, na kojem su utvrđena četiri različita alela, alel dužine 125 pb je prevladavao u odnosu na ostale alele u svim populacijama, dok je alel dužine 122 pb zabilježen samo u uzgojnim populacijama. Alel dužine 134 pb je zabilježen samo u U1 populaciji.

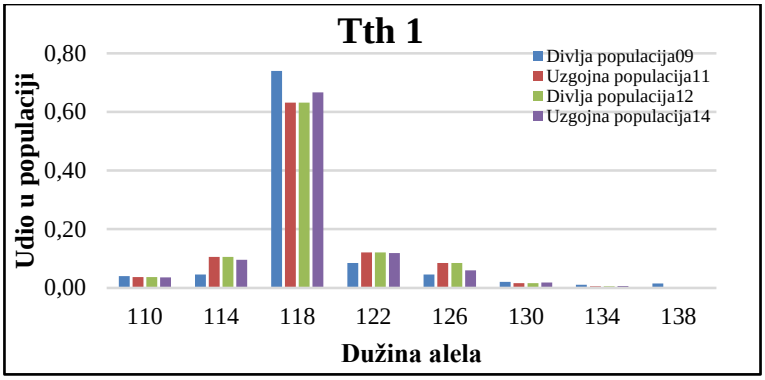
Na lokusu Tth18, na kojem je utvrđeno 10 različitih alela, alel dužine 242 pb je prevladavao u odnosu na ostale alele u u svim populacijama. Alel dužine 257 pb nije zabilježen u drugom ciklusu uzgoja.

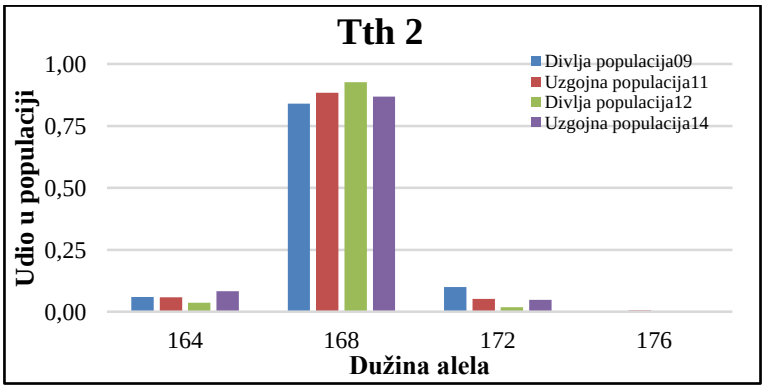
Na lokusu Tth19, na kojem su utvrđena tri različita alela, alel dužine 190 pb je prevladavao u odnosu na ostale alele u svim populacijama, dok alel 184 pb nije zabilježen u D2 populaciji.

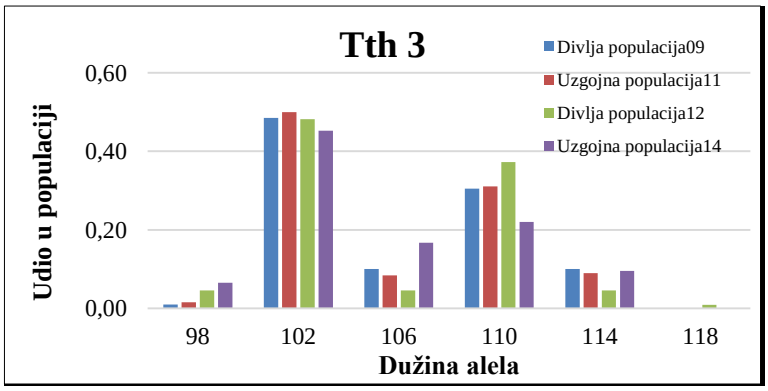
Na lokusu Tth22, na kojem je utvrđeno sedam različitih alela, alel dužine 261 pb je prevladavao u odnosu na ostale alele u svim populacijama. Alel dužine 273 pb se pojavio samo u U1 populaciji, dok aleli od 255 i 270 pb nisu zabilježeni u D2 populaciji.

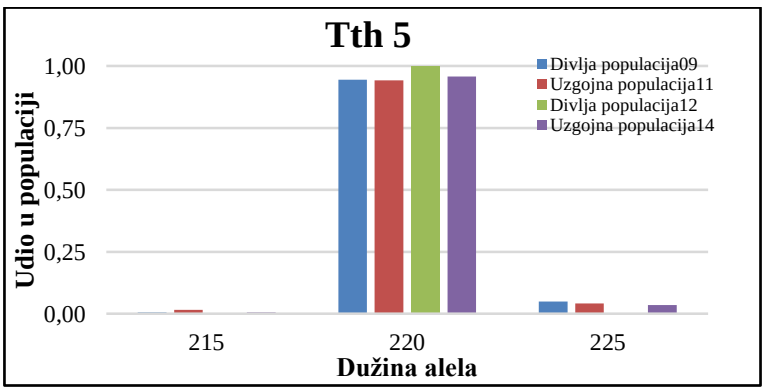
Na lokusu Tth23, na kojem je utvrđeno pet različitih alela, aleli od 270 i 272 pb su prevladavali u odnosu na ostale alele u svim populacijama, dok je alel dužine 276 pb zabilježen samo u uzgojnim populacijama.

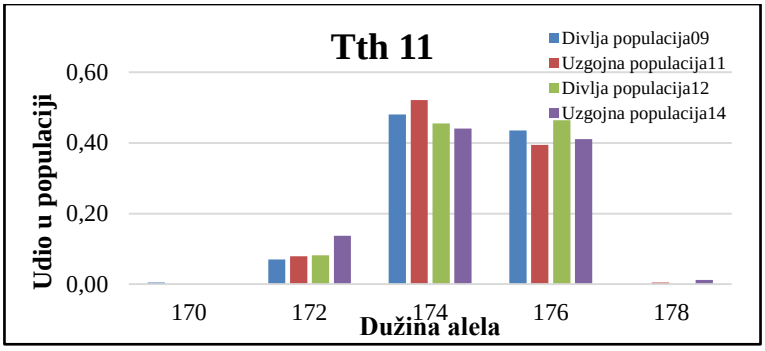
Na lokusu Tth25, na kojem je utvrđeno sedam različitih alela, aleli od 147 i 156 pb su prevladavali u odnosu na ostale alele u svim populacijama. Alel dužine 162 pb je zabilježen samo u U1 populaciji, dok je alel dužine 165 pb zabilježen samo u D1 populaciji. U D2 populaciji nije zabilježen alel dužine 159 pb (Slika 7).

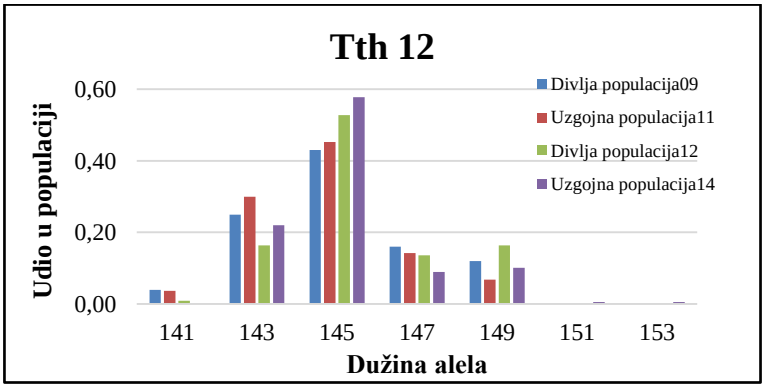

Tth 1
Udio u populaciji
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
110
114
118
122
126
130
134
138
Dužina alela
Divlja populacija09
Uzgojna populacija11
Divlja populacija12
Uzgojna populacija14

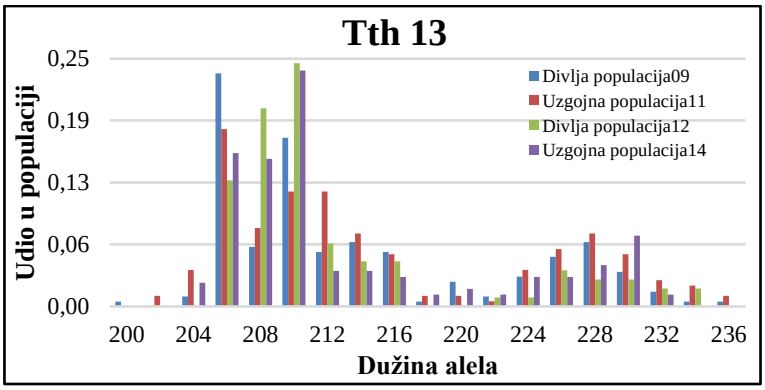

Tth 2
Udio u populaciji
1,00
0,75
0,50
0,25
0,00
164
168
172
176
Dužina alela
Divlja populacija09
Uzgojna populacija11
Divlja populacija12
Uzgojna populacija14

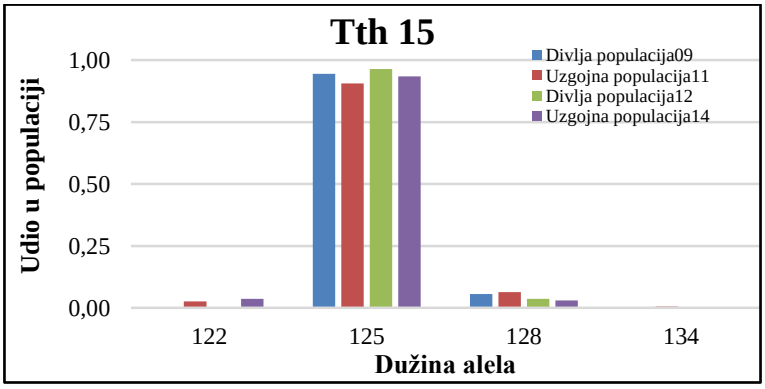

Tth 3
Udio u populaciji
0,60
0,40
0,20
0,00
98
102
106
110
114
118
Dužina alela
Divlja populacija09
Uzgojna populacija11
Divlja populacija12
Uzgojna populacija14

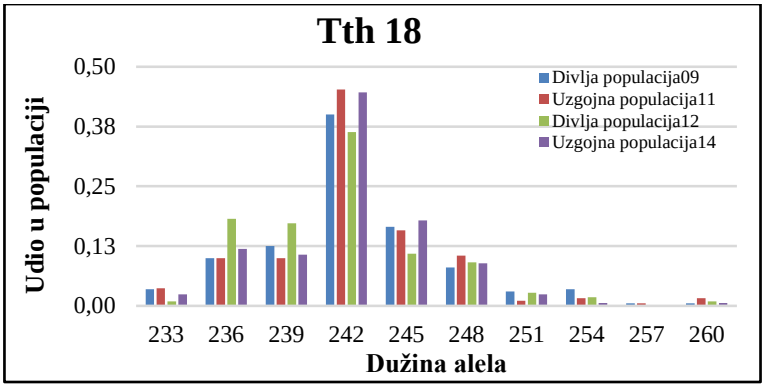

Tth 5
Udio u populaciji
1,00
0,75
0,50
0,25
0,00
215
220
225
Dužina alela
Divlja populacija09
Uzgojna populacija11
Divlja populacija12
Uzgojna populacija14

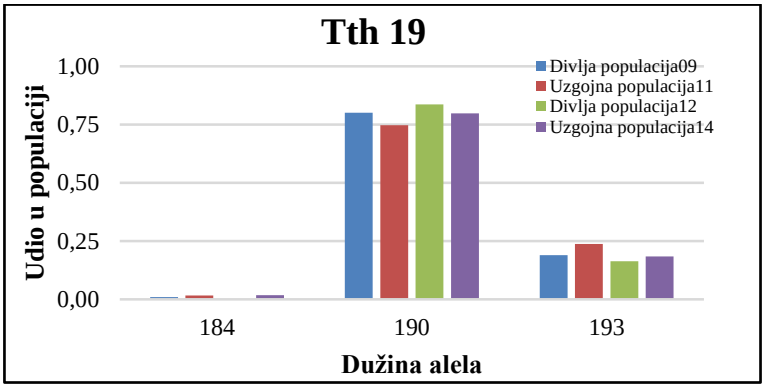

Tth 11
Udio u populaciji
0,60
0,40
0,20
0,00
170
172
174
176
178
Dužina alela
Divlja populacija09
Uzgojna populacija11
Divlja populacija12
Uzgojna populacija14

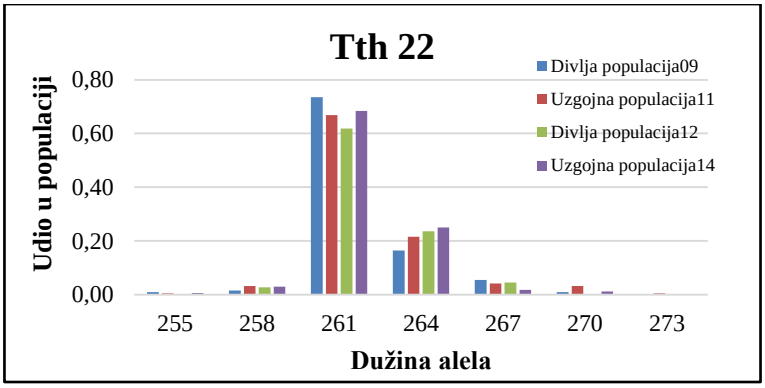

Tth 12
Udio u populaciji
0,60
0,40
0,20
0,00
141
143
145
147
149
151
153
Dužina alela
Divlja populacija09
Uzgojna populacija11
Divlja populacija12
Uzgojna populacija14

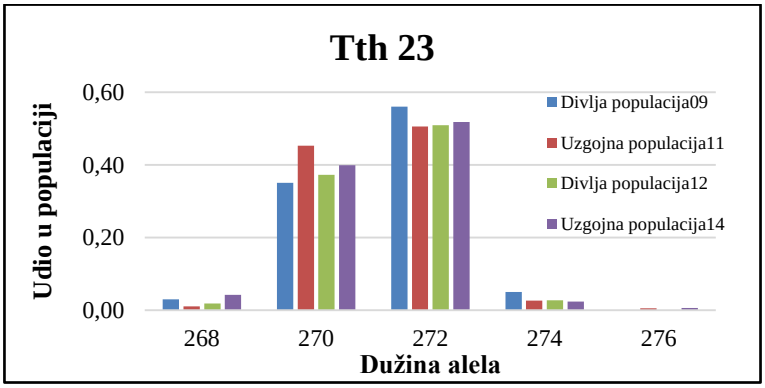

Tth 13
Udio u populaciji
0,25
0,19
0,13
0,06
0,00
200
204
208
212
216
220
224
228
232
236
Dužina alela
Divlja populacija09
Uzgojna populacija11
Divlja populacija12
Uzgojna populacija14

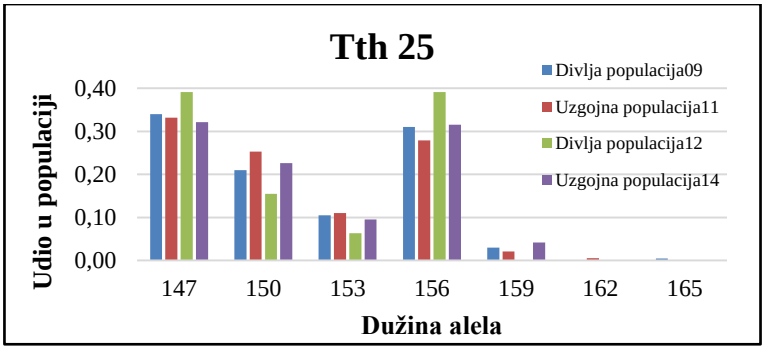

Tth 15
Udio u populaciji
1,00
0,75
0,50
0,25
0,00
122
125
128
134
Dužina alela
Divlja populacija09
Uzgojna populacija11
Divlja populacija12
Uzgojna populacija14


Tth 18
Udio u populaciji
0,50
0,38
0,25
0,13
0,00
233 236 239 242 245 248 251 254 257 260
Dužina alela
Divlja populacija09
Uzgojna populacija11
Divlja populacija12
Uzgojna populacija14


Tth 19
Udio u populaciji
1,00
0,75
0,50
0,25
0,00
184 190 193
Dužina alela
Divlja populacija09
Uzgojna populacija11
Divlja populacija12
Uzgojna populacija14


Tth 22
Udio u populaciji
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
255 258 261 264 267 270 273
Dužina alela
Divlja populacija09
Uzgojna populacija11
Divlja populacija12
Uzgojna populacija14


Tth 23
Udio u populaciji
0,60
0,40
0,20
0,00
268 270 272 274 276
Dužina alela
Divlja populacija09
Uzgojna populacija11
Divlja populacija12
Uzgojna populacija14



Slika 7. Histogrami alelnih distribucija i učestalosti mikrosatelitnih lokusa atlantske plavoperajne tune *T. thynnus* iz dva uzgojna ciklusa na uzgajalištu u blizini južne obale otoka Brača u Jadranskom moru.

4.3.2. Genetička udaljenost između populacija i grupa

Ukupna F_{ST} vrijednost (F_{ST} = 0,005) između svih uzorkovanih populacija je bila niska, ali statistički značajna ($p < 0,05$). Testom usporedbe genetičke diferencijacije između populacija u prvom uzgojnom ciklusu nije zabilježena statistička značajnost ($p > 0,05$), dok je između populacija u drugom uzgojnom ciklusu ona zabilježena ($p < 0,05$) (Tablica 10).

Tablica 10. Vrijednosti F_{ST} parametara između populacija iz dva uzgojna ciklusa atlantske plavoperajne tune *T. thynnus* na uzgajalištu u blizini južne obale otoka Brača u Jadranskom moru

Populacija	D1	U1	D2	U2
U1	0,00097	-		
D2	0,00344	0,00945	-	
U2	0,00238	0,00115	0,00603	-

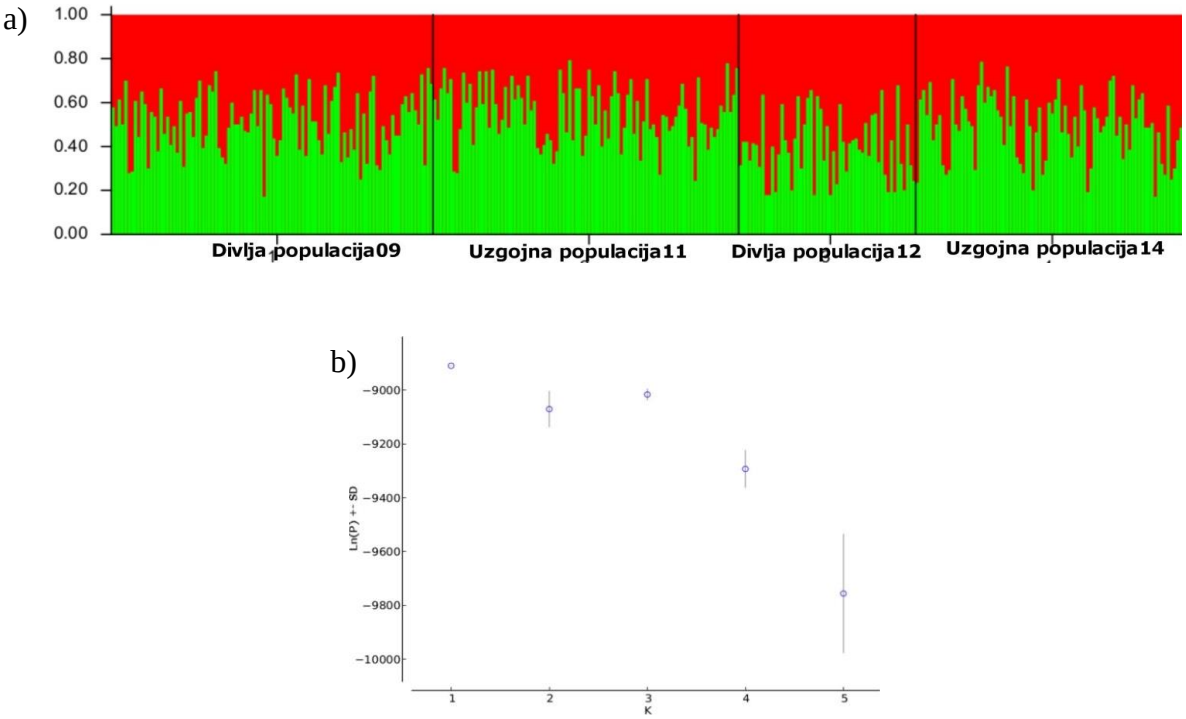
Značajne vrijednosti (nakon provođenja Bonferronijeve korencije) su podcrtane

Rezultati analize molekularne varijance (AMOVA) su prikazani u Tablici 11 iz koje je vidljivo da se većina genetičke varijacije pripisuje razlikama unutar populacija (99,45%), a samo 0,25% otpada na razlike između dvije grupe, tj. dva uzgojna ciklusa.

Tablica 11. Rezultati analize molekularne varijance (AMOVA) prikazuju razdiobu genetičke varijacije između i unutar divljih i uzgojnih populacija atlantskih plavoperajnih tuna iz dva uzgojna ciklusa na uzgajalištu u blizini južne obale otoka Brača u Jadranskom moru

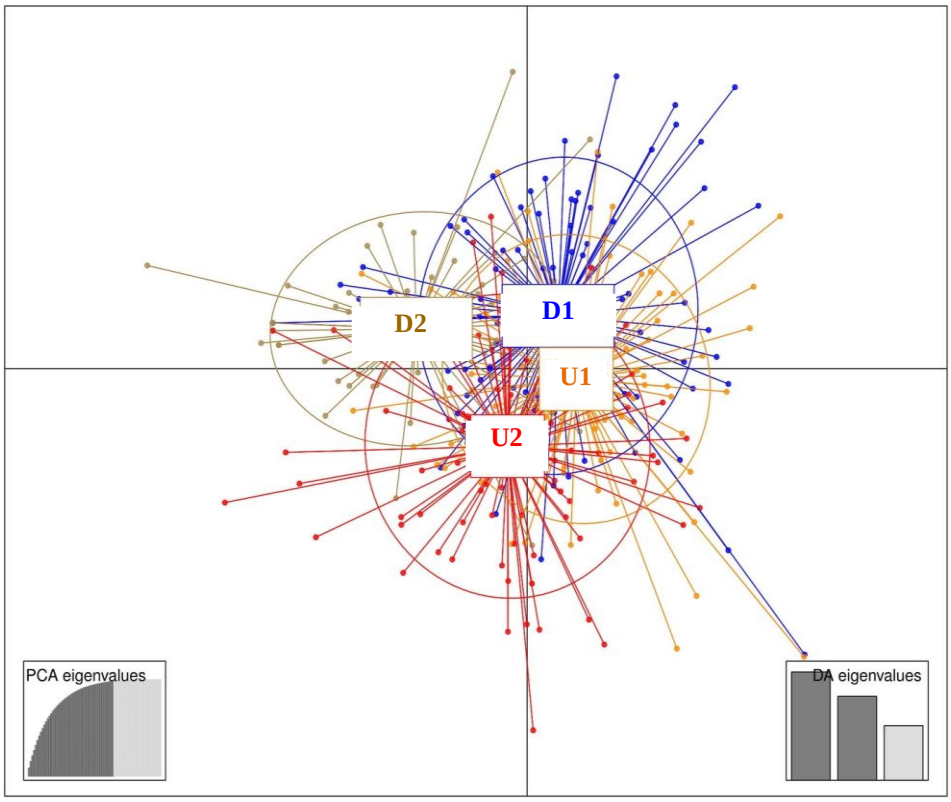
Izvor varijacije	% varijacije	Fiksacijski indeks	p vrijednost
između grupa	0,25	F_{CT}=0,00255	0,121
između populacija unutar grupa	0,29	F_{SC}=0,00292	0,002
unutar populacija	99,45	F_{ST}=0,00546	0,000

Većina jedinki nije pokazala jasnu pripadnost pojedinačnim populacijama što ukazuje na nedostatak genetičke strukturiranosti unutar i između populacija iz dva uzastopna ciklusa uzgoja (Slika 8), a sličan rezultat je dobiven i DAPC analizom podataka (Slika 9).



Slika 8. Grafički prikaz rezulatata STRUCTURE analize uzoraka *T. thynnus* iz dva uzgojna ciklusa na uzgajalištu u blizini južne obale otoka Brača u Jadranskom moru.

a) Dijagram prikazan za vrijednost K = 2. Svaka boja (crvena, zelena) predstavlja jedan klaster, a dužina obojenih vertikalnih linija predstavlja udio pripadnosti jedinki određenom klasteru (skala na osi y); b) Dijagram posteriorne vjerojatnosti pripadanja podataka za svaku K vrijednost.



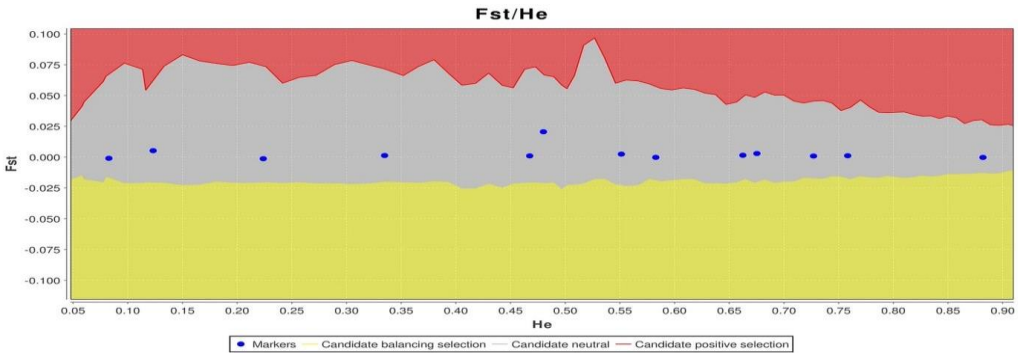
Slika 9. Grafički prikaz prve dvije glavne komponente DAPC analize populacijske strukture atlantske plavoperajne tune *T. thynnus* iz dva uzgojna ciklusa na uzgajalištu u blizini južne obale otoka Brača u Jadranskom moru temeljene na 13 EST-SSR lokusa. Oznake D1, D2, U1, U2 su skraćeni nazivi za uzorkovane populacije (D1; divlja populacija2009, D2; divlja populacija2012, U1; uzgojna populacija2011, U2; uzgojna populacija2014).

Analizom podataka pomoću programa BayeScan 2.1 i LOSITAN nisu zabilježeni dokazi o djelovanju pozitivne ili balansirane selekcije na ni jednom od 13 novorazvijenih mikrosatelitnih lokusa, što upućuje na njihovu neutralnost, tj. nepostojanje lokusa koji pokazuju atipične vrijednosti parametra F_{ST} („outlier“ lokusi) (Tablica 12; Slika 10).

Tablica 12. Prikaz rezultata testa za detekciju mikrosatelitnih lokusa pod selekcijom za atlantsku plavoperajnu tunu *T. thynnus* iz dva uzgojna ciklusa na uzgajalištu u blizini južne obale otoka Brača u Jadranskom moru

Lokus	prob	Log10(PO)	qval	alpha	Fst
Tth1	0,061	-1,187	0,814	-0,004	0,009
Tth2	0,084	-1,035	0,781	-0,029	0,009
Tth3	0,090	-1,004	0,725	-0,055	0,009
Tth5	0,089	-1,007	0,748	-0,026	0,009
Tth11	0,086	-1,025	0,766	-0,000	0,010
Tth12	0,081	-1,052	0,804	-0,025	0,009
Tth13	0,948	1,264	0,051	-1,552	0,002
Tth15	0,118	-0,873	0,489	0,082	0,011
Tth18	0,466	-0,058	0,292	-0,664	0,006
Tth19	0,095	-0,976	0,694	-0,030	0,009
Tth22	0,101	-0,948	0,652	-0,078	0,009
Tth23	0,084	-1.036	0,793	-0,039	0,009
Tth25	0,105	-0,930	0,590	-0,071	0,009

prob = posteriorna vjerojatnost modela uključujući selekciju; log10(PO) = posteriorni omjer [log10(PO)]; qval: FDR analog p-vrijednosti; alpha = lokus specifična komponenta koja pokazuje snagu i smjer selekcije (pozitivna vrijednost; pozitivna selekcija; negativna vrijednost; balansirana selekcija); Fst = Fst koeficijent prosječan za sve populacije



Slika 10. Grafički prikaz testa na selektivnu neutralnost 13 mikrosatelitnih lokusa atlantske plavoperajne tune *T. thynnus* iz dva uzgojna ciklusa na uzgajalištu u blizini južne obale otoka Brača u Jadranskom moru, dobijen korištenjem programa LOSITAN. Svaka točka predstavlja određeni lokus. Sivo područje označava selektivno neutralnu regiju, žuto područje regiju djelovanja balansirane selekcije, a crveno područje regiju djelovanja pozitivne selekcije.

5. RASPRAVA

Tijekom posljednjih desetljeća napredak u području genomike i bioinformatike omogućio je nove i točnije uvide u strukturu i dinamiku populacija, neophodne za očuvanje biološke raznolikosti. Genetički biljezi su se pokazali kao snažan alat za istraživanja različitih rodova i vrsta riba, a najčešće korišteni su mtDNA, mikrosateliti i SNP za procjenu strukture populacija, opisivanje genetičkih razlika između uzoraka iz različitih područja, otkrivanje genetičkih obilježja migratornih vrsta, proučavanje genetičke raznolikosti u divljim i uzgojnim vrstama te prikupljanje informacija neophodnih za pravilno upravljanje programom uzgoja i ulova komercijalno važnih vrsta (Amaral i sur., 2017; Antoniou i sur., 2017; Carlsson i sur., 2007; Chistiakov i sur., 2006; Cuéllar-Pinzón i dr., 2016; Davies i sur., 2011; Pan i Yang, 2010; Pujolar i sur., 2003; Riccioni i sur., 2010b; Vella i sur., 2016; Ward 1995).

U ovom istraživanju razvijeno je i korišteno 13 EST-SSR biljega dobivenih iz transkriptoma atlantske plavoperajne tune (Trumbić, 2015) kako bi se istražilo eventualno postojanje određenog genotipa kod novoulovljenih juvenilnih jedinki tune, koji bi mogao pozitivno utjecati na imunološki sustav, te im dao veće mogućnosti za preživljavanje tijekom uzgojnog ciklusa. Mikrosatelitni biljezi su odabrani temeljem opisa genskih funkcija i njihovog položaja u blizini kodirajućih regija gena povezanih s različitim sastavnicama imunološkog sustava i staničnog sustava aktivnog transporta, katalize, prijenosa signala i komunikacije između stanica, neophodnih za preživljavanje. Većina istraženih lokusa je bila polimorfna, osim lokusa Tth5 koji je bio monomorfan, ali samo kod D2 populacije, dok je bio polimorfan kod ostalih populacija. Stoga taj lokus prilikom statističke analize podataka drugog uzgojnog ciklusa nije uzet u obzir budući da nije bio informativan. Kod većine testiranih EST-SSR biljega zabilježena je umjerena razina genetičke raznolikosti, vidljiva iz broja alela po lokusima (2-18 alela po lokusu). Iako je očekivana suprotna situacija, u oba uzgojna ciklusa u divljim populacijama zabilježen je neznatno niži srednji broj alela po lokusu u usporedbi s uzgojnim populacijama. Te uočene sličnosti i niska stopa gubitka alela između populacija, zajedno s neutralnim rezultatima LOSITAN i BayeScan analiza ukazuju na činjenicu da distribucija alela na ovim lokusima očito ne utječe na stopu preživljavanja divljih juvenilnih tuna tijekom uzgojnog ciklusa.

Iako je vrijednost ukupnog srednjeg broja alela ($\bar{x}$) po lokusu u prvom uzgojnom ciklusu (6,46 ± 4,29) bila viša nego u drugom uzgojnom ciklusu (5,92 ± 3,27), obje vrijednosti, ukupna srednja vrijednost alela po lokusu u svim populacijama zajedno, te raspon alela po

lokusima (N_a) [N_a= 1-19; $\bar{x}$ = 6,77 ± 4,21] su bili niži od onih zabilježenih u drugim istraživanjima vrste *T. thynnus* [N_a= 2-20; $\bar{x}$ = 8,2] (Carlsson i sur., 2004), [N_a= 2-20; $\bar{x}$ = 9,13 ± 2,24] (Carlsson i sur., 2007), [N_a= 2-23] (Clark i sur., 2004), [N_a= 8-30] (Antoniou i sur., 2017), [N_a= 3-24; $\bar{x}$ = 9,15-10,53] (Vella i sur., 2016), ali i ostalih vrsta iz roda *Thunnus* poput *T. albacares* (Aguila i sur., 2015; Antoni i sur., 2014a; Clark i sur., 2004), *T. alalunga* (Clark i sur., 2004; Davies i sur., 2011; Montes i sur., 2012; Nikolić i sur., 2015), *T. obesus* (Clark i sur., 2004; Gonzales i sur., 2008), *T. atlanticus* (Antoni i sur., 2014b).

Parametar koji najbolje izražava razinu genetičke varijabilnosti je heterozigotnost koja se može promatrati kao očekivana (H_e) i uočena heterozigotnost (H_o) (Nei, 1975). Očekivana heterozigotnost se temelji na izračunu alelnih frekvencija uz pretpostavku da je populacija u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži (HWE), a uočena izravno iz analiziranih podataka, ali samo ako se koriste biljezi kodominantnog tipa (npr. mikrosateliti). U oba uzgojna ciklusa zabilježeni su slični rasponi i ukupne srednje vrijednosti očekivane i uočene heterozigotnosti između divljih i uzgojnih populacija, ali su isti bili niži u odnosu na one zabilježene u drugim istraživanjima vrste *T. thynnus*, ali i ostalih vrsta iz roda *Thunnus* (Aguila i sur., 2015; Davies i sur., 2011; Gonzalez i sur., 2008; Montes i sur., 2012; Nikolić i sur., 2015). Kada su sve četiri populacije analizirane kao jedna grupa i dalje su te vrijednosti bile niže [H_o (0,08-0,95; $\bar{x}$ = 0,53 ± 0,27); H_e (0,08-0,88; $\bar{x}$ = 0,50 ± 0,25)] od onih zabilježenih u drugim istraživanjima vrste *T. thynnus* [H_o (0,74 - 0,81; H_e (0,71-0,79)] (Antoniuou i sur., 2017), [H_o (0,22-0,92); H_e (0,32-0,93)] (Carlsson i sur., 2004), [H_o (0,35 - 0,92; $\bar{x}$ = 0,66 ± 0,03); H_e (0,43-0,88; $\bar{x}$ = 0,66 ± 0,03)] (Carlsson i sur., 2007), [H_o (0,06-0,96); H_e (0,23-0,93)] (Clark i sur., 2004), [H_o (0,19-0,93; $\bar{x}$ = 0,70-0,73); H_e (0,20-0,93; $\bar{x}$ = 0,71-0,74)] (Vella i sur., 2016), ali i ostalih vrsta iz roda *Thunnus* poput *T. albacares* [H_o (0,18-0,86; $\bar{x}$ = 0,56-0,59); H_e (0,34-0,86; $\bar{x}$ = 0,63-0,66)] (Aguila i sur., 2015), *T. alalunga* [H_o (0,43-1,00; $\bar{x}$ = 0,79); H_e (0,41-0,94; $\bar{x}$ = 0,79)] (Davies i sur., 2011), *T. obesus* [H_o (0,60-1,00; $\bar{x}$ = 0,742); H_e (0,63-0,96; $\bar{x}$ = 0,90)] (Gonzalez i sur., 2008). To je u skladu sa zapažanjima da su kod većine mikrosatelitskih lokusa povezanih ili u blizini kodirajućih regija, koje su očuvanije jer se prepisuju u protein, zabilježene niže razine varijabilnosti u usporedbi s nekodirajućim i UTR regijama (Borstnik i Pumpernik, 2002; Li i sur., 2004; Metzgar i sur., 2000). Sukladno tome, kod lokusa koji su se nalazili unutar UTR regija (Tth3, Tth11, Tth12, Tth13, Tth18, Tth19 i Tth23) zabilježena je veća varijabilnost (u prosjeku su imali više alela po lokusu: 7,8) u usporedbi s onima koji su se nalazili unutar kodirajuće regije (Tth1, Tth2, Tth5, Tth15, Tth22 i Tth25) te imali u prosjeku 5,5 alela po lokusu (Tablica 8, Prilog B).

Lokusi Tth3 i Tth12 su se nalazili u 5’ UTR regiji te imali di- i tetra-nukleotidne motive, a lokusi Tth11, Tth13, Tth18, Tth19 i Tth23 u 3’ UTR regiji, te imali di- i tri-nukleotidne motive. U kodirajućim regijama zabilježeno je najviše tri-nukleotidnih motiva (Tth15, Tth22 i Tth25) što je karakteristično za tu regiju, te još tetra- (Tth1 i Tth2) i penta-nukleotidni motivi (Tth5), koji nisu uobičajeni za tu regiju, ali zbog svoje duljine imaju nižu stopu mutacija pa se mogu pojaviti i u kodirajućim regijama (Akemi Hoshino i sur., 2012; Dammannogoda i sur., 2012; Tóth i sur., 2000).

Alelno bogatstvo predstavlja procjenu prosječnog broja alela neovisnu o veličini uzorka svođenjem svih uzoraka na veličinu najmanjeg uzorka. U oba uzgojna ciklusa ukupne srednje vrijednosti alelnog bogatstva između populacija su se neznatno razlikovale što je u skladu sa zabilježenim sličnim vrijednostima između populacija *T. thynnus* u Sredozemnom moru [Ar= 5,40; 5,32; 5,20] (Vella i sur., 2016), [Ar= 5,37; 5,49; 5,34; 5,54; 5,63; 5,33; 5,55] (Carlsson i sur., 2004), [Ar= 8,7; 9,3; 10,0; 9,4; 9,2; 8,5; 9,5; 8,5] (Riccioni i sur., 2010b). Iako je bilo očekivano suprotno, u uzgojnim populacijama zabilježena je veća vrijednost alelnog bogatstva u usporedbi s divljim populacijama. Međutim, takav rezultat je mogao biti posljedica metodoloških pogrešaka prilikom dizajna istraživanja i uzorkovanja budući da je još uvijek teško postići odgovarajući dizajn uzorkovanja za mnoge komercijalno važne vrste zbog manjka znanja o njihovih biološkim osobinama, ponašanju, te česte nemogućnosti prikupljanja dovoljnog broja uzoraka ili postojanja neravnoteže u broju uzoraka u uzorkovanim populacijama (Antoniou i sur., 2017; Foulley i Ollivier, 2006; Nikolić i sur., 2015; Riccioni i sur., 2017).

Privatni aleli su aleli koji se pojavljuju isključivo samo kod jedne populacije unutar nekog istraživanja koje obuhvaća više populacija, te su veoma informativni u populacijsko-genetičkim i evolucijskim istraživanjima (Neel i Cummings, 2003; Kalinowski, 2004; Petit i sur., 1998; Szpiech i sur., 2008). Iako je očekivano da će u divljim populacijama biti pronađeni aleli koji se neće pojaviti u uzgojnim u ovom istraživanju je zabilježena suprotna situacija; kod oba uzgojna ciklusa viša srednja vrijednost broja privatnih alela je zabilježena u uzgojnim populacijama u usporedbi s divljim populacijama. Ukupan broj privatnih alela bio je nešto viši u drugom uzgojnom ciklusu u kojem je zabilježen i najveći broj privatnih alela po lokusu (lokus Tth13 kod D2 populacije) u usporedbi s prvim uzgojnim ciklusom. Razlika broja privatnih alela između populacija i uzgojnih ciklusa može biti rezultat malog broja uzoraka ili neravnoteže u broju uzoraka u uzorkovanim populacijama, što je primijećeno kod D2 populacije kod koje je uzorkovan najmanji broj uzoraka u usporedbi s ostalim

populacijama, ali i strukturi uzoraka u populaciji ili situacije da jedinke s takvim alelima možda jednostavno nisu uzorkovane (Antoniou i sur., 2017; Vella i sur., 2016).

Vrijednost koeficijenta križanja u srodstvu (F_{IS}) je mjera za određivanje bliskog srodstva kod jedinki u populaciji temeljem povećanja udjela homozigotnih jedinki. Taj parametar predstavlja odnos između uočene i očekivane heterozigotnosti prema jednadžbi: $F_{IS} = (H_e-H_o)/H_e$, a njegove vrijednosti se kreću od -1 do +1; pozitivna označava manjak heterozigota, a negativna njen višak. Ako je rezultat nula ili se kreće neznatno oko te vrijednosti, znači da je populacija u ravnoteži, pa je u njoj prisutan proces panmiksije što je karakteristično za migratorne vrste koje se razmnožavaju na velikom području. Međutim, rezultat koji ima znatno veću vrijednost od nula upućuje na križanje u srodstvu koje može utjecati na ukupnu kakvoću gena u populaciji (Waples, 2015; Weir i Cocherham, 1984; Wright, 1949). Srednja vrijednost koeficijenta križanja u srodstvu (F_{IS}) je kod svih populacija u oba uzgojna ciklusa imala sličan raspon vrijednosti zabilježen prethodno kod *T. thynnus* u Sredozemnom moru (F_{IS}= -0,05 do 0,09) (Riccioni i sur., 2010), ukazujući na blago povećanje heterozigotnosti. Međutim, na dva lokusa (Tth13 i Tth15) zabilježen je viši broj homozigotnih genotipova, te F_{IS} vrijednost značajno veća od nule, što može biti rezultat pogrešaka pri genotipiziranju ili pojave nul alela na tim lokusima (Chaoui i sur., 2012). Na tim lokusima je program MICROCHEKER zaista ukazao na mogućnost postojanja nul alela, ali za konačnu odluku o njihovom uklanjanju iz analiza bi trebalo provesti ponovo uzorkovanje, ali ovog puta mnogo većeg broja jedinki koristeći iste metode uzorkovanja. Ukoliko bi rezultati ponovo ukazali na višak homozigotnosti na tim lokusima, iste treba isključiti iz analize (Chapuis i Estoup, 2007; Lemer i sur., 2011; Wagner i sur., 2006). Iako je to trenutno nemoguće, može se uzeti u obzir za planiranje budućih istraživanja, uz zamjenu ili uključivanje dodatnih novih lokusa, budući da pogreške prilikom genotipizacije nisu nužno problematične za genetičku diferencijaciju kada se koristi dovoljan broj dobro odabranih lokusa (Arthofer i sur., 2018; Carlsson, 2008; Pompanon i sur., 2005; Wang, 2018).

Kod nekoliko lokusa u ovom istraživanju je zabilježeno značajno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže. Slična odstupanja su zabilježena u mnogim drugim istraživanjima i mogu biti posljedica utjecaja selekcije na gene s kojima su lokusi povezni, mutacija, nepostojanja panmiksije, prisutnosti nul alela, Wahlundovog efekta i genotipskih pogrešaka (Adelyna i sur., 2016; Dewoody i sur., 2006; Luikart i sur., 2003; Morin i sur., 2009; Norris i sur., 1999; Selkoe i Toonen, 2006; Waples, 2015). U uzgojnim populacijma tune to može biti povezano s postojanjem jedinki iz više generacija unutar istog kaveza, zbog

česte prakse uzgajivača da prenose nedorasle ribe ispod minimalne veličine od 30 kg u idući uzgojni ciklus, tzv. „carry-over“ (ICCAT, 2017; NN 4/2017). Naime, budući da u Hrvatskoj uzgojni ciklus traje duže (18 do 36 mjeseci) u usporedbi s ostalim zemljama koje se bave uzgojem i tovom tuna u Sredozemnom moru (Mladineo i sur., 2008; Mylonas i sur., 2010; Ottolenghi, 2008), uzgajališta godišnje prebacuju i do 30.000 tona nedoraslih riba u slijedeći uzgojni ciklus, miješajući ribe iz nekoliko različitih generacija unutar istog kaveza, imajući tako nehotice utjecaj na rezultate analiza genetičke strukture.

Vrijednost fiksacijskog indeksa (F_{ST}), kao mjera protoka gena odnosno genetičke diferencijacije populacija, kreće se od 0 do 1 gdje vrijednost 0 ukazuje da istraživane populacije imaju podjednake frekvencije alela, odnosno da vjerojatno postoji njihova povezanost kroz parenje, dok vrijednost 1 označava različitost frekvencije alela i da populacije ne dijele istu zalihu gena (Wright, 1978). U ovom istraživanju ta vrijednost između divljih i uzgojnih populacija iz dva uzgojna ciklusa je iznosila 0,005 i bila značajno niža od prosjeka za morske ribe (0,062) (Ward, 2006), ukazujući na nizak stupanj diferencijacije. Takav rezultat međutim je i očekivan, obzirom da je ovo istraživanje usredotočeno na otkrivanje mogućih adaptivnih lokusa tijekom uzgojnog ciklusa. Niska F_{ST} vrijednost je zabilježena i u istraživanju Riccioni i sur. (2017) koji su kod uzoraka *T. thynnus* iz Sredozemnog mora korištenjem EST-SSR zabilježili deset puta nižu F_{ST} vrijednost od one zabilježene pomoću neutralnih mikrosatelita (Riccioni i sur., 2010b, 2013), a također, testom neutralnosti nisu pronašli utjecaj selekcije na testirane lokuse, tj. nije zabilježeno njihovo odstupanje od neutralnosti. Navedeni rezultati su u skladu sa zapažanjima u drugim istraživanjima da je samo mali postotak gena pod utjecajem selekcije, što je zabilježeno i u ovom istraživanju budući da niti na jednom lokusu nisu utvrđene atipične vrijednosti F_{ST} parametra („outlier“ lokusi) (Agostini i sur., 2013; Ellis i Burke, 2007; Kochmann i sur., 2012; Riccioni i sur., 2017). Antoniou i sur. (2017) su koristeći mikrosatelite (Clark i sur., 2004; McDowell i sur., 2002) i SNP biljege razvijene ddRAD-seq metodom (engl. Double-digest Restriction Associated DNA Sequencing), istraživali genetičku raznolikosti tuna iz Sredozemnog mora i obale Maroka u Atlantskom oceanu, i također zabilježili nisku F_{ST} vrijednost. Međutim to se može pripisati i biološkim osobitostima tune, kao što su razmnožavanje u otvorenom moru, migratorno ponašanje i velika brojnost populacija.

Mnoga provedena istraživanja značajno su doprinijela znanju o biologiji, navikama, te strukturi stokova atlantske plavoperajne tune unutar Atlantskog oceana i Sredozemnog mora, međutim postoji još mnogo nepoznanica koje će buduća istraživanja morati otkriti kako bi se postavio pravilan plan očuvanja ove vrste. Korištenje molekularnih metoda pokazalo se vrlo

dobrim alatom za dobivanje podataka važnih za pravilno očuvanje i upravljanje ribljim fondom. Stoga se u istraživanjima sve češće koriste mikrosatelitni biljezi koji potječu iz kodirajućih regija u genomu ili se nalaze u njihovoj blizini, a neprestano se razvijaju i nove metode za njihovo pronalaženje unutar genoma, razvoj novih početnica i korištenje u različitim vrstama riba.

Analizom mikrosatelitnih lokusa koji se nalaze u, ili u blizini kodirajućih regija fiziološki važnih gena atlantske plavoperajne tune *T. thynnus* tijekom dva ciklusa kaveznog uzgoja u Jadranskom moru, nije dokazan specifični uzorak koji bi mogao ukazati na promjenu u fitnessu riba i utjecaj na preživljavanje divljih juvenilnih jedinki do kraja uzgojnog ciklusa. Nekoliko od 13 novorazvijenih mikrosatelitnih lokusa je pokazalo pad broja alela i nižu vrijednost alelnog bogatstva na kraju uzgojnog ciklusa, nekoliko je ostalo stabilno, a kod nekoliko je zabilježeno povećanje, ukazujući na raznolikost jedinki u populacijama tuna unutar određene godine. Također, iako su istraženi lokusi bili polimorfni, rezultati analize genetičke raznolikosti između uzorkovanih populacija ukazuju da varijabilnost između ovih lokusa očito ne utječe na stopu preživljavanja divljih juvenilnih tuna do kraja uzgojnog ciklusa niti su oni dovoljno informativni da bi ukazali na razlike u genotipovima između divljih i uzgojnih populacija. Na donošenje definitivnih zaključaka o ulozi polimorfizma ovih lokusa u imunološkim reakcijama kod tuna, te strukturi njihovih populacija, treba uzeti u obzir i relativno mali i neravnomjerno raspoređen broj uzoraka u populacijama kao i kratko vremensko razdoblje uzorkovanja. Potrebna su daljnja istraživanja na većem broju uzoraka, u različitim populacijama i tijekom dužeg vremenskog razdoblja, te povećanje broja istraživanih lokusa. Nadalje, unatoč tome što su rezultati ovog istraživanja na populacijskoj razini pokazali da nema značajnih razlika između divljih juvenilnih i uzgojnih populacija, lokusi razvijeni u ovom istraživanju proširuju popis mikrosatelitnih biljega dostupnih za atlantsku plavoperajnu tunu *T. thynnus*. U budućim istraživanjima mogu biti informativni pri proučavanju genetskih varijacija određenih gena, procjeni strukture populacija i molekularne ekologije ove vrste prilikom planiranja različitih zootehničkih i profilaktičkih mjera predviđenih tijekom uzgojnog ciklusa.

6. ZAKLJUČCI

- Razvijen je i optimiziran multipleks PCR protokol s 13 EST-SSR smještenih u, ili u blizini kodirajućih regija gena koji se mogu dovesti u vezu s imunološkim sustavom atlantske plavoperajne tune u Jadranskom moru te otpornošću na uvjete stresa.

- Većina ispitivanih lokusa je bila polimorfna. U prvom uzgojnom ciklusu je zabilježen prosječni broj alela od 6,53 po lokusu, te 5,92 u drugom uzgojnom ciklusu. Raspon broja alela po lokusima je bio umjeren (1-19), a prosječni broj alela po lokusu je bio neznatno viši u uzgojnim populacijama u usporedbi s divljim populacijama.

- Prosječne vrijednosti koeficijenta križanja u srodstvu (F_{IS}) su kod svih populacija ukazala na blago povećanje heterozigotnosti i imale sličan raspon vrijednosti zabilježen u prethodnim istraživanjima za *T. thynnus* u Sredozemnom moru.

- Kod nekoliko lokusa je zabilježeno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže što može biti rezultat prisutnosti nul alela, pogreški pri genotipizaciji ili "carry-overa" kod uzgojnih populacija.

- Kod novoulovljene populacije juvenilnih tuna nije pronađen određeni genotip koji bi ukazivao na osjetljivost jedinki sklonijih ugibanju tijekom uzgojnog ciklusa.

- U uzgojnim populacijama je zabilježena viša vrijednost alelnog bogatstva i broja privatnih alela u usporedbi s divljim populacijama što može biti rezultat metodoloških pogreški prilikom dizajna istraživanja, uzorkovanja, te strukture uzoraka u populaciji.

- Testovima neutralnosti nije pronađen utjecaj selekcije na testirane mikrosatelitne lokuse što u kombinaciji s preostalim rezultatima ukazuje na činjenicu da nisu dovoljno informativni da bi se pomoću njih pronašle razlike u genotipovima juvenilnih divljih i uzgojnih jedinki atlantske plavoperajne tune tijekom uzgojnog ciklusa.

7. LITERATURA

Abascal FJ, Medina A, De La Serna JM, Godoy D, Aranda G (2016) Tracking bluefin tuna reproductive migration into the Mediterranean Sea with electronic pop-up satellite archival tags using two tagging procedures. Fisheries Oceanography 25: 54-66.

Abdelkrim J, Robertson BC, Stanton JAL, Gemmell NJ (2009) Fast, cost-effective development of species-specific microsatellite markers by genomic sequencing. BioTechniques 46: 185-192.

Abdul Rahman Z, Choay-Hoong L, Mat Khairuddin R, Ab Razak S, Othman AS (2014) Isolation and characterization of novel microsatellite loci for Asian sea bass, *Lates calcarifer* from genome sequence survey database. Journal of Genetics 93: 82-85.

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

Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD, Dubnick M, Polymeropoulos MH, Xiao H, Merril CR, Wu A, Olde B, Moreno RF (1991) Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. Science 252: 1651-1656.

Adelyna MAN, Jung H, Chand V, Mather PB, Azizah MNS (2016) A genome survey sequence (GSS) analysis and microsatellite marker development for Indian mackerel, *Rastrelliger kanagurta*, using Ion Torrent technology. Meta Gene 10: 67-72.

Agostini C, Papetti C, Pararnello T, Mark FC, Zane L, Marino IAM (2013) Putative selected markers in the *Chionodraco* genus detected by interspecific outlier tests. Polar Biology 36(10): 1509-1518.

Aguila RD, Perez SKL, Catacutan BJN, Lopez GV, Barut NC, Santos MD (2015) Distinct yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) stocks detected in Western and Central Pacific Ocean (WCPO) using DNA microsatellites. PLoS ONE 10: 1-14.

Ajiboye OO, Yakubu AF, Adams TE, Olaji ED, Nwogu NA (2010) A review of the use of copepods in marine fish larviculture. Reviews in Fish Biology and Fisheries 21: 225-246.

Akemi Hoshino A, Pereira J, Macedo P, Alessandra K (2012) Microsatellites as tools for genetic diversity analysis. U: Caliskan M (ed.) Genetic diversity in microorganisms. IntechOpen, London

Alvarado Bremer JR, Naseri I, Ely B (1999) A provisional study of northern bluefin tuna populations. Collective Volumes of Scientific Papers - ICCAT 49: 127-129.

Alvarado Bremer JR, Naseri I, Ely B (1997) Orthodox and unorthodox phylogenetic relationships among tunas revealed by the nucleotide sequence analysis of the mitochondrial DNA control region. Journal of Fish Biology 50: 540-554.

Amaral CRL, Maciel V, Goldenberg-Barbosa R, Silva DA, Amorim A, Carvalho EF (2017) Tuna fish identification using mtDNA markers. Forensic Science International: Genetics Supplement Series 6: 471-473.

Amos W, Kosanović D, Eriksson A (2015) Inter-allelic interactions play a major role in microsatellite evolution. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 282: 1-5.

Amos W, Hoffman JI, Frodsham A, Zhang L, Best S, Hill AVS (2006) Automated binning of microsatellite alleles: problems and solutions. Molecular Ecology Notes 7: 10-14.

Antao T, Lopes A, Lopes RJ, Beja-Pereira A, Luikart G (2008) LOSITAN, a workbench to detect molecular adaptation based on a Fst-outlier method. BMC Bioinformatics 9: 1-5.

Antoni L, Luque PL, Naghshpour K, Reynal L, Saillant EA (2014a) Development and characterization of microsatellite markers for blackfin tuna (*Thunnus atlanticus*) with the use of Illumina paired-end sequencing. Fishery Bulletin 112: 322-325.

Antoni L, Luque PL, Naghshpour K, Saillant EA (2014b) Polymorphic microsatellite markers for the yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). Conservation Genetics Resources 6: 609-611.

Antoniou A, Kasapidis P, Kotoulas G, Mylonas CC, Magoulas A (2017) Genetic diversity of Atlantic Bluefin tuna in the Mediterranean Sea: insights from genome-wide SNPs and microsatellites. Journal of Biological Research - Thessaloniki 24: 1-14.

Aparicio S (2002) Whole-Genome Shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. Science 297: 1301-1310.

Api M, Bonfanti E, Lombardo F, Pignalosa P, Hardiman G, Carnevali O (2018) Effects of age on growth in Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). General and Comparative Endocrinology 265: 64-70.

Appleyard S, Grewe P, Innes B, Ward R (2001) Population structure of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) in the western Pacific Ocean, inferred from microsatellite loci. Marine Biology 139: 383-393.

Aranda G, Abascal FJ, Varela JL, Medina A (2013) Spawning behaviour and post-spawning migration patterns of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) ascertained from satellite archival tags. PLoS ONE 8: e76445.

Arthofer W, Heussler C, Krapf P, Schlick-Steiner BC, Steiner FM (2018) Identifying the minimum number of microsatellite loci needed to assess population genetic structure: A case study in fly culturing. Fly 12: 13-22.

Balli J, Mladineo I, Shirakashi S, Nowak BF (2016) Diseases in tuna aquaculture. U: Benetti DD (ed.). Patridge GJ (ed.), Buentello A (ed.) Advances in tuna aquaculture: from hatchery to market. Elsevier, 253-272.

Balloux F, Lugon-Moulin N (2002) The estimation of population differentiation with microsatellite markers. Molecular Ecology 11: 155-165.

Barton BA (2002) Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. Integrative and Comparative Biology 42: 517-525.

Barton BA, Iwama GK (1991) Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. Annual Review of Fish Diseases 1: 3-26.

Basiita RK, Zenger KR, Mwanja MT, Jerry DR (2015) Development of genome-wide microsatellite genetic resources in a commercially important African freshwater fish species - the Nile perch, *Lates niloticus*. Animal Genetics 46: 340-340.

Battaglia P, Andaloro F, Consoli P, Esposito V, Malara D, Musolino S, Pedà C, Romeo T (2013) Feeding habits of the Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus* (L. 1758), in the central Mediterranean Sea (Strait of Messina). Helgoland Marine Research 67: 97-107.

Beacham TD, Withler RE, Stevens TA (1996) Stock identification of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) using minisatellite DNA variation. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 53: 380-394.

Beaz D, Núñez J (2003) Engineering general aspects of BFT farming. In: Brigdes CR (ed.), Garcia A. (ed.), Gordin H. (ed.) Domestication of the bluefin tuna *Thunnus thynnus thynnus*. Zaragoza: CIHEAM, 23-27.

Beckmann JS, Soller M (1990) Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. Biotechnology (NY) 8: 930-932.

Bekkevold D, Hansen MM, Loeschcke V (2002) Male reproductive competition in spawning aggregations of cod (*Gadus morhua* L.). Molecular Ecology 11: 91-102.

Benetti DD, Partridge GJ, Stieglitz J (2016) Overview on status and technological advances in tuna aquaculture around the world. U: Benetti DD (ed.), Patridge GJ (ed.),

Buentello A (ed.) Advances in tuna aquaculture: from hatchery to market. Elsevier, 1-20.

Blanc M, Desurmont A, Beverly S (2005) Onboard handling of sashimi-grade tuna - a practical guide for crew members. Pacific Community, Noumea, New Caledonia.

Blank JM (2004) In situ cardiac performance of Pacific bluefin tuna hearts in response to acute temperature change. Journal of Experimental Biology 207: 881-890.

Blank JM, Farwell CJ, Morrissette JM, Schallert RJ, Block BA (2007) Influence of Swimming speed on metabolic rates of juvenile Pacific bluefin tuna and yellowfin tuna. Physiological and Biochemical Zoology 80: 167-177.

Block BA (2001) Migratory movements, depth preferences, and thermal biology of Atlantic bluefin tuna. Science 293: 1310-1314.

Block BA, Lawson GL, Boustany AM, Stokesbury MJW, Castleton M, Spares A, Neilson JD, Campana SE (2009) Preliminary results from electronic tagging of bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) in the Gulf of St. Lawrence, Canada. Collective Volumes of Scientific Papers - ICCAT 64: 469-479.

Block BA, Teo SLH, Walli A, Boustany A, Stokesbury MJW, Farwell CJ, Weng KC, Dewar H, Williams TD (2005) Electronic tagging and population structure of Atlantic bluefin tuna. Nature 434: 1121-1127.

Borstnik B, Pumpernik D (2002) Tandem repeats in protein coding regions of primate genes. Genome Research 12: 909-915.

Böttcher C (2014) The road to sustainable tuna aquaculture. Science Daily. www.sciencedaily.com/releases/2014/07/140704134640.htm

Boustany AM, Reeb CA, Block BA (2008) Mitochondrial DNA and electronic tracking reveal population structure of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). Marine Biology 156: 13-24.

Brill RW, Bushnell PG (2001) The cardiovascular system of tunas. U: Block B (ed.), Stevens E (ed.) Tuna: Physiology, ecology, and evolution. Elsevier, 79-120.

Brill RW, Block BA, Boggs CH, Bigelow KA, Freund EV, Marcinek DJ (1999) Horizontal movements and depth distribution of large adult yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) near the Hawaiian Islands, recorded using ultrasonic telemetry: implications for the physiological ecology of pelagic fishes. Marine Biology 133: 395-408.

Briñez R, Boris, Caraballo O, Xenia, & Salazar V, Marcela (2011) Genetic diversity of six populations of red hybrid tilapia, using microsatellites genetic markers. Revista MVZ Córdoba, 16(2): 2491-2498.

Brophy D, Haynes P, Arrizabalaga H, Fraile I, Fromentin JM, Garibaldi F, Katavic I, Tinti F, Karakulak FS, Macas D, Busawon D, Hanke A, Kimoto A, Sakai O, Deguara S, Abid N, Santos MN (2016) Otolith shape variation provides a marker of stock origin for north Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). Marine and Freshwater Research 67: 1023-1036.

Broughton RE, Gold JR (1997) Microsatellite development and survey of variation in northern bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). Molecular Marine Biology and Biotechnology 6: 308-314.

Bruford MW, Wayne RK (1993) Microsatellites and their application to population genetic studies. Current Opinion in Genetics & Development 3: 939-943.

Buentello A, Seoka M, Kato K, Partridge GJ (2016) Tuna farming in Japan and Mexico. U: Benetti DD (ed.), Patridge GJ (ed.), Buentello A (ed.) Advances in tuna aquaculture: from hatchery to market. Elsevier, 189-215.

Butler JM (2006) Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. Journal of Forensic Sciences 51: 253-265.

Callen DF, Thompson AD, Shen Y, Phillips HA, Richards RI, Mulley JC, Sutherland GR (1993) Incidence and origin of "null" alleles in the $(AC)_n$ microsatellite markers. American Journal of Human Genetics 52: 922-927.

Carey FG, Teal JM (1969) Mako and porbeagle: warm-bodied sharks. Comparative Biochemistry and Physiology 28: 199-204.

Carlson M (2018) org.Dr.eg.db, Genome wide annotation for Zebrafish. R package version 3.6.0.
https//bioconductor.org/packages/release/data/annotation/html/org.Dr.eg.db.html.

Carlsson J (2008) Effects of microsatellite null alleles on assignment testing. Journal of Heredity 99: 616-623.

Carlsson J, McDowell JR, Carlsson JEL, Graves JE (2007) Genetic identity of YOY bluefin tuna from the eastern and western Atlantic spawning areas. Journal of Heredity 98: 23-28.

Carlsson J, McDowell J, Diaz-Jaimes P, Carlsson JE, Boles SB, Gold JR, Graves JE (2004) Microsatellite and mitochondrial DNA analyses of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus thynnus*) population structure in the Mediterranean Sea. Molecular Ecology 13: 3345-3356.

Caruso G, Genovese L, Maricchiolo G, Modica A (2005) Haematological, biochemical and immunological parameters as stress indicators in *Dicentrarchus labrax* and *Sparus aurata* farmed in off-shore cages. Aquaculture International 13: 67-73.

Carvalho GR, Hauser L (1994) Molecular genetics and the stock concept in fisheries. Reviews in Fish Biology and Fisheries 4: 326-350.

Caton AE (1991) Review of aspects of southern bluefin tuna biology, population and fisheries. U: Deriso RB (ed.), Bayliff WH (ed.) World meeting on stock assessment of bluefin tuna: strengths and weaknesses, 181-357. Inter-American Tropical Tuna Commission, La Jolla, CA, special report 7.

Cermeño P, Quílez-Badia G, Ospina-Alvarez A, Sainz-Trápaga S, Boustany AM, Seitz AC, Tudela S, Block BA (2015) Electronic tagging of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L.) reveals habitat use and behaviors in the Mediterranean Sea. PLoS ONE 10: e0116638.

Chaoui L, Gagnaire PA, Guinand B, Quignard JP, Tsigenopoulos C, Kara MH, Bonhomme F (2012) Microsatellite length variation in candidate genes correlates with habitat in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. Molecular Ecology 21: 5497-5511.

Chapuis MP, Estoup A (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. Molecular Biology and Evolution 24: 621-631.

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

Chini V, Cattaneo AG, Rossi F, Bernardini G, Terova G, Saroglia M, Gornati R (2008) Genes expressed in blue fin tuna (*Thunnus thynnus*) liver and gonads. Gene 410: 207-213.

Chistiakov DA, Hellemans B, Volckaert FAM (2006) Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. Aquaculture 255: 1-29.

Claireaux G, Lagardère JP (1999) Influence of temperature, oxygen and salinity on the metabolism of the European sea bass. Journal of Sea Research 42: 157-168.

Clark TB, Ma L, Saillant E, Gold JR (2004) Microsatellite DNA markers for population-genetic studies of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus thynnus*) and other species of genus *Thunnus*. Molecular Ecology Resources 4: 70-73.

Collette BB, Carpenter KE, Polidoro BA, Juan-Jordá MJ, Boustany A, Die DJ, Elfes C, Fox W, Graves J, Harrison LR, McManus R, Minte-Vera CV, Nelson R, Restrepo V, Schratwieser J, Sun CL, Amorim A, Peres MB, Canales C, Cardenas G, Chang SK, Chiang WC, Leite N de O, Harwell H, Lessa R, Fredou FL, Oxenford HA, Serra R, Shao KT, Sumaila R, Wang SP, Watson R, Yáñez E (2011) High value and long Life-double jeopardy for tunas and billfishes. Science 333: 291-292.

Collette BB, Reeb C, Block BA (2001) Systematics of the tunas and mackerels (Scombridae). U: Block B (ed.), Stevens E (ed.) Tuna: Physiology, ecology, and evolution. Elsevier, 1-33.

Conner JK, Hartl DL (2004) A primer to ecological genetics. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA

Corriero A, Karakulak S, Santamaria N, Deflorio M, Spedicato D, Addis P, Desantis S, Cirillo F, Fenech-Farrugia A, Vassallo-Agius R, Serna JM, Oray Y, Cau A, Megalofonou P, Metrio G (2005) Size and age at sexual maturity of female bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L. 1758) from the Mediterranean Sea. Journal of Applied Ichthyology 21: 483-486.

Corriero A, Desantis S, Deflorio M, Acone F, Bridges CR, De la Serna JM, Megalofonou P, De Metrio G (2003) Histological investigation on the ovarian cycle of the bluefin tuna in the western and central Mediterranean. Journal of Fish Biology 63: 108-119.

Cort JL, Deguara S, Galaz T, Mèlich B, Artetxe I, Arregi I, Neilson J, Andrushchenko I, Hanke A, Neves dos Santos M, Estruch V, Lutcavage M, Knapp J, Compeán-Jiménez G, Solana-Sansores R, Belmonte A, Martínez D, Piccinetti C, Kimoto A, Addis P, Velasco M, De la Serna JM, Godoy D, Ceyhan T, Oray I, Karakulak S, Nøttestad L, López A, Ribalta O, Abid N, Idrissi M (2013) Determination of L_{max} for Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus* (L.), from meta-analysis of published and available biometric data. Reviews in Fisheries Science 21: 181-212.

Coulibaly I, Gharbi K, Danzmann RG, Yao J, Rexroad CE (2005) Characterization and comparison of microsatellites derived from repeat-enriched libraries and expressed sequence tags. Animal Genetics 36: 309-315.

Crollius HR, Jaillon O, Dasilva C, Ozouf-Costaz C, Fizames C, Fischer C, Bouneau L, Billault A, Quetier F, Saurin W, Bernot A, Weissenbach J (2000) Characterization and repeat analysis of the compact genome of the freshwater pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. Genome Research 10: 939-949.

Cuéllar-Pinzón J, Presa P, Hawkins SJ, Pita A (2016) Genetic markers in marine fisheries: Types, tasks and trends. Fisheries Research 173: 194-205.

Dakin EE, Avise JC (2004) Microsatellite null alleles in parentage analysis. Heredity 93: 504-509.

Dalziel AC, Moore SE, Moyes CD (2005) Mitochondrial enzyme content in the muscles of high-performance fish: evolution and variation among fiber types. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 288: 163-172.

Davies CA, Gosling EM, Was A, Brophy D, Tysklind N (2011) Microsatellite analysis of albacore tuna (*Thunnus alalunga*): population genetic structure in the North-East Atlantic Ocean and Mediterranean Sea. Marine Biology 158: 2727-2740.

Dammannogoda ST, Chand V, Mather PB (2012) Development and characterization of tri- and tetra-nucleotide polymorphic microsatellite markers for skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). Ceylon Journal of Science (Biological Sciences) 41(1): 11-17.

Davis MW (2010) Fish stress and mortality can be predicted using reflex impairment. Fish and Fisheries 11:1-11.

De Bartolome F, Mendez A (2005) The tuna offshore unit: concept and operation. IEEE Journal of Oceanic Engineering 30: 20-27.

De La Gandara Fernando, Mylonas Constantinos C, Coves Denis, Ortega Aurelio, Bridges Christopher R., Belmonte Rios Antonio, Vassallo-Agius Robert, Papandroulakis Nikos, Rosenfeld Hanna, Tandler A, Medina Antonio, Demetrio A, Corriero Aldo, Fauvel Christian, Falcon Jack, Sveinsvoll K, Ghysen Alain, Deguara S, Gordin Hillel (2010) Seedling production of Atlantic bluefin tuna (ABFT) *Thunnus thynnus*. The selfdott project. Joint International symposium of Kinki University and Setouchi town on the 40th anniversary of Pacific bluefin tuna aquaculture, Towards the sustainable aquaculture of bluefin tuna, Edited by Dr. Shigeru Miyashita, Dr. Kenji Takii, Dr. Wataru Sakamoto, Dr. Amal Biswas, Amami, Japan, 45-52.

De Metrio G, Bridges CR, Mylonas CC, Caggiano M, Deflorio M, Santamaria N, Zupa R, Pousis C, Vassallo-Agius R, Gordin H, Corriero A (2010) Spawning induction and large-scale collection of fertilized eggs in captive Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L.) and the first larval rearing efforts: Bluefin tuna spawning induction and eggs collection. Journal of Applied Ichthyology 26: 596-599.

De Metrio G, Arnold GP, De La Serna JM, Block BA, Megalofonou P, Lutcavage M, Oray I, Deflorio M (2005) Movements of bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L.) tagged in the Mediterranean Sea with pop-up satellite tags. Collective Volume of Scientific Papers - ICCAT 58: 1337-1340.

Decroocq V, Favé MG, Hagen L, Bordenave L, Decroocq S (2003) Development and transferability of apricot and grape EST microsatellite markers across taxa. Theoretical and Applied Genetics 106: 912-922.

Deveney MR, Bayly TJ, Johnston CJ, Nowak BF (2005) A parasite survey of farmed Southern bluefin tuna, *Thunnus maccoyii* (Castelnau). Journal of Fish Diseases 28: 279-284.

Dewoody J, Nason JD, Hipkins VD (2006) Mitigating scoring errors in microsatellite data from wild populations. Molecular Ecology Notes 6: 951-957.

DeWoody JA, Avise JC (2000) Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. Journal of Fish Biology 56: 461-473.

Di Rienzo A, Peterson AC, Garza JC, Valdes AM, Slatkin M, Freimer NB (1994) Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91: 3166-3170.

Díaz-Arce N, Arrizabalaga H, Murua H, Irigoien X, Rodríguez-Ezpeleta N (2016) RAD-seq derived genome-wide nuclear markers resolve the phylogeny of tunas. Molecular Phylogenetics and Evolution 102: 202-207.

Dickhut RM, Deshpande AD, Cincinelli A, Cochran MA, Corsolini S, Brill RW, Secor DH, Graves JE (2009) Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) population dynamics delineated by organochlorine tracers. Environmental Science & Technology 43: 8522-8527.

Dufresnes C, Brelsford A, Béziers P, Perrin N (2014) Stronger transferability but lower variability in transcriptomic- than in anonymous microsatellites: evidence from Hylid frogs. Molecular Ecology Resources 14: 716-725.

Dunlop ES, Enberg K, Jørgensen C, Heino M (2009) EDITORIAL: Toward Darwinian fisheries management. Evolutionary Applications 2: 245-259.

Duran C, Appleby N, Edwards D, Batley J (2009) Molecular genetic markers: discovery, applications, data storage and visualisation. Current Bioinformatics 4: 16-27.

Džoić T, Beg Paklar G, Grbec B, Ivatek-Šahdan S, Zorica B, Šegvić-Bubić T, Čikeš Keč V, Lepen Pleić I, Mladineo I, Grubišić L, Verley P (2016) Spillover of the Atlantic bluefin tuna offspring from cages in the Adriatic Sea: A multidisciplinary approach and assessment. PLoS ONE 12: e0188956.

Earl DA, von Holdt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conservation Genetics Resources 4: 359-361.

Edmunds PH, Sammons JI (1971) Genic polymorphism of tetrazolium oxidase in bluefin tuna, *Thunnus thynnus*, from the Western North Atlantic. Journal of the Fisheries Research Board of Canada 28: 1053-1055.

Edmunds PH, Sammons III JI (1973) Similarity of genic plymorphism of tetrazolium oxidase in bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) from the Atlantic coast of France and the Western North Atlantic. Journal of the Fisheries Research Board of Canada 30: 1031-1032.

Ellegren H (2004) Microsatellites: simple sequences with complex evolution. Nature Reviews Genetics 5: 435-445.

Ellis JR, Burke JM (2007) EST-SSRs as a resource for population genetic analyses. Heredity 99: 125-132.

Ellis D, Clarke S, Jeffries B, Van Barneveld R, Thomas P, Fernandes M, Loo M, Padula D (2009) Longer term holding of southern bluefin tuna *Thunnus maccoyii*. Aquafin CRC Report Project 1A.11, FRDC Project 2004/205.

Ely B, Stoner DS, Bremer AJR, Dean JM, Addis P, Cau A, Thelen EJ, Jones WJ, Black DE, Smith L, Scott K, Naseri I, Quattro JM (2002) Analyses of nuclear ldhA gene and mtDNA control region sequences of Atlantic northern bluefin tuna populations. Marine Biotechnology 4: 583-588.

Estoup A, Jarne P, Cornuet JM (2002) Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. Molecular Ecology 11: 1591-1604.

Estrada JA, Lutcavage M, Thorrold SR (2005) Diet and trophic position of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) inferred from stable carbon and nitrogen isotope analysis. Marine Biology 147: 37-45.

Eujayl I, Sledge MK, Wang L, May GD, Chekhovskiy K, Zwonitzer JC, Mian MAR (2004) *Medicago truncatula* EST-SSRs reveal cross-species genetic markers for *Medicago* spp. TAG Theoretical and Applied Genetics 108: 414-422.

Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. Molecular Ecology 14: 2611-2620.

Evans DL (2015) Stress and immune responses of ranched southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii castleneau*). Phd, University of Tasmania.

Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular Ecology Resources 10: 564-567.

Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. Genetics 164: 1567-1587.

FAO Fisheries and Aquaculture Department (2009) The state of world fisheries and aquaculture: 2008. Rome.

Ferguson MM, Danzmann RG (1998) Role of genetic markers in fisheries and aquaculture: useful tools or stamp collecting? Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 55: 1553-1563.

Fernandez-Polanco J, Llorente I (2016) Tuna economics and markets. U: Benetti DD (ed.), Patridge GJ (ed.), Buentello A (ed.) Advances in tuna aquaculture: from hatchery to marke. Elsevier, 333-350.

Ferrara A, Castiglione D, Richardson J, Schaap A, Wagner C (2010) Review symposium on the force of the example. Political Studies Review 8: 192-207.

Foll M (2012) BayeScan v2. 1 user manual. Ecology 20: 1450-1462.

Foulley JL, Ollivier L (2006) Estimating allelic richness and its diversity. Livestock Science 101: 150–158.

Frankham R, Briscoe DA, Ballou JD (2002) Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, United Kingdom.

Fromentin JM, Bonhommeau S, Arrizabalaga H, Kell LT (2014) The spectre of uncertainty in management of exploited fish stocks: The illustrative case of Atlantic bluefin tuna. Marine Policy 47: 8-14.

Fromentin JM (2009) Lessons from the past: investigating historical data from bluefin tuna fisheries. Fish and Fisheries 10: 197-216.

Fromentin JM, Powers JE (2005) Atlantic bluefin tuna: population dynamics, ecology, fisheries and management. Fish and Fisheries 6: 281-306.

Fromentin JM (2002) Descriptive analysis of the ICCAT bluefin tuna tagging database. Collective Volume of Scientific Papers - ICCAT 54: 353-362.

Galuardi B, Cadrin SX, Arregi I, Arrizabalaga H, Natale AD, Brown C, Lauretta M, Lutcavage M (2018) Atlantic bluefin tuna area transition matrices estimated from electronic tagging and sattagsim. Collective Volumes of Scientific Papers - ICCAT 74: 2903-2921.

Garaffo MA, Vassallo-Agius R, Nengas Y, Lembo E, Rando R, Maisano R, Dugo G, Giuffrida D (2011) Fatty acids profile, atherogenic (IA) and thrombogenic (IT) health lipid indices, of raw roe of bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L.) and their salted product "Bottarga." Food and Nutrition Sciences 2: 736-743.

García de León FJ, Dallas JF, Chatain B, Canonne M, Versini JJ, Bonhomme F (1995) Development and use of microsatellite markers in sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) (Perciformes: Serrandidae). Molecular Marine Biology & Biotechnology 4: 62-68.

García A, Laiz-Carrión R, Uriarte A, Quintanilla JM, Morote E, Rodríguez JM, Alemany F (2017) Differentiated stable isotopes signatures between pre- and post-flexion larvae of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) and of its associated tuna species of the Balearic Sea (NW Mediterranean). Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography 140: 18-24.

Geller JB, Darling JA, Carlton JT (2010) Genetic perspectives on marine biological invasions. Annual Review of Marine Science 2: 367-393.

Gemayel R, Vinces MD, Legendre M, Verstrepen KJ (2010) Variable tandem repeats accelerate evolution of coding and regulatory sequences. Annual Review of Genetics 44: 445-477.

Giménez-Casalduero F, Sánchez-Jerez P (2006) Fattening rate of bluefin tuna *Thunnus thyn*nus in two Mediterranean fish farms. Cybium 30: 51-56.

Glover KA, Dahle G, Jorstad KE (2011) Genetic identification of farmed and wild Atlantic cod, *Gadus morhua*, in coastal Norway. ICES Journal of Marine Science 68: 901-910.

Gonzalez EG, Beerli P, Zardoya R (2008) Genetic structuring and migration patterns of Atlantic bigeye tuna, *Thunnus obesus*) (Lowe, 1839). BMC Evolutionary Biology 8: 1-14.

Gordoa A, Olivar MP, Arevalo R, Vinas J, Moli B, Illas X (2009) Determination of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) spawning time within a transport cage in the western Mediterranean. ICES Journal of Marine Science 66: 2205-2210.

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

Graham JB, Dickson KA (2004) Tuna comparative physiology. Journal of Experimental Biology 207: 4015-4024.

Graves J (1998) Molecular insights into the population structures of cosmopolitan marine fishes. Journal of Heredity 89: 427-437.

Grubišić L, Šegvić-Bubić T, Lepen Pleić I, Jelavić- Mišlov K, Tičina V, Katavić I, Mladineo I (2013) Morphological and genetic identification of spontaneously spawned larvae of captive bluefin tuna *Thunnus thynnus* in the Adriatic Sea. Fisheries 38: 389-428.

Guðjónsson S, Einarsson SM, Jónsson IR, Guðbrandsson J (2015) Marine feeding areas and vertical movements of Atlantic salmon (*Salmo salar*) as inferred from recoveries of data storage tags. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 72: 1087-1098.

Guo T, Gregg C, Boukh-Viner T, Kyryakov P, Goldberg A, Bourque S, Banu F, Haile S, Milijevic S, San KHY, Solomon J, Wong V, Titorenko VI (2007) A signal from inside the peroxisome initiates its division by promoting the remodeling of the peroxisomal membrane. Journal of Cell Biology 177: 289-303.

Gupta PK, Rustgi S, Sharma S, Singh R, Kumar N, Balyan HS (2003) Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. Molecular Genetics and Genomics 270: 315-323.

Halligan DL, Keightley PD (2003) How many lethal alleles? Trends in Genetics 19: 57-59.

Harley S, Williams PG, Nicol S, Hampton J, Secretariat of the Pacific Community, Oceanic Fisheries Programme (2013) The western and central Pacific tuna fishery: 2011 overview and status of stocks. Secretariat of the Pacific Community, New Caledonia.

Hearne CM, Ghosh S, Todd JA (1992) Microsatellites for linkage analysis of genetic traits.Trends in Genetics 8(8): 288-294.

Hedrick PW (2004) Recent developments in conservation genetics. Forest Ecology and Management 197: 3-19.

Heinisch G, Rosenfeld H, Knapp JM, Gordin H, Lutcavage ME (201) Sexual maturity in western Atlantic bluefin tuna. Scientific Reports 4: 7205.

Helfman GS, Collette BB, Facey D, Bowen B (eds) (2009) The diversity of fishes: biology, evolution, and ecology, 2nd ed. West Sussex, Wiley-Blackwell, Oxford, United Kingdom.

Hibrand-Saint Oyant L, Crespel L, Rajapakse S, Zhang L, Foucher F (2007) Genetic linkage maps of rose constructed with new microsatellite markers and locating QTL controlling flowering traits. Tree Genetics & Genomes 4: 11-23.

Higuchi K, Tanaka Y, Eba T, Nishi A, Kumon K, Nikaido H, Shiozawa S (2013) High incidence of death due to collision of hatchery-reared Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* juveniles in sea cages, as revealed by head and spinal injuries. Fisheries Science 79: 111-117.

Hoffman JI, Amos W (2004) Microsatellite genotyping errors: detection approaches, common sources and consequences for paternal exclusion: microsatellite genotyping errors. Molecular Ecology 14: 599-612.

Holderegger R, Kamm U, Gugerli F (2006) Adaptive vs. neutral genetic diversity: implications for landscape genetics. Landscape Ecology 21: 797–807.

Honryo T, Oakada T, Kawahara M, Kurata M, Agawa Y, Sawada Y, Miyashita S, Takii K, Ishibashi Y (2018) Estimated time for recovery from transportation stress and starvation in juvenile Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. Aquaculture 484: 175-183.

Honryo T, Kurata M, Okada T, Ishibashi Y (2013) Effects of night-time light intensity on the survival rate and stress responses in juvenile Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* (Temminck and Schlegel). Aquaculture Research 44: 1058-1065.

Hung CM, Yu AY, Lai YT, Shaner PJL (2016) Developing informative microsatellite makers for non-model species using reference mapping against a model species' genome. Scientific Reports 6: 23087.

ICCAT (2017) International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas. https://www.iccat.int/en/#

Innis MA (ed) (1990) PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego.

Iversen M, Finstad B, Nilssen KJ (1998) Recovery from loading and transport stress in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. Aquaculture 168: 387-394.

Jardas I (1996) Jadranska ihtiofauna. Školska knjiga, Zagreb.

Jarne P, Lagoda PJ (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. Trends in Ecology & Evolution 11: 424-429.

Jeffreys H (1998) Theory of probability. Oxford classic texts in the physical sciences. Clarendon Press; Oxford University Press, Oxford, New York.

Ji P, Zhang Y, Li C, Zhao Z, Wang J, Li J, Xu P, Sun X (2012) High throughput mining and characterization of microsatellites from common carp genome. International Journal of Molecular Sciences 13: 9798-9807.

Johnson JE, Welch DJ (2009) Marine fisheries management in a changing climate: A Review of Vulnerability and Future Options. Reviews in Fisheries Science 18: 106-124.

Jombart T (2008) Adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. Bioinformatics 24: 1403-1405.

Jones AG, Ardren WR (2003) Methods of parentage analysis in natural populations. Molecular Ecology 12: 2511-2523.

Kadota T, Takashi T, Oka M, Higuchi K, Gen K, Tanaka Y, Sawaguchi S, Mushiake K (2016) Prevalence of collision death in 2-year-old Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*, reared in land-based tanks for broodstock management. Aquaculture 454: 252-256.

Kalinowski ST (2004) Counting alleles with rarefaction: private alleles and hierarchical sampling designs. Conservation Genetics 5: 539-543.

Kalinowski ST (2002) How many alleles per locus should be used to estimate genetic distances? Heredity 88: 62-65.

Karakulak FS, Öztürk B, Yildiz T (2016) From ocean to farm: capture-based aquaculture of bluefin tuna in the eastern Mediterranean sea. U: Benetti DD (ed.), Patridge GJ (ed.), Buentello A (ed.) Advances in tuna aquaculture: from hatchery to market. Elsevier, 59-76.

Karakulak FS, Salman A, Oray IK (2009) Diet composition of bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L. 1758) in the Eastern Mediterranean Sea, Turkey. Journal of Applied Ichthyology 25: 757-761.

Karakulak S, Oray I, Corriero A, Deflorio M, Santamaria N, Desantis S, De Metrio G (2004) Evidence of a spawning area for the bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L.) in the Eastern Mediterranean. Journal of Applied Ichthyology 20: 318-320.

Katavić I, Šegvić-Bubić T, Grubišić L, Talijančić I (2016) Reliability of bluefin tuna size estimation using a stereoscopic camera system. Collective Volumes of Scientific Papers - ICCAT, 72(7): 1848-1861.

Katavić I, Franicevic V, Ticina V (2003) Rearing of small bluefin tunas (*Thunnus thynnus* L.) in the Adriatic Sea Preliminary study. Cashiers Options Méditerranéennes 60: 95-99.

Kato Y, Takebe T, Masuma S, Kitagawa T, Kimura S (2008) Turbulence effect on survival and feeding of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* larvae, on the basis of a rearing experiment. Fisheries Science 74: 48-53.

Katz SL, Syme DA, Shadwick RE (2001) High-speed swimming: Enhanced power in yellowfin tuna. Nature 410: 770-771.

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

Kirchhoff NT (2012) Health and performance of ranched southern bluefin tuna. Phd, University of Tasmania.

Kirk H, Freeland JR (2011) Applications and implications of neutral versus non-neutral markers in molecular ecology. International Journal of Molecular Sciences 12: 3966-3988.

Kishi S, Slack BE, Uchiyama J, Zhdanova IV (2009) Zebrafish as a genetic model in biological and behavioral gerontology: where development meets aging in vertebrates -a mini review. Gerontology 55: 430-441.

Kitagawa T, Kimura S, Nakata H, Yamada H (2004) Diving behavior of immature, feeding Pacific bluefin tuna (*Thunnus thynnus orientalis*) in relation to season and area: the East China Sea and the Kuroshio-Oyashio transition region. Fisheries Oceanography 13: 161-180.

Kitagawa T, Nakata H, Kimura S, Itoh T, Tsuji S, Nitta A (2000) Effect of ambient temperature on the vertical distribution and movement of Pacific bluefin tuna *Thunnus thynnus orientalis*. Marine Ecology Progress Series 206: 251-260.

Klinger DH, Dale JJ, Gleiss AC, Brandt T, Estess EE, Gardner L, Machado B, Norton A, Rodriguez L, Stiltner J, Farwell C, Block BA (2016) The effect of temperature on postprandial metabolism of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology 195: 32-38.

Ko HL, Wang YT, Chiu TS, Lee MA, Leu M-Y, Chang KZ, Chen WY, Shao KT (2013) Evaluating the accuracy of morphological identification of larval fishes by applying DNA barcoding. PLoS ONE 8: e53451.

Kochmann J, Carlsson J, Crowe TP, Mariani S (2012) Genetic evidence for the uncoupling of local aquaculture activities and a population of an invasive species- a case study of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). Journal of Heredity 103: 661-671.

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

Korsmeyer KE, Dewar H (2001) Tuna metabolism and energetics. U: Block B (ed.), Stevens E (ed.). Tuna: physiology, ecology, and evolution. Elsevier, 35-78.

Kumar G, Kocour M (2015) Population genetic structure of tunas inferred from molecular markers: a review. Reviews in Fisheries Science & Aquaculture 23: 72-89.

Kvamme BO, Gadan K, Finne-Fridell F, Niklasson L, Sundh H, Sundell K, Taranger GL, Evensen Ø (2013) Modulation of innate immune responses in Atlantic salmon by chronic hypoxia-induced stress. Fish & Shellfish Immunology 34: 55-65.

Lacroix GL (2013) Population-specific ranges of oceanic migration for adult Atlantic salmon (*Salmo salar*) documented using pop-up satellite archival tags. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 70: 1011-1030.

Laird PW, Zijderveld A, Linders K, Rudnicki MA, Jaenisch R, Berns A (1991) Simplified mammalian DNA isolation procedure. Nucleic Acids Research 19: 4293.

Laiz-Carrión R, Gerard T, Uriarte A, Malca E, Quintanilla JM, Muhling BA, Alemany F, Privoznik SL, Shiroza A, Lamkin JT, García A (2015) Trophic ecology of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) larvae from the Gulf of Mexico and NW Mediterranean spawning grounds: a comparative stable isotope study. PLoS ONE 10(9): e0138638.

Larsson LC, Laikre L, Palm S, André C, Carvalho GR, Ryman N (2007) Concordance of allozyme and microsatellite differentiation in a marine fish, but evidence of selection at a microsatellite locus: allozyme and microsatellite comparison. Molecular Ecology 16: 1135-1147.

Lemer S, Rochel E, Planes S (2011) Correction method for null alleles in species with variable microsatellite flanking regions, a case study of the black-lipped pearl oyster *Pinctada margaritifera*. Journal of Heredity 102: 243-246.

Li S, Yin T, Wang M, Tuskan GA (2011) Characterization of microsatellites in the coding regions of the *Populus* genome. Molecular Breeding 27: 59-66.

Li YC, Korol AB, Fahima T, Nevo E (2004) Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. Molecular Biology and Evolution 21: 991-1007.

Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. Molecular Ecology 11: 2453-2465.

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

Liepelt S, Kuhlenkamp V, Anzidei M, Vendramin GG, Ziegenhagen B (2001) Pitfalls in determining size homoplasy of microsatellite loci. Molecular Ecology Notes 1: 332-335.

Lieschke GJ, Currie PD (2007) Animal models of human disease: zebrafish swim into view. Nature Reviews Genetics 8: 353-367.

Lionello P, Gacic M, Gomis D, Garcia-Herrera R, Giorgi F, Planton S, Trigo R, Theocharis A, Tsimplis MN, Ulbrich U, Xoplaki E (2012) Program focuses on climate of the Mediterranean region. Eos, Transactions American Geophysical Union 93: 105-106.

Lipizer M, Partescano E, Rabitti A, Giorgetti A, Crise A (2014) Qualified temperature, salinity and dissolved oxygen climatologies in a changing Adriatic Sea. Ocean Science 10: 771-797.

Llopiz JK, Muhling BA, Lamkin JT (2015) Feeding dynamics of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) larvae in the Gulf of Mexico. Collective Volume of Scientific Papers - ICCAT 71: 1710-1715.

Lobo I (2008) Mendelian ratios and lethal genes. Nature Education 1(1): 138.

Lockley AK, Bardsley RG (2000) Novel Method for the Discrimination of Tuna (*Thunnus thynnus*) and Bonito (*Sarda sarda*) DNA. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48: 4463-4468.

López-Flores I, Garrido-Ramos MA (2012) The Repetitive DNA Content of Eukaryotic Genomes. Genome Dynamics 7: 1-28.

Luikart G, England PR, Tallmon D, Jordan S, Taberlet P (2003) The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. Nature Reviews Genetics 4: 981-994.

Luo W, Nie Z, Zhan F, Wei J, Wang W, Gao Z (2012) Rapid development of microsatellite markers for the endangered fish *Schizothorax biddulphi* (Günther) using next generation sequencing and cross-species amplification. International Journal of Molecular Sciences 13: 14946-14955.

Luque PL, Zhang S, Rooker JR, Bidegain G, Rodríguez-Marín E (2017) Dorsal fin spines as a non-invasive alternative calcified structure for microelemental studies in Atlantic bluefin tuna. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 486: 127-133.

Lynch M, Milligan BG (1994) Analysis of population genetic structure with RAPD markers. Molecular Ecology 3: 91-99.

MacKenzie BR, Mosegaard H, Rosenberg AA (2009) Impending collapse of bluefin tuna in the northeast Atlantic and Mediterranean. Conservation Letters 2: 26-35.

Magnadóttir B (2006) Innate immunity of fish (overview). Fish & Shellfish Immunology 20: 137-151.

Mariette S, Le Corre V, Austerlitz F, Kremer A (2002) Sampling within the genome for measuring within-population diversity: trade-offs between markers. Molecular Ecology 11: 1145-1156.

Markert JA, Champlin DM, Gutjahr-Gobell R, Grear JS, Kuhn A, McGreevy TJ, Roth A, Bagley MJ, Nacci DE (2010) Population genetic diversity and fitness in multiple environments. BMC Evolutionary Biology 10: 205.

Masuma S, Takebe T, Sakakura Y (2011) A review of the broodstock management and larviculture of the Pacific northern bluefin tuna in Japan. Aquaculture 315: 2-8.

Masuma S, Miyashita S, Yamamoto H, Kumai H (2008) Status of bluefin tuna farming, broodstock management, breeding and fingerling production in Japan. Reviews in Fisheries Science 16: 385-390.

Mateus AP, Power DM, Canário AVM (2017) Stress and disease in fish. U: Jeney G (ed.) Fish diseases: prevention and control strategies. Elsevier, 187-220.

Mather FJ (1969) Long distance migrations of tunas and marlins. Underwater Nature 46: 6-14.

Maunder MN, Punt AE (2004) Standardizing catch and effort data: a review of recent approaches. Fisheries Research 70: 141-159.

McDowell JR, Graves JE (2008) Population structure of striped marlin (*Kajikia audax*) in the Pacific Ocean based on analysis of microsatellite and mitochondrial DNA. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 65: 1307-1320.

McDowell JR, Diaz-Jaimes P, Graves JE (2002) Isolation and characterization of seven tetranucleotide microsatellite loci from Atlantic northern bluefin tuna *Thunnus thynnus thynnus*. Molecular Ecology Resources 2: 214-216.

Medina A, Aranda G, Gherardi S, Santos A, Mèlich B, Lara M (2016) Assessment of spawning of Atlantic bluefin tuna farmed in the western Mediterranean Sea. Aquaculture Environment Interactions 8: 89-98.

Medina A, Abascal FJ, Megina C, Garcia A (2002) Stereological assessment of the reproductive status of female Atlantic northern bluefin tuna during migration to Mediterranean spawning grounds through the Strait of Gibraltar. Journal of Fish Biology 60: 203-217.

Mendonça FF, Ussami LHF, Hashimoto DT, Pereira LHG, Porto-Foresti F, Oliveira C, Gadig OBF, Foresti F (2012) Identification and characterization of polymorphic microsatellite loci in the blue shark *Prionace glauca*, and cross-amplification in other shark species. Journal of Fish Biology 80: 2643-2646.

Menezes MR, Noguchi D, Nakajima M, Taniguchi N (2008) Microsatellite development and survey of genetic variation in skipjack tuna *Katsuwonus pelamis*. Journal of Fish Biology 73: 463-473.

Metzgar D, Bytof J, Wills C (2000) Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. Genome Research 10: 72-80.

Meyer FP (1991) Aquaculture disease and health management. Journal of Animal Science 69: 4201-4208.

Millot C (1999) Circulation in the Western Mediterranean Sea. Journal of Marine Systems 20: 423-442.

Mittal N, Dubey AK (2009) Microsatellite markers - a new practice of DNA based markers in molecular genetics. Pharmacognosy Reviews 3: 235-246.

Miyake P, De la Serna J, Di Natale F (2003) General review of bluefin tuna farming in the Mediterranean area. Collective Volumes of Scientific Papers - ICCAT 55: 114-124.

Miyashita S, Sawada Y, Hattori N, Nakatsukasa H, Okada T, Murata O, Kumai H (2000) Mortality of northern bluefin tuna *Thunnus thynnus* due to trauma caused by collision during growout culture. Journal of the World Aquaculture Society 31: 632-639.

Mladineo I (2006) Histopathology of five species of *Didymocystis* spp. (Digenea: Didymozoidae) in cage-reared Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus thynnus*). Veterinary Research Communications 30: 475-484.

Mladineo I, Miletić I, Bočina I (2006) *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* outbreak in cage-reared Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus*. Journal of Aquatic Animal Health 18: 51-54.

Mladineo I, Tudor M (2004) Digenea of Adriatic cage-reared northern bluefin tuna (*Thunnus thynnus thynnus*). Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 24: 1-9**.**

Mladineo I, Žilić J, Čanković M (2008) Health survey of Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758), reared in Adriatic cages from 2003 to 2006. Journal of the World Aquaculture Society 39: 281-289.

Montes I, Iriondo M, Manzano C, Arrizabalaga H, Jiménez E, Pardo MÁ, Goñi N, Davies CA, Estonba A (2012) Worldwide genetic structure of albacore *Thunnus alalunga* revealed by microsatellite DNA markers. Marine Ecology Progress Series 471: 183-191.

Morgante M, Hanafey M, Powell W (2002) Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. Nature Genetics 30: 194-200.

Morin PA, Leduc RG, Archer FI, Martien KK, Huebinger R, Bickham JW, Taylor BL (2009) Significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium caused by low levels of microsatellite genotyping errors: technical advances. Molecular Ecology Resources 9: 498-504.

Moyle PB, Cech JJ (2004) Fishes: an introduction to ichthyology, 5rd ed. University of California, Davis.

Mozaffarian D, Lemaitre RN, Kuller LH, Burke GL, Tracy RP, Siscovick DS, Cardiovascular Health Study (2003) Cardiac benefits of fish consumption may depend on the type of fish meal consumed: the Cardiovascular Health Study. Circulation 107: 1372-1377.

Munday BL, Sawada Y, Cribb T, Hayward CJ (2003) Diseases of tunas, *Thunnus* spp. Journal of Fish Disease 26: 187-206.

Mylonas CC, De La Gándara F, Corriero A, Ríos AB (2010) Atlantic bluefin tuna (*Thunnus Thynnus*) farming and fattening in the Mediterranean Sea. Reviews in Fisheries Science 18: 266-280.

Nagpure N, Rashid I, Pati R, Pathak A, Singh M, Singh S, Sarkar U (2013) FishMicrosat: a microsatellite database of commercially important fishes and shellfishes of the Indian subcontinent. BMC Genomics 14: 630.

Nakada M (2008) Capture-based aquaculture: global overview. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Nakadate M, Kusano T, Fushimi H, Kondo H, Hirono I, Aoki T (2011) Multiple spawning of captive Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) as revealed by mitochondrial DNA analysis. Aquaculture 310: 325-328.

Neel MC, Cummings MP (2003) Effectiveness of conservation targets in capturing genetic diversity. Conservation Biology 17: 219-229.

Neff BD, Fu P, Gross MR (2000) Microsatellite multiplexing in fish. Transactions of the American Fisheries Society 129: 584-593.

Neigel JE (1997) A Comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. Annual Review of Ecology and Systematics 28: 105-128.

Neilson JD, Campana SE (2008) A validated description of age and growth of western Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 65: 1523-1527.

Nielsen EE, Hemmer-Hansen J, Larsen PF, Bekkevold D (2009) Population genomics of marine fishes: identifying adaptive variation in space and time. Molecular Ecology 18: 3128-3150.

Nikolić N, Duthoy S, Destombes A, Bodin N, West W, Puech A, Bourjea J (2015) Discovery of genome-wide microsatellite markers in Scombridae: A Pilot Study on Albacore Tuna. PLoS ONE 10: e0141830.

NN 4/2017 (153) Pravilnik o ulovu, uzgoju i prometu plavoperajne tune (*Thunnus thynnus*), Ministarstvo poljoprivrede, 2017.

Norris A, Bradley D, Cunningham E (1999) Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations. Aquaculture 180: 247-264.

Nowak B, Mladineo I, Aiken H, Bott N, Hayward C (2006) Results of health surveys of two species of farmed tuna: southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*) in Australia and northern bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) in the Mediterranean. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 26: 1-5.

Ohta T, Kimura M (1973) A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. Genetic Research 22: 201-204.

Oray IK, Karakulak FS (2005) Further evidence of spawning of bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L., 1758) and the tuna species (*Auxis rochei* Ris., 1810, *Euthynnus alletteratus* Raf., 1810) in the eastern Mediterranean Sea: preliminary results of TUNALEV larval survey in 2004. Journal of Applied Ichthyology 21: 236-240.

O'Reilly PT, Canino MF, Bailey KM, Bentzen P (2004) Inverse relationship between F_{ST} and microsatellite polymorphism in the marine fish, walleye pollock (*Theragra chalcogramma*): implications for resolving weak population structure: Polymorphism and estimates of differentiation. Molecular Ecology 13: 1799-1814.

Ortega A, Viguri J, Prieto JR, Belmonte A, Martinez D, Velazquez M (2013) Tuna, *Thunnus thynnus*, kept in sea cages. U: European Aquaculture Society, San Sebastián (Spain), 931-932.

Ottolenghi F (2008) Capture-based aquaculture: global overview. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Özden Ö, Erkan N, Kaplan M, Karakulak FS (2018) Toxic metals and omega-3 fatty acids of bluefin tuna from aquaculture: health risk and benefits. Exposure and Health 1-10.

Page RDM, Holmes EC (1998) Molecular evolution: a phylogenetic approach. Blackwell Science, Oxford, United Kingdom.

Palumbi SR (1994) Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. Annual Review of Ecology and Systematics 25: 547-572.

Pan G, Yang J (2010) Analysis of microsatellite DNA markers reveals no genetic differentiation between wild and hatchery populations of Pacific threadfin in Hawaii. International Journal of Biological Sciences 6: 827-833.

Papaconstantinou C, Farrugio H (2000) Fisheries in the Mediterranean. Mediterranean Marine Science 1(1): 5-18.

Partridge GJ, Allan G, Burnell G (2013) Closed-cycle hatchery production of tuna. U: Geoff A (ed.), Burnell G (ed.) Advances in aquaculture hatchery technology. Elsevier, 457-497.

Pashley CH, Ellis JR, McCauley D, Burke JM (2006) EST databases as a source for molecular markers: Lessons from *Helianthus*. Journal of Heredity 97: 381-388.

Pemberton JM, Slate J, Bancroft DR, Barrett JA (1995) Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. Molecular Ecology 4: 249-252.

Pemov A, Modi H, Chandler D, Bavykin S (2005) DNA analysis with multiplex microarray-enhanced PCR. Nucleic Acids Research 33: 1-9.

Pérez F, Ortiz J, Zhinaula M, Gonzabay C, Calderón J, Volckaert FAMJ (2005) Development of EST-SSR Markers by Data Mining in Three Species of Shrimp: *Litopenaeus vannamei*, *Litopenaeus stylirostris*, and *Trachypenaeus birdy*. Marine Biotechnology 7: 554-569.

Petit RJ, El Mousadik A, Pons O (1998) Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. Conservation Biology 12: 844-855.

Piroddi C, Coll M, Liquete C, Macias D, Greer K, Buszowski J, Steenbeek J, Danovaro R, Christensen V (2017) Historical changes of the Mediterranean Sea ecosystem: modelling the role and impact of primary productivity and fisheries changes over time. Scientific Reports 7: 1-18.

Polinski M (2014) Application of molecular methods for determining immune responses and disease status in bluefin tuna. Phd, University of Tasmania.

Polinski M, Shirakashi S, Bridle A, Nowak B (2014) Transcriptional immune response of cage-cultured Pacific bluefin tuna during infection by two *Cardicola* blood fluke species. Fish & Shellfish Immunology 36: 61-67.

Polinski M, Hamilton DB, Nowak B, Bridle A (2013) SYBR, TaqMan, or both: Highly sensitive, non-invasive detection of *Cardicola* blood fluke species in southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*). Molecular and Biochemical Parasitology 191: 7-15.

Pompanon F, Bonin A, Bellemain E, Taberlet P (2005) Genotyping errors: causes, consequences and solutions. Nature Reviews Genetics 6: 847-859.

Portnoy DS, Hollenbeck CM, Vidal RR, Gold JR (2014) A comparison of neutral and immune genetic variation in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. in Chilean aquaculture facilities. PLoS ONE 9: e99358.

Poulsen NA, Nielsen EE, Schierup MH, Loeschcke V, GrøNkjaer P (2005) Long-term stability and effective population size in North Sea and Baltic Sea cod (*Gadus morhua*): effective population size in Atlantic cod. Molecular Ecology 15: 321-331.

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

Pujolar JM, Roldán MI, Pla C (2003) Genetic analysis of tuna populations, *Thunnus thynnus thynnus* and *T. alalunga*. Marine Biology 143: 613-621.

Pujolar JM, Pla C (2000) Genetic differentiation between Northwest Atlantic and Mediterranean samples of bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) using isozyme analysis. Collective Volumes of Scientific Papers - ICCAT 51: 882-891.

Puncher GN, Arrizabalaga H, Alemany F, Cariani A, Oray IK, Karakulak FS, Basilone G, Cuttitta A, Mazzola S, Tinti F (2015) Molecular identification of Atlantic Bluefin tuna (*Thunnus thynnus*, Scombridae) larvae and development of a DNA character-based identification key for mediterranean scombrids. PLoS ONE 10: e0130407.

Purcell JE, Baxter EJ, Fuentes VL (2013) Jellyfish as products and problems of aquaculture. U: Geoff A (ed.), Burnell G (ed.) Advances in aquaculture hatchery technology. Elsevier, 404-430.

Queller DC, Strassmann JE, Hughes CR (1993) Microsatellites and kinship. Trends in Ecology & Evolution 8: 285-288.

Rasmussen RS, Morrissey MT (2008) DNA-based methods for the identification of commercial fish and seafood species. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 7: 280-295.

Rauta PR, Nayak B, Das S (2012) Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: A model for higher organisms. Immunology Letters 148: 23-33.

Ravier C (2001) Long-term fluctuations in the eastern Atlantic and Mediterranean bluefin tuna population. ICES Journal of Marine Science 58: 1299-1317.

Reeb CA (2010) Genetic discontinuity of big fish in a small sea. Proceedings of the National Academy of Sciences 107: 2377-2378.

Reglero P, Blanco E, Alemany F, Ferrá C, Alvarez-Berastegui D, Ortega A, de la Gándara F, Aparicio-González A, Folkvord A (2018) Vertical distribution of Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* and bonito *Sarda sarda* larvae is related to temperature preference. Marine Ecology Progress Series 594: 231-243.

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

Reuter JA, Spacek DV, Snyder MP (2015) High-throughput sequencing technologies. Molecular Cell 58: 586-597.

Riccioni G, Ferrara G, Landi M, Sella M (2010a) Spatio-temporal genetic patterns in Mediterranean bluefin tuna: population structuring and retention of genetic diversity. Collective Volumes of Scientific Papers - ICCAT 65: 996-1003.

Riccioni G, Landi M, Ferrara G, Milano I, Cariani A, Zane L, Sella M, Barbujani G, Tinti F (2010b) Spatio-temporal population structuring and genetic diversity retention in depleted Atlantic bluefin tuna of the Mediterranean Sea. Proceedings of the National Academy of Sciences 107: 2102-2107.

Riccioni G, Stagioni M, Landi M, Ferrara G, Barbujani G, Tinti F (2013) Genetic structure of bluefin tuna in the Mediterranean Sea correlates with environmental variables. PLoS ONE 8(11): e80105.

Riccioni G, Cariani A, Ferrara G, Cannas R, Melis R, Stagioni M, Addis P, Tinti F (2017) Evolutionary constraints limiting the variation of Expressed Sequence Tag-linked microsatellite loci, prevent the detection of local adaptation in Mediterranean bluefin tuna. Fisheries Research 190: 157-163.

Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. Evolution 43: 223.

Richardson DE, Marancik KE, Guyon JR, Lutcavage ME, Galuardi B, Lam CH, Walsh HJ, Wildes S, Yates DA, Hare JA (2016) Discovery of a spawning ground reveals diverse migration strategies in Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 113: 3299-3304.

Rodriguez-Marin E, Rodriguez-Cabello C, De La Serna JM, Cort JL, Alot E, Ortiz De Zarate V, Gutierrez JL, Abad E (2005) A review of bluefin tuna juveniles tagging information and mortality estimation in waters around the Iberian Peninsula. Collective Volumes of Scientific Papers - ICCAT 58: 1388-1402.

Rooker JR, Secor DH, Zdanowicz VS, De Metrio G, Relini LO (2003) Identification of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) stocks from putative nurseries using otolith chemistry. Fisheries Oceanography 12: 75-84.

Rooker JR, Alvarado Bremer JR, Block BA, Dewar H, de Metrio G, Corriero A, Kraus RT, Prince ED, Rodríguez-Marín E, Secor DH (2007) Life history and stock structure of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). Reviews in Fisheries Science 15: 265-310.

Rooker J, Secor D, de Metrio G, Kaufman A, Belmonte Ríos A, Ticina V (2008) Evidence of trans-Atlantic movement and natal homing of bluefin tuna from stable isotopes in otoliths. Marine Ecology Progress Series 368: 231-239.

Ruzzante DE, Mariani S, Bekkevold D, Andre C, Mosegaard H, Clausen LA, Dahlgren TG, Hutchinson WF, Hatfield EM, Torstensen E, Brigham J, Simmonds EJ, Laikre L, Larsson LC, Stet RJ, Ryman N, Carvalho GR (2006) Biocomplexity in a highly migratory pelagic marine fish, Atlantic herring. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 273: 1459-1464.

Ruzzante DE, Taggart CT, Cook D (1998) A nuclear DNA basis for shelf- and bank-scale population structure in northwest Atlantic cod (*Gadus morhua*): Labrador to Georges Bank. Molecular Ecology 7: 1663-1680.

Ryman N, Palm S (2006) POWSIM: a computer program for assessing statistical power when testing for genetic differentiation. Molecular Ecology Notes 6: 600-602.

Sabate F de la S, Sakakura Y, Tanaka Y, Kumon K, Nikaido H, Eba T, Nishi A, Shiozawa S, Hagiwara A, Masuma S (2010) Onset and development of cannibalistic and schooling behavior in the early life stages of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. Aquaculture 301: 16-21.

Safina C, Klinger DH (2008) Collapse of bluefin tuna in the western Atlantic: status of west Atlantic bluefin tuna. Conservation Biology 22: 243-246.

Sakthivel A, Gopalakrishnan A, Selvakumar P (2016) Pathological manifestation of the *Acanthocephalus dirus* in *Thunnus albacares*. Asian Pacific Journal of Tropical Disease 6: 350-353.

Santamaria N, Bello G, Corriero A, Deflorio M, Vassallo-Agius R, Bök T, De Metrio G (2009) Age and growth of Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus* (Osteichthyes: Thunnidae), in the Mediterranean Sea. Journal of Applied Ichthyology 25: 38-45.

Sarà G, Sarà R (2007) Feeding habits and trophic levels of bluefin tuna *Thunnus thynnus* of different size classes in the Mediterranean Sea. Journal of Applied Ichthyology 23: 122-127.

Sawada Y, Okada T, Miyashita S, Murata O, Kumai H (2005) Completion of the Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* (Temminck et Schlegel) life cycle. Aquaculture Research 36: 413-421.

Schaefer KM (2001) Reproductive biology of tunas. U: Block B (ed.), Stevens E (ed.). Tuna: physiology, ecology, and evolution. Elsevier, 225-270.

Schloesser RW, Neilson JD, Secor DH, Rooker JR (2010) Natal origin of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) from Canadian waters based on otolith δ^{13} C and δ^{18} O. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 67: 563-569.

Schreck CB, Tort L (2016) The concept of stress in fish. U: Schreck CB (ed.), Tort L (ed.), Farrell AP (ed.), Brauner CJ (ed.) Biology of stress in fish: Fish Physiology Elsevier, 1-34.

Schug MD, Mackay TFC, Aquadro CF (1997) Low mutation rates of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*. Nature Genetics 15: 99-102.

Schulman AH (2007) Molecular markers to assess genetic diversity. Euphytica 158: 313-321.

Secor DH, Busawon D, Gahagan B, Golet W, Koob E, Neilson J, Siskey M (2014) Conversion factors for Atlantic bluefin tuna fork length from measures of snout length and otolith mass. Collective Volumes of Scientific Papers - ICCAT 70: 364-367.

Secor D (2002) Inter-laboratory comparison of Atlantic and Mediterranean bluefin tuna otolith microconstituents. ICES Journal of Marine Science 59: 1294-1304.

Selkoe KA, Toonen RJ (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. Ecology Letters 9: 615-629.

Serapion J, Kucuktas H, Feng J, Liu Z (2004) Bioinformatic mining of type I microsatellites from Expressed Sequence Tags of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Marine Biotechnology 6: 364-377.

Shadwick RE, Syme DA (2008) Thunniform swimming: muscle dynamics and mechanical power production of aerobic fibres in yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). Journal of Experimental Biology 211: 1603-1611.

Shaltout M, Omstedt A (2014) Recent sea surface temperature trends and future scenarios for the Mediterranean Sea. Oceanologia 56: 411-443.

Shikano T, Ramadevi J, Shimada Y, Merilä J (2010) Utility of sequenced genomes for microsatellite marker development in non-model organisms: a case study of functionally important genes in nine-spined sticklebacks (*Pungitius pungitius*). BMC Genomics 11: 1-13.

Slate J, Hale MC, Birkhead TR (2007) Simple sequence repeats in zebra finch (*Taeniopygia guttata*) expressed sequence tags: a new resource for evolutionary genetic studies of passerines. BMC Genomics 8: 52.

Smedbol RK, Shelton PA, Swain DP, Fréchet A, Chouinard GA (2002) Review of population structure, distribution and abundance of cod (*Gadus morhua*) in Atlantic Canada in a species-at-risk context. Canadian Science Advisory Secretariat - Research document 082: 134.

Sorell JM, Varela JL, Goñi N, Macías D, Arrizabalaga H, Medina A (2017) Diet and consumption rate of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) in the Strait of Gibraltar. Fisheries Research 188: 112-120.

Stokesbury MJ, Teo SL, Seitz A, O'Dor RK, Block BA (2004) Movement of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) as determined by satellite tagging experiments initiated off New England. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 61: 1976-1987.

Sumaila UR, Huang L (2012) Managing bluefin tuna in the Mediterranean Sea. Marine Policy 36: 502-511.

Sundaray JK, Rasal KD, Chakrapani V, Swain P, Kumar D, Ninawe AS, Nandi S, Jayasankar P (2016) Simple sequence repeats (SSRs) markers in fish genomic research and their acceleration via next-generation sequencing and computational approaches. Aquaculture International 24: 1089-1102.

Syme DA, Shadwick RE (2002) Effects of longitudinal body position and swimming speed on mechanical power of deep red muscle from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). Journal of Experimental Biology 205: 189-200.

Szpiech ZA, Jakobsson M, Rosenberg NA (2008) ADZE: a rarefaction approach for counting alleles private to combinations of populations. Bioinformatics 24: 2498-2504.

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

Tautz D, Renz M (1984) Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. Nucleic Acids Research 12: 4127-4138.

Taylor NG, McAllister MK, Lawson GL, Carruthers T, Block BA (2011) Atlantic bluefin tuna: A novel multistock spatial model for assessing population biomass. PLoS ONE 6(12): e27693.

Teletchea F (2009) Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. Reviews in Fish Biology and Fisheries 19: 265-293.

Teo SLH, Boustany A, Dewar H, Stokesbury MJW, Weng KC, Beemer S, Seitz AC, Farwell CJ, Prince ED, Block BA (2007) Annual migrations, diving behavior, and thermal biology of Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus*, on their Gulf of Mexico breeding grounds. Marine Biology 151: 1-18.

Terova G, Gornati R, Rimoldi S, Bernardini G, Saroglia M (2005) Quantification of a glucocorticoid receptor in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) reared at high stocking density. Gene 357: 144-151.

Thompson J, Contin RF (1980) Electrophoretic study of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) from the eastern and western North Atlantic ocean. Bulletin of Marine Science 30(3): 727-731.

Thresher RE (1999) Elemental composition of otoliths as a stock delineator in fishes. Fisheries Research 43: 165-204.

Tong J, Wang Z, Yu X, Wu Q, Chu KH (2002) Cross-species amplification in silver carp and bighead carp with microsatellite primers of common carp. Molecular Ecology Notes 2: 245-247.

Tóth G, Gáspári Z, Jurka J (2000) Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and Analysis. Genome Research 10: 967-981.

Trumbić Ž (2015) Development and application of a DNA microarray fore gene expression profiling in captive Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L., 1758). Phd, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Croatia.

Tsuda Y, Sakamoto W, Yamamoto S, Murata O (2012) Effect of environmental fluctuations on mortality of juvenile Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*, in closed life-cycle aquaculture. Aquaculture 330-333: 142-147.

Turan C (2015) Microsatellite DNA reveals genetically different populations of Atlantic bonito *Sarda sarda* in the Mediterranean Basin. Biochemical Systematics and Ecology 63: 174-182.

Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012) Primer3 - new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Research 40: 2-12.

Uotani I, Saito T, Hiranuma K, Nishikawa Y (1990) Feeding habit of bluefin tuna *Tunnus thynnus* larvae in the western North Pacific Ocean. Nippon Suisan Gakkaishi 56: 713-717.

Uriarte A, Johnstone C, Laiz-Carrión R, García A, Llopiz JK, Shiroza A, Quintanilla JM, Lozano-Peral D, Reglero P, Alemany F (2018) Evidence of density-dependent cannibalism in the diet of wild Atlantic bluefin tuna larvae (*Thunnus thynnus*) of the Balearic Sea (NW-Mediterranean). Fisheries Research 212: 63–71.

Van Herwerden L, McIlwain J, Al-Oufi H, Al-Amry W, Reyes A (2006) Development and application of microsatellite markers for *Scomberomorus commerson* (Perciformes; Teleostei) to a population genetic study of Arabian Peninsula stocks. Fisheries Research 79: 258-266.

Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICROCHEKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Molecular Ecology Notes 4: 535-538.

Vanderlaan ASM, Hanke AR, Chassé J, Neilson JD (2014) Environmental influences on Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) catch per unit effort in the southern Gulf of St. Lawrence. Fisheries Oceanography 23: 83-100.

Varela JL, Rodríguez-Marín E, Ruiz M, Medina A (2014) Feeding habits of young bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) in the Bay of Biscay inferred from stomach-content and stable-isotope analyses. Marine Biodiversity Records 7: 1-6.

Varshney RK, Graner A, Sorrells ME (2005) Genic microsatellite markers in plants: features and applications. Trends in Biotechnology 23: 48-55.

Vasemägi A, Nilsson J, Primmer CR (2005) Expressed Sequence Tag-linked microsatellites as a source of gene-associated polymorphisms for detecting signatures of divergent selection in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Molecular Biology and Evolution 22: 1067-1076.

Vella A, Vella N, Karakulak FS, Oray I, Garcia-Tiscar S, de Stephanis R (2016) Population genetics of Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758), in the Mediterranean: implications for its conservation management. Journal of Applied Ichthyology 32: 523-531.

Viñas J, Tawil ME, Pla C (2001) Preliminary genetic analysis of Mediterranean bluefin tuna caught in Libyan waters. Collective Volumes of Scientific Papers - ICCAT 52: 797-802.

Viñas J, Pla C, Tawil NY, Hattour A, Farrugia AF (2003) Mitochondrial genetic characterization of bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) from three Mediterranean (Libya, Malta, Tunisia); and one Atlantic locations (Gulf of Cadiz). Collective Volume of Scientific Papers - ICCAT 55: 1282-1288.

Viñas J, Tudela S (2009) A validated methodology for genetic identification of tuna species (Genus *Thunnus*). PLoS ONE 4: e7606.

Viñas J, Gordoa A, Fernández-Cebrián R, Pla C, Vahdet Ü, Araguas RM (2011) Facts and uncertainties about the genetic population structure of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) in the Mediterranean. Implications for fishery management. Reviews in Fish Biology and Fisheries 21: 527-541.

Wagner AP, Creel S, Kalinowski ST (2006) Estimating relatedness and relationships using microsatellite loci with null alleles. Heredity 97: 336-345.

Walli A, Teo SLH, Boustany A, Farwell CJ, Williams T, Dewar H, Prince E, Block BA (2009) Seasonal movements, aggregations and diving behavior of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) revealed with archival tags. PLoS ONE 4: e6151.

Wang J (2018) Estimating genotyping errors from genotype and reconstructed pedigree data. Methods in Ecology and Evolution 9: 109-120.

Wang T, Luo Y, Small GM (1994) The POX1 gene encoding peroxisomal acyl-CoA oxidase in *Saccharomyces cerevisiae* is under the control of multiple regulatory elements. Journal of Biological Chemistry 269: 24480-24485.

Wang YW, Samuels TD, Wu YQ (2011) Development of 1,030 genomic SSR markers in switchgrass. Theoretical and Applied Genetics 122: 677-686.

Waples RS (2015) Testing for Hardy-Weinberg Proportions: have we lost the plot? Journal of Heredity 106: 1-19.

Ward RD (2006) The importance of identifying spatial population structure in restocking and stock enhancement programmes. Fisheries Research 80: 9-18.

Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PD (2005) DNA barcoding Australia's fish species. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 360: 1847-1857.

Ward RD (1995) Population genetics of tunas. Journal of Fish Biology 47: 259-280.

Wegner NC, Sepulveda CA, Aalbers SA, Graham JB (2013) Structural adaptations for ram ventilation: gill fusions in scombrids and billfishes. Journal of Morphology 274: 108-120.

Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. Evolution 38: 1358.

Wendelaar Bonga SE (1997) The stress response in fish. Physiological Reviews 77: 591-625.

Wren JD, Forgacs E, Fondon JW, Pertsemlidis A, Cheng SY, Gallardo T, Williams RS, Shohet RV, Minna JD, Garner HR (2000) Repeat polymorphisms within gene regions: phenotypic and evolutionary implications. The American Journal of Human Genetics 67: 345-356.

Wright S (1978) Evolution and the genetics of populations. University of Chicago Press, Chicago.

Wright S (1949) The genetical structure of populations. Annals of Eugenics 15: 323-354.

Yue GH, Ho MY, Orban L, Komen J (2004) Microsatellites within genes and ESTs of common carp and their applicability in silver crucian carp. Aquaculture 234: 85-98.

Zane L, Bargelloni L, Patarnello T (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. Molecular Ecology 11: 1-16.

Zohar Y, Mylonas CC, Rosenfeld H, de la Gándara F, Corriero A (2016) Reproduction, broodstock management, and spawning in captive Atlantic bluefin tuna. U: Benetti DD (ed.), Patridge GJ (ed.), Buentello A (ed.). Advances in tuna aquaculture. Elsevier, 159-188.

WEB IZVORI:

www.fishbase.org

www.efishalbum.com

www.pewtrusts.org

www.mps.hr

http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/

8. PRILOZI

Prilog A. Genotipovi svih uzoraka atlantske plavoperajne tune *T. thynnus* iz dva uzastopna uzgojna ciklusa na uzgajalištu u blizini južne strane otoka Brača u Jadranskom moru.

Neočitani genotipovi koji se nisu amplificirali ili su bili premali za očitavanje su označeni sa znakom upitnika (?)

	Tth1		Tth2		Tth3		Tth5		Tth11		Tth12		Tth13		Tth14		Tth15		Tth18		Tth19		Tth22		Tth23		Tth25	
UL09_1	116	124	165	173	102	106	221	221	175	177	145	145	206	206	265	265	126	126	234	243	190	190	261	264	270	270	149	158
UL09_2	116	116	169	169	102	114	221	221	175	175	143	143	210	230	265	265	126	126	237	243	190	190	258	264	268	272	149	158
UL09_3	116	116	169	169	110	114	221	221	175	175	145	145	214	230	265	265	126	126	249	255	190	190	261	261	272	272	155	158
UL09_4	116	116	169	169	102	110	221	221	173	177	145	147	206	206	265	265	126	126	240	249	190	193	261	261	270	270	152	161
UL09_5	116	116	165	165	102	110	221	221	177	177	145	145	214	214	265	265	126	126	243	243	190	193	255	261	272	272	149	152
UL09_6	120	128	169	169	106	106	221	221	175	175	145	147	206	210	265	265	126	126	237	249	190	190	264	264	270	272	149	158
UL09_7	116	116	169	169	102	106	221	221	175	177	145	145	210	210	265	265	126	126	234	237	190	190	261	261	270	272	149	158
UL09_8	116	116	169	173	102	110	221	221	175	177	145	147	206	208	265	265	126	126	234	243	190	193	264	270	268	272	149	152
UL09_9	124	124	169	169	102	110	221	221	173	175	145	147	214	214	265	265	126	129	237	240	190	190	261	261	272	274	149	158
UL09_10	116	120	169	169	102	114	221	221	173	175	145	147	220	232	265	265	126	126	240	243	190	193	261	261	270	270	149	149
UL09_11	116	116	169	169	102	106	221	221	175	177	143	147	220	220	265	265	126	126	240	243	190	190	261	261	270	272	149	152
UL09_12	116	120	169	173	102	110	221	221	175	175	143	147	210	210	265	265	126	126	243	246	190	190	261	261	272	272	158	158
UL09_13	116	120	169	169	102	114	221	221	177	177	145	145	214	214	265	265	126	126	249	249	190	190	261	264	272	272	152	158
UL09_14	116	116	169	169	106	110	221	221	175	177	143	145	216	216	265	265	126	126	240	240	190	190	261	261	270	272	149	152
UL09_15	116	116	169	169	102	110	221	221	175	177	147	147	210	212	265	265	126	129	240	246	190	190	261	261	270	272	149	149
UL09_16	116	116	169	173	102	110	221	226	177	177	145	147	216	232	265	265	126	126	243	246	193	193	261	261	272	272	152	155
UL09_17	116	116	169	169	102	106	221	221	175	177	143	145	206	230	265	265	126	126	234	240	190	193	261	267	272	272	158	158

UL09_18	116	116	169	169	102	110	221	221	175	177	143	145	206	206	265	265	126	126	243	246	190	193	255	261	270	270	149	149
UL09_19	116	116	169	169	102	110	221	221	177	177	143	145	206	230	?	?	126	129	240	240	190	190	261	261	270	272	149	149
UL09_20	116	116	169	169	102	110	221	221	177	177	145	147	224	224	265	265	126	126	243	243	190	190	261	264	270	272	149	155
UL09_21	116	116	169	169	102	106	221	221	177	177	145	145	206	210	265	265	126	126	243	246	190	190	261	261	270	272	152	155
UL09_22	116	116	169	169	102	110	221	221	173	177	143	145	212	230	265	265	126	126	243	249	190	190	261	264	272	274	149	155
UL09_23	116	116	169	169	102	114	221	221	175	177	145	147	208	208	265	265	126	126	243	246	190	190	261	267	270	272	149	149
UL09_24	116	120	169	169	102	110	221	221	175	177	145	145	216	226	265	265	126	126	243	249	190	190	261	261	272	272	149	152
UL09_25	116	124	165	173	102	110	221	221	175	177	143	143	208	208	265	265	126	126	237	261	190	190	261	267	270	272	152	158
UL09_26	116	116	169	169	102	110	221	226	175	175	145	147	208	208	265	265	126	126	243	246	190	193	261	267	270	270	149	161
UL09_27	116	116	169	169	102	110	221	221	175	177	143	145	?	?	265	265	126	126	234	249	190	193	261	261	270	272	152	155
UL09_28	116	116	169	173	102	110	221	221	175	175	141	147	200	230	265	265	126	126	243	249	193	193	261	264	272	272	149	158
UL09_29	116	116	169	169	102	106	221	221	173	177	143	145	210	210	265	265	126	126	237	255	190	193	261	261	272	272	149	158
UL09_30	108	112	169	169	102	110	221	226	175	177	147	147	208	210	265	265	126	126	243	252	190	190	261	267	272	272	149	158
UL09_31	108	116	169	169	102	114	221	221	175	177	141	147	206	228	265	265	126	126	237	243	193	193	261	264	272	274	149	152
UL09_32	116	116	169	169	102	114	221	221	173	175	143	145	226	228	265	265	126	126	243	243	190	190	261	261	268	272	158	158
UL09_33	108	116	165	169	102	106	221	221	175	177	145	147	230	232	265	265	126	129	243	243	190	190	261	261	270	272	149	152
UL09_34	116	116	169	169	102	110	221	221	175	177	145	147	206	210	265	265	126	126	249	255	190	193	261	264	272	272	152	152
UL09_35	116	128	169	169	102	114	221	221	175	177	147	147	206	206	265	265	126	126	243	246	190	190	261	261	270	270	149	152
UL09_36	116	120	169	169	102	110	221	221	175	175	145	145	206	206	265	265	126	126	237	246	184	190	261	261	270	272	158	158
UL09_37	108	116	169	169	102	110	221	221	173	177	145	145	210	210	265	265	126	126	243	243	190	190	261	267	268	270	158	158
UL09_38	112	120	169	173	102	114	221	221	175	175	145	147	216	230	265	265	126	126	246	246	190	190	261	261	272	272	158	161
UL09_39	116	116	169	169	102	110	221	221	173	175	145	147	210	210	265	265	126	129	252	258	190	190	264	264	272	272	149	155
UL09_40	116	116	165	169	102	114	221	221	175	175	145	147	206	206	265	265	126	126	243	246	190	193	261	267	270	272	152	152
UL09_41	116	120	169	169	102	106	221	221	175	175	143	145	?	?	265	265	126	126	234	243	190	193	261	261	270	272	152	158
UL09_42	116	116	169	169	102	110	221	221	175	177	141	145	210	214	265	265	126	126	243	246	190	190	261	261	272	272	149	152

UL09_43	116	116	169	173	102	110	221	221	175	177	143	145	?	?	265	265	126	126	243	243	190	190	261	264	272	272	152	152
UL09_44	112	116	169	169	102	110	221	221	175	177	147	147	214	226	?	?	126	126	237	246	190	190	261	264	272	272	155	158
UL09_45	112	116	169	169	102	106	221	221	175	177	143	145	224	230	265	265	126	126	246	255	190	190	261	264	272	272	152	152
UL09_46	116	116	165	169	102	110	221	221	175	175	143	145	206	210	265	265	126	129	243	243	190	190	258	261	270	272	149	152
UL09_47	116	120	169	169	102	110	221	221	175	175	141	143	226	226	?	?	126	126	246	246	190	190	261	261	270	272	152	161
UL09_48	116	116	169	169	102	110	221	221	175	177	145	147	208	210	?	?	126	126	237	240	190	190	261	264	?	?	149	158
UL09_49	116	116	165	169	102	114	221	221	173	177	145	145	228	230	?	?	126	126	246	252	190	190	261	264	270	272	149	158
UL09_50	116	120	169	169	102	110	221	226	175	177	143	145	214	232	265	265	126	129	237	246	190	190	261	261	272	272	152	152
UL09_51	116	120	169	169	102	110	221	221	175	175	143	145	206	210	265	265	126	126	243	243	193	193	261	261	270	272	152	152
UL09_52	116	116	169	169	102	110	221	221	175	175	145	145	208	224	265	265	126	126	243	246	190	190	261	267	272	272	149	158
UL09_53	116	116	169	173	102	110	221	221	175	177	143	145	210	210	265	265	126	126	243	255	190	190	261	261	270	270	149	149
UL09_54	116	124	169	169	98	106	221	221	177	177	145	147	212	212	265	265	126	129	243	243	190	190	261	261	270	272	152	152
UL09_55	116	120	169	169	102	110	221	221	175	177	145	147	206	222	?	?	126	129	243	252	190	193	261	264	270	272	155	161
UL09_56	116	132	169	169	102	110	221	226	173	175	143	145	206	206	265	265	126	126	234	240	190	190	261	264	272	272	149	155
UL09_57	116	116	169	169	102	110	221	221	175	177	143	145	212	224	?	?	126	126	243	252	190	190	261	261	270	270	149	149
UL09_58	112	124	169	169	102	102	221	221	177	177	141	143	212	212	265	?	126	126	240	255	190	193	261	261	270	272	149	161
UL09_59	116	116	169	169	102	114	221	221	173	175	147	147	206	210	?	?	126	126	246	246	190	190	261	264	270	272	152	158
UL09_60	108	116	169	169	102	110	221	221	177	177	143	145	206	206	265	265	126	126	237	243	190	193	258	261	270	272	155	155
UL09_61	116	116	169	169	102	110	221	221	175	177	143	145	206	206	?	?	126	126	240	246	190	190	261	264	270	270	149	155
UL09_62	116	124	169	169	102	110	221	221	177	177	147	147	216	232	?	?	126	126	243	249	190	190	261	261	270	272	149	155
UL09_63	116	124	169	169	102	102	221	221	173	177	143	147	206	206	265	265	126	126	240	243	190	193	261	261	270	272	149	158
UL09_64	116	124	169	169	102	102	221	221	173	177	143	147	206	206	265	265	126	126	240	243	190	193	261	261	270	272	149	158
UL09_65	116	124	169	169	102	110	221	221	177	177	143	145	206	230	?	?	126	126	240	243	190	190	261	261	272	272	158	158
UL09_66	116	116	169	169	102	110	221	221	175	175	143	145	210	212	265	265	126	126	243	246	190	190	261	261	272	274	155	158
UL09_67	116	116	169	169	102	106	221	221	177	177	143	147	228	230	?	?	126	126	243	243	190	193	261	267	270	272	149	158

UL09_68	116	136	165	169	102	106	221	221	175	177	145	145	206	210	?	?	126	126	243	243	190	190	261	261	270	272	158	158
UL09_69	116	120	169	169	98	110	221	221	177	177	143	147	226	226	268	265	126	126	243	246	190	190	261	261	272	272	149	149
UL09_70	116	116	169	169	102	110	221	221	175	177	143	145	228	230	265	265	126	126	243	249	190	193	261	261	268	270	149	158
UL09_71	112	136	169	173	110	114	221	221	175	177	141	143	206	206	?	?	126	129	237	252	190	193	261	261	270	270	149	149
UL09_72	116	116	169	169	102	110	221	226	175	177	145	147	206	230	265	265	126	126	?	?	190	190	261	261	272	272	149	158
UL09_73	108	116	169	169	102	102	221	221	175	175	145	147	206	212	265	265	126	126	243	246	190	190	261	261	272	274	149	149
UL09_74	116	116	169	169	102	110	221	226	175	177	145	147	206	230	265	265	126	126	?	?	190	190	?	?	272	272	149	158
UL09_75	116	116	169	169	102	114	221	221	177	177	145	147	228	230	265	265	126	126	246	246	190	190	261	261	272	272	149	152
UL09_76	116	116	169	169	102	114	221	221	175	177	145	145	?	?	265	265	126	126	243	249	190	190	264	264	272	272	149	149
UL09_77	116	116	169	169	102	110	221	221	175	177	141	147	206	230	265	265	126	126	237	243	190	190	261	270	270	272	152	167
UL09_78	116	116	169	173	102	106	221	221	175	177	145	147	206	210	265	265	126	126	237	246	190	190	261	264	268	272	158	158
UL09_79	112	116	165	169	102	110	221	221	175	171	143	145	206	206	265	265	126	126	240	243	190	190	261	267	272	272	158	158
UL09_80	116	128	169	169	102	114	221	221	175	177	143	145	210	234	265	265	126	126	243	246	190	190	261	261	270	272	158	158
UL09_81	116	116	165	169	102	110	221	221	177	177	143	145	236	236	265	268	126	126	243	243	190	193	261	264	270	270	158	158
UL09_82	116	136	165	169	102	114	221	226	177	177	143	145	214	230	265	268	126	126	237	243	193	193	261	264	270	270	158	158
UL09_83	116	124	169	173	102	110	221	221	173	177	145	147	206	236	?	?	126	126	237	243	190	190	261	261	270	272	149	158
UL09_84	116	116	169	169	102	110	221	221	173	177	143	143	210	210	265	265	126	126	240	240	190	190	261	261	272	274	152	158
UL09_85	116	116	169	173	102	110	221	221	173	175	145	145	?	?	265	265	126	126	243	249	190	193	261	261	270	270	158	158
UL09_86	116	116	169	169	102	106	221	221	177	177	147	147	?	?	265	265	126	126	243	249	184	190	261	261	270	272	149	158
UL09_87	116	116	169	169	102	114	221	221	175	177	143	147	?	?	265	265	126	126	237	240	190	190	261	261	270	272	158	158
UL09_88	116	116	169	169	110	114	216	221	175	177	145	147	?	?	265	265	126	126	243	243	190	193	261	264	272	274	149	152
UL09_89	112	116	169	173	102	110	221	221	175	177	145	145	210	214	265	265	126	126	240	243	190	190	261	264	270	272	152	158
UL09_90	116	116	169	173	102	110	221	221	?	?	145	147	210	220	265	265	126	126	240	243	190	193	261	264	270	270	155	158
UL09_91	116	128	169	173	102	106	221	221	175	177	143	147	210	220	265	265	126	126	240	240	190	193	261	261	270	274	155	158
UL09_92	116	116	169	173	102	106	221	226	175	175	145	145	212	214	265	265	126	126	237	255	190	193	261	261	272	274	149	152

UL09_93	116	116	169	169	102	110	221	221	175	177	145	145	216	234	?	?	126	126	243	249	190	193	261	261	272	272	149	158
UL09_94	112	116	169	173	102	114	221	221	173	175	141	143	206	206	265	265	126	126	243	246	190	190	261	267	272	272	149	152
UL09_95	116	120	169	169	102	110	221	221	175	177	143	147	220	222	265	265	126	126	237	243	190	190	261	264	272	272	152	155
UL09_96	116	116	169	169	102	110	221	221	173	175	143	147	210	230	265	265	126	126	243	246	190	190	261	261	270	270	149	152
UL09_97	108	116	169	173	102	110	221	221	173	177	145	145	228	232	265	265	126	126	243	243	190	193	261	264	268	272	149	155
UL09_98	116	120	169	169	102	110	221	221	173	177	143	145	206	206	265	271	126	126	243	243	190	190	261	261	272	272	149	149
UL09_99	108	132	169	169	102	106	221	226	175	175	143	143	204	204	265	265	126	126	243	243	190	190	261	264	270	272	155	158
UL09_100	116	116	169	173	102	110	221	221	175	175	143	147	216	216	265	265	126	129	243	246	190	190	261	261	272	274	155	158
IZ11_101	112	112	165	173	102	110	221	221	175	175	143	143	210	212	265	265	126	126	237	243	190	190	261	261	270	272	158	161
IZ11_102	116	116	169	169	102	110	221	226	177	177	143	145	206	206	265	265	126	126	243	246	190	190	261	270	270	272	149	152
IZ11_103	112	112	169	173	102	110	221	226	175	175	141	147	206	206	265	265	126	126	243	243	190	190	261	261	270	272	149	158
IZ11_104	116	124	169	169	102	114	221	221	177	177	143	145	214	226	265	265	126	126	243	243	193	193	261	270	270	270	149	158
IZ11_105	116	116	169	173	102	110	221	221	175	177	143	143	214	214	265	265	126	126	240	243	190	190	261	264	270	272	155	155
IZ11_106	112	112	169	169	102	114	221	221	175	177	145	147	214	226	265	265	126	126	243	243	190	190	261	264	270	270	149	149
IZ11_107	116	116	169	169	102	110	221	221	175	177	145	147	210	212	265	265	126	126	243	246	190	190	261	261	270	274	149	149
IZ11_108	116	116	169	169	102	102	221	221	175	177	145	147	210	210	265	265	126	126	243	243	190	193	261	264	272	272	149	155
IZ11_109	116	120	169	169	102	110	216	221	177	177	143	145	212	212	265	265	126	126	243	249	190	190	264	264	270	272	149	158
IZ11_110	112	116	169	169	102	110	221	221	175	177	147	147	204	216	265	265	126	129	249	249	190	190	261	267	270	272	149	158
IZ11_111	116	116	169	169	102	106	221	221	177	177	143	145	210	226	265	265	126	126	237	243	193	193	261	261	272	276	152	152
IZ11_112	116	124	169	169	102	110	221	221	175	175	143	143	230	230	265	265	126	126	249	255	190	190	261	264	270	272	149	152
IZ11_113	116	120	169	169	102	110	221	221	175	175	143	143	206	212	265	265	126	126	240	243	190	193	261	261	270	272	149	149
IZ11_114	108	116	165	169	102	110	221	221	175	177	141	145	212	212	265	265	126	126	243	246	190	190	261	264	270	272	152	158
IZ11_115	112	116	165	169	102	106	221	221	173	175	143	145	206	230	265	265	123	126	243	243	184	190	261	261	270	272	149	149
IZ11_116	116	116	169	169	102	106	221	221	173	175	143	147	204	228	265	265	126	126	237	243	190	190	261	261	270	272	152	158
IZ11_117	108	116	169	169	102	110	221	221	173	177	141	143	228	230	265	265	126	126	243	243	190	190	261	261	270	272	149	155

IZ11_118	116	116	169	169	102	110	221	221	175	177	143	147	212	212	265	265	126	126	240	246	190	193	261	264	270	272	152	155
IZ11_119	116	124	169	173	102	110	221	221	177	179	143	147	212	214	265	265	126	126	234	249	190	190	261	264	270	272	152	155
IZ11_120	116	120	169	169	102	110	221	221	175	177	143	145	214	228	265	265	126	126	246	255	190	190	261	270	272	272	149	158
IZ11_121	116	124	169	169	102	110	221	221	175	177	147	147	212	228	265	265	126	126	243	246	190	193	261	261	270	272	149	152
IZ11_122	116	120	169	169	102	106	221	221	175	177	143	145	210	230	265	265	126	126	243	243	190	193	258	261	270	274	149	158
IZ11_123	108	124	169	169	102	110	221	221	175	175	143	145	216	216	265	265	126	126	240	243	190	193	261	261	272	272	149	152
IZ11_124	124	124	169	169	102	110	221	221	175	177	145	145	210	230	265	265	126	126	234	243	190	190	261	264	270	272	158	158
IZ11_125	112	116	169	169	102	114	221	221	175	177	143	145	202	202	265	265	126	129	243	246	190	190	261	261	270	272	149	152
IZ11_126	108	116	169	173	102	110	221	221	173	177	145	147	216	236	265	265	126	126	237	246	190	190	261	264	270	272	149	158
IZ11_127	116	120	169	169	102	106	221	221	175	177	143	145	214	230	265	265	126	126	246	261	190	190	261	261	270	270	149	161
IZ11_128	116	116	169	169	102	114	221	221	175	177	143	145	206	214	265	265	126	126	234	243	190	193	261	261	270	272	149	152
IZ11_129	116	116	169	169	102	114	216	221	175	177	143	145	212	212	265	265	126	126	237	237	190	193	261	261	272	272	152	152
IZ11_130	116	116	169	173	102	102	221	221	173	177	145	147	230	232	265	265	126	126	243	246	190	193	258	261	270	270	149	152
IZ11_131	120	120	169	169	102	110	221	221	175	177	145	147	210	214	265	265	126	129	243	246	193	193	261	261	270	272	149	155
IZ11_132	116	116	169	169	102	110	221	221	173	177	145	145	230	232	265	265	126	129	243	249	190	190	261	264	272	272	152	158
IZ11_133	116	120	169	169	102	102	221	221	175	177	143	145	206	206	265	265	126	126	243	255	190	190	261	261	272	272	149	158
IZ11_134	112	116	169	169	102	106	221	221	175	175	145	145	206	208	265	265	126	126	240	243	190	190	261	261	270	272	152	158
IZ11_135	120	124	169	169	102	110	221	221	175	175	145	145	208	212	265	265	123	126	243	246	190	190	261	261	270	270	158	158
IZ11_136	116	120	165	169	106	110	221	221	175	177	145	145	?	?	265	265	126	126	240	243	190	190	261	261	270	272	155	158
IZ11_137	116	116	169	169	102	114	221	221	175	177	145	145	206	206	265	265	126	126	243	246	190	193	261	261	272	274	152	158
IZ11_138	116	116	169	169	102	110	221	221	175	177	145	147	208	208	265	265	126	129	243	243	190	193	261	264	270	272	152	158
IZ11_139	112	116	169	169	102	110	221	221	175	177	145	147	208	230	265	265	126	126	243	246	190	190	261	264	270	272	152	158
IZ11_140	112	112	169	169	98	114	221	221	175	177	141	143	230	230	265	265	126	126	240	243	190	193	261	264	272	272	149	158
IZ11_141	116	116	165	169	102	114	221	221	175	175	143	145	206	214	265	265	126	126	243	246	190	193	261	261	270	272	152	155
IZ11_142	116	116	165	169	102	110	221	221	175	175	143	145	206	228	265	265	126	126	237	249	190	193	261	261	270	272	149	152

IZ11_143	112	116	169	169	102	106	221	221	175	177	143	145	220	224	265	265	126	126	243	252	190	193	261	261	268	270	152	155
IZ11_144	116	116	169	169	102	110	221	221	175	177	145	147	206	206	265	265	126	126	246	249	190	190	258	261	270	272	149	152
IZ11_145	108	116	169	169	102	106	221	221	175	177	145	145	204	216	265	265	126	126	240	249	190	190	261	261	270	272	152	152
IZ11_146	116	116	169	169	102	110	221	226	175	177	143	145	230	236	265	265	126	129	237	249	190	190	261	261	272	272	149	161
IZ11_147	120	120	169	169	102	114	221	221	173	175	145	147	208	212	265	265	126	126	237	243	190	190	261	261	270	272	149	155
IZ11_148	116	116	169	169	102	114	221	221	175	177	145	147	210	214	265	265	126	126	243	243	190	190	264	270	270	270	152	158
IZ11_149	112	116	169	169	102	114	221	221	173	175	145	145	224	226	265	265	126	126	243	249	193	193	258	261	270	272	152	158
IZ11_150	116	128	169	169	102	110	221	221	175	177	141	143	216	216	265	265	126	126	243	243	190	190	261	261	272	272	149	158
IZ11_151	116	116	169	169	102	110	221	221	173	175	143	147	206	230	265	265	126	126	243	243	190	190	261	261	270	270	155	158
IZ11_152	120	124	169	169	102	114	221	221	177	177	141	143	206	232	265	265	126	126	237	246	193	193	261	264	268	274	158	164
IZ11_153	116	116	169	169	106	114	221	226	175	175	143	147	210	210	265	265	126	126	243	243	190	190	261	264	270	272	149	158
IZ11_154	116	116	169	177	102	110	221	221	173	177	143	147	210	216	265	265	126	126	234	237	190	190	261	264	272	272	155	158
IZ11_155	116	120	169	169	102	110	221	221	175	177	143	145	210	224	265	265	126	126	243	243	190	190	261	264	270	270	152	158
IZ11_156	116	124	169	169	102	110	221	221	175	175	143	145	206	232	265	265	126	129	234	243	190	190	264	264	270	270	149	155
IZ11_157	116	116	165	169	102	110	221	226	175	175	143	145	216	236	265	265	126	129	243	243	190	190	261	267	270	272	149	155
IZ11_158	116	116	169	169	102	110	221	221	173	175	143	145	212	224	265	265	126	126	243	246	193	193	261	267	270	272	149	152
IZ11_159	116	116	169	169	102	110	221	221	175	177	145	145	206	206	265	265	126	126	237	243	190	190	261	264	270	272	152	161
IZ11_160	116	120	165	169	102	106	221	221	175	177	145	147	206	206	265	265	126	126	237	261	190	193	261	261	272	272	149	158
IZ11_161	112	116	169	169	102	110	221	221	175	177	143	145	216	224	265	265	126	126	240	240	190	190	261	261	270	272	155	155
IZ11_162	116	128	169	169	102	114	221	221	175	177	143	145	214	230	265	265	126	126	243	243	193	193	261	261	270	270	152	158
IZ11_163	116	116	169	169	102	106	221	221	175	175	143	145	206	206	265	265	126	126	243	246	190	193	261	267	272	272	149	152
IZ11_164	112	116	165	169	102	110	221	221	175	177	145	145	204	206	265	265	126	126	243	249	190	190	261	264	270	272	149	152
IZ11_165	116	120	169	169	102	110	221	221	173	175	145	147	208	230	265	265	126	126	237	243	190	193	261	264	270	272	149	158
IZ11_166	116	120	169	169	102	110	221	221	175	175	145	147	210	234	265	265	126	126	234	246	190	193	261	261	270	272	152	158
IZ11_167	108	116	165	169	102	102	221	221	177	177	145	145	218	220	265	265	126	126	240	246	184	190	261	261	272	274	149	152

IZ11_168	116	116	169	169	102	102	221	221	175	175	143	147	206	212	265	265	126	126	243	243	190	193	258	261	272	272	149	149
IZ11_169	116	124	169	169	102	110	221	221	175	175	145	145	230	246	265	265	126	126	243	246	190	190	261	264	270	272	149	158
IZ11_170	116	124	169	169	102	106	221	221	175	175	145	147	210	210	265	265	126	126	252	258	190	190	261	261	270	272	149	152
IZ11_171	112	116	169	169	102	110	221	221	175	177	145	147	210	240	?	?	126	126	240	243	190	190	261	261	270	272	149	149
IZ11_172	116	120	169	169	102	114	221	221	173	177	145	145	206	212	265	265	126	126	237	243	190	193	261	270	270	272	155	158
IZ11_173	116	116	169	173	102	110	221	221	173	173	145	145	210	212	265	265	126	126	243	246	190	190	261	273	270	272	149	152
IZ11_174	116	116	169	169	102	110	221	226	175	177	145	145	206	230	265	265	126	126	240	243	190	193	261	264	270	272	152	158
IZ11_175	116	116	169	169	102	110	221	221	175	177	143	147	208	232	265	271	126	126	240	243	190	193	261	264	270	272	152	152
IZ11_176	116	116	165	169	102	110	221	221	173	175	143	145	212	214	265	265	126	126	240	240	190	190	261	267	270	272	155	158
IZ11_177	116	124	169	169	102	114	221	226	175	177	145	147	206	212	265	265	126	126	243	261	193	193	261	264	270	272	149	158
IZ11_178	116	124	169	173	102	110	221	226	175	177	145	145	208	232	265	265	126	129	234	249	190	193	261	264	270	272	149	152
IZ11_179	108	124	169	173	102	110	221	221	175	177	145	147	224	236	265	265	126	126	240	249	190	190	261	264	270	272	152	158
IZ11_180	116	124	169	169	102	110	221	221	173	177	145	145	210	220	265	265	126	129	237	243	190	193	261	264	270	272	149	158
IZ11_181	116	116	169	169	102	110	221	221	175	175	143	147	232	234	265	265	126	126	237	243	190	190	264	264	272	272	158	158
IZ11_182	116	116	169	169	102	110	221	221	175	177	145	145	206	208	265	265	126	126	243	246	190	190	261	264	272	272	152	158
IZ11_183	116	116	169	169	102	114	221	221	175	177	143	147	204	230	265	268	126	126	249	249	190	190	258	261	270	270	149	158
IZ11_184	116	116	169	169	102	110	221	221	175	175	145	145	224	230	265	265	126	126	243	246	190	190	261	261	272	272	149	155
IZ11_185	116	120	169	169	102	106	221	221	175	175	143	145	242	244	265	265	126	126	240	243	190	193	261	270	270	272	149	158
IZ11_186	116	116	169	169	102	110	221	221	175	177	143	145	212	232	265	265	126	126	240	246	190	190	261	264	270	272	149	158
IZ11_187	116	116	169	169	102	110	221	221	175	177	145	145	228	230	265	265	126	126	237	243	190	190	261	267	272	272	149	152
IZ11_188	116	120	169	169	102	110	221	221	175	177	143	145	?	?	265	265	126	129	237	249	190	190	261	264	270	272	149	152
IZ11_189	116	124	169	169	102	110	221	221	175	175	143	147	210	230	265	265	126	126	243	249	190	190	261	264	272	272	149	158
IZ11_190	116	132	169	173	102	110	221	221	177	177	143	145	210	210	265	265	126	135	246	249	184	190	261	264	270	272	152	158
IZ11_191	112	116	169	169	102	110	221	221	177	177	141	143	210	238	265	265	126	126	243	246	190	190	261	264	270	272	149	158
IZ11_192	116	124	169	169	102	110	221	221	173	177	143	147	206	232	265	265	126	129	243	243	190	193	261	261	270	270	158	158

IZ11_193	116	120	169	169	102	110	221	221	175	177	143	147	210	210	265	265	126	126	243	246	190	190	255	261	270	272	149	158
IZ11_194	116	128	169	169	102	110	216	221	177	177	143	147	210	226	265	265	126	126	243	246	190	193	264	267	270	272	149	155
IZ11_195	112	116	169	169	102	110	221	221	177	177	143	147	214	228	265	265	126	126	243	249	190	193	261	267	270	270	149	152
UL12_196	116	116	169	169	102	114	221	221	175	177	143	145	234	236	265	265	126	126	243	246	190	190	261	264	270	272	149	158
UL12_197	116	116	169	169	102	110	221	221	173	175	143	145	?	?	265	265	126	126	243	246	190	190	261	261	270	270	149	158
UL12_198	116	120	169	169	102	110	221	221	175	177	143	147	?	?	265	265	126	126	?	?	190	193	?	?	272	272	149	158
UL12_199	116	120	169	169	102	102	221	221	175	177	145	145	210	234	265	265	126	126	243	252	190	190	261	261	270	270	149	149
UL12_200	116	116	169	169	102	114	221	221	175	177	145	145	210	214	?	?	126	126	243	243	190	190	261	264	270	272	149	152
UL12_201	116	116	169	169	102	110	221	221	175	177	145	145	206	210	?	?	126	126	243	246	190	193	261	267	270	272	149	155
UL12_202	116	116	169	169	102	110	221	221	175	177	143	145	206	210	265	265	126	126	243	243	190	190	?	?	?	?	152	158
UL12_203	116	116	169	169	102	110	221	221	177	177	145	145	230	230	265	265	126	126	240	243	190	190	261	267	270	270	155	155
UL12_204	116	116	169	169	102	110	221	221	175	177	145	147	208	210	?	?	126	126	237	240	190	190	261	264	?	?	149	158
UL12_205	116	116	169	169	102	110	221	221	175	177	145	147	208	210	265	265	126	126	237	240	190	190	261	264	?	?	149	158
UL12_206	124	124	169	169	102	110	221	221	175	175	145	145	210	230	?	?	126	126	240	243	190	190	261	264	270	272	158	158
UL12_207	116	116	169	169	102	110	221	221	175	177	145	147	208	210	?	?	126	126	243	243	190	190	261	264	272	272	149	158
UL12_208	116	116	169	169	102	102	221	221	173	177	145	145	232	236	?	?	126	126	243	249	190	193	261	261	270	272	149	158
UL12_209	116	116	169	169	102	118	221	221	173	177	145	145	232	236	265	265	126	126	243	249	190	193	261	261	270	272	149	158
UL12_210	116	116	169	169	102	106	221	221	173	177	145	145	206	208	265	265	126	126	243	249	190	193	261	261	270	272	149	158
UL12_211	116	116	169	169	102	110	221	221	175	177	143	145	206	208	265	265	126	129	243	243	190	190	261	264	270	272	152	158
UL12_212	116	116	169	169	102	110	221	221	175	177	145	147	208	210	265	265	126	126	237	240	190	193	261	264	270	272	149	158
UL12_213	116	132	169	169	102	110	221	221	173	175	145	147	224	230	?	?	126	126	237	246	190	190	258	261	272	272	149	152
UL12_214	116	120	169	169	102	110	221	221	173	175	141	145	208	216	265	265	126	126	243	246	190	193	261	264	268	272	152	155
UL12_215	116	116	169	169	102	110	221	221	175	177	145	147	206	210	265	265	126	126	237	243	190	190	261	264	270	272	149	155
UL12_216	108	116	169	169	102	106	221	221	175	177	145	147	212	236	265	265	126	126	243	246	190	193	261	264	270	272	158	158
UL12_217	116	116	169	169	98	110	221	221	175	175	143	147	206	230	265	265	126	129	243	243	190	190	261	267	270	272	149	152

UL12_218	116	116	165	169	102	110	221	221	173	177	143	145	228	230	265	265	126	126	240	243	190	193	261	264	270	272	155	158
UL12_219	116	116	169	169	102	110	221	221	175	177	145	147	208	210	?	?	126	126	237	240	190	190	261	264	270	272	149	158
UL12_220	116	116	169	169	98	110	221	221	175	177	143	145	212	234	265	265	126	126	234	249	190	193	261	264	270	272	149	158
UL12_221	116	116	169	169	102	110	221	221	175	177	145	147	222	228	265	265	126	126	240	252	190	193	261	264	270	272	149	158
UL12_222	116	120	169	169	102	106	221	221	175	177	145	147	206	206	?	?	126	126	237	243	190	193	261	261	272	272	149	158
UL12_223	116	116	169	169	102	110	221	221	175	175	145	147	206	230	265	265	126	129	243	243	190	190	261	267	270	272	149	152
UL12_224	116	116	169	169	102	110	221	221	175	177	145	147	208	210	?	?	126	126	237	240	190	190	?	?	?	?	149	158
UL12_225	112	116	169	169	102	110	221	221	177	177	143	145	208	208	265	265	126	126	243	243	190	190	261	261	272	274	149	158
UL12_226	116	116	?	?	102	102	221	221	175	177	145	145	208	210	?	?	126	126	243	246	190	190	261	261	270	272	158	158
UL12_227	116	116	165	169	102	114	221	221	175	177	145	147	206	216	265	265	126	126	237	249	190	190	261	261	270	272	152	152
UL12_228	116	116	169	169	102	106	221	221	175	177	143	145	?	?	?	?	126	126	240	243	190	193	261	261	270	272	149	158
UL12_229	120	120	165	169	102	110	221	221	175	177	145	147	208	210	265	265	126	126	237	249	190	190	261	264	270	272	152	158
UL12_230	116	120	169	169	102	110	221	221	175	177	145	147	210	234	265	265	126	126	243	252	190	190	261	261	270	272	149	152
UL12_231	116	120	169	173	102	110	221	221	173	175	145	147	206	214	265	265	126	126	243	246	190	190	261	264	270	272	149	152
UL12_232	116	116	169	169	102	110	221	221	175	175	143	145	212	214	265	265	126	126	240	243	190	190	261	261	270	272	149	152
UL12_233	112	124	169	169	102	110	221	221	177	177	145	145	208	208	?	?	126	126	240	243	190	190	261	261	272	274	149	158
UL12_234	116	116	169	169	102	106	221	221	177	177	145	147	212	226	?	?	126	126	237	243	190	190	261	261	270	272	149	158
UL12_235	116	116	165	169	102	114	221	221	175	177	145	147	206	216	265	265	126	126	237	249	190	190	261	261	270	272	152	152
UL12_236	116	116	169	169	102	110	221	221	173	177	145	147	206	210	?	?	126	126	237	249	190	193	261	261	272	272	149	158
UL12_237	116	116	169	169	102	114	221	221	175	177	145	145	208	214	265	265	126	126	249	249	190	193	258	261	270	272	149	158
UL12_238	116	116	169	173	102	110	221	221	175	175	145	145	216	226	265	265	126	126	243	246	190	190	261	264	270	272	149	152
UL12_239	116	116	169	169	102	110	221	221	175	177	145	147	?	?	265	265	126	126	237	240	190	193	261	261	270	272	149	158
UL12_240	116	116	169	169	98	110	221	221	177	177	143	147	234	236	265	265	126	126	243	261	190	190	261	264	270	272	158	158
UL12_241	116	120	169	169	102	110	221	221	175	177	145	147	208	210	265	265	126	126	237	240	190	193	258	267	272	272	149	158
UL12_242	116	128	169	169	102	110	221	221	175	177	145	147	208	210	?	?	126	126	237	240	190	190	261	264	272	272	149	158

UL12_243	116	116	169	169	98	110	221	221	175	177	143	147	208	212	?	?	126	126	243	243	190	190	261	264	270	272	152	158
UL12_244	116	116	169	169	102	110	221	221	175	177	145	147	210	212	?	?	126	126	237	240	190	190	261	264	272	272	149	158
UL12_245	116	116	169	169	102	110	221	221	177	177	143	147	214	216	?	?	126	126	255	255	190	190	261	264	270	272	149	155
UL12_246	116	116	169	169	102	110	221	221	175	177	143	147	210	212	?	?	126	126	246	246	190	190	261	264	272	274	149	158
UL12_247	116	116	169	169	102	110	221	221	175	177	145	147	208	210	?	?	126	126	237	240	190	193	261	264	270	272	149	158
UL12_248	116	116	169	169	98	110	221	221	175	177	143	147	206	210	?	?	126	129	243	246	190	190	261	264	268	272	149	158
UL12_249	116	120	169	169	102	110	221	221	175	177	143	147	?	?	?	?	126	126	237	240	190	190	261	261	270	272	149	158
UL12_250	116	116	169	169	102	110	221	221	175	177	143	147	208	210	?	?	126	126	237	240	190	190	?	?	270	272	149	158
IZL14_251	116	116	169	169	102	110	221	221	173	177	143	145	210	210	265	265	126	126	243	246	190	190	264	264	272	272	152	158
IZL14_252	108	116	169	169	102	114	221	221	173	177	143	145	206	230	265	265	126	126	243	243	190	190	261	264	270	272	149	149
IZL14_253	116	116	165	169	98	110	221	226	175	177	145	145	208	210	265	265	126	126	243	255	190	190	261	267	272	276	155	161
IZL14_254	116	124	169	169	102	110	221	221	175	177	143	145	206	224	265	265	126	126	243	246	190	193	261	264	270	272	149	152
IZL14_255	116	124	169	169	102	110	221	221	175	177	145	147	206	240	265	265	126	126	246	249	190	193	261	261	270	272	149	155
IZL14_256	116	116	169	169	98	106	221	221	173	177	145	147	208	210	265	265	126	129	240	243	190	190	261	261	270	272	152	152
IZL14_257	116	116	165	169	102	106	221	221	173	177	145	149	210	210	265	265	126	126	243	246	190	190	261	264	268	272	149	158
IZL14_258	112	116	165	169	102	106	221	221	173	177	145	147	210	210	?	?	126	126	243	252	190	190	261	261	270	270	149	158
IZL14_259	116	116	169	169	98	110	221	221	175	177	143	145	210	212	265	265	126	126	237	246	190	190	261	264	270	272	149	158
IZL14_260	116	120	169	169	102	106	221	221	175	177	145	145	206	206	?	?	126	126	246	246	190	190	261	264	270	272	149	158
IZL14_261	116	120	169	169	102	106	221	221	175	177	143	145	208	210	265	265	126	126	240	243	190	193	261	264	270	272	149	158
IZL14_262	116	116	169	169	98	106	221	221	173	175	145	147	222	224	265	265	126	126	243	249	190	193	261	261	270	272	152	161
IZL14_263	116	116	169	169	102	106	221	221	173	175	145	147	214	216	265	265	126	126	237	246	190	190	261	261	270	274	149	152
IZL14_264	116	116	169	169	102	106	221	221	175	177	145	145	206	230	265	265	126	126	243	243	190	190	261	264	270	274	152	158
IZL14_265	116	124	169	169	102	110	221	221	175	177	143	145	220	226	265	265	126	126	243	246	190	193	261	264	270	272	149	152
IZL14_266	116	116	169	169	102	110	221	226	175	177	143	145	204	206	?	?	126	126	243	246	190	190	261	261	270	272	149	155
IZL14_267	116	120	169	173	102	106	221	221	175	177	143	145	?	?	265	265	126	126	237	243	190	190	261	261	268	272	149	149

IZL14_268	116	132	169	169	102	106	221	221	173	177	145	147	208	230	265	265	126	126	243	243	190	190	261	261	270	272	149	158
IZL14_269	116	116	169	169	102	110	221	221	175	177	145	147	210	212	265	265	126	126	237	249	190	190	261	264	270	272	149	155
IZL14_270	116	116	169	173	98	102	221	221	173	177	143	145	210	228	265	265	126	129	246	249	190	193	261	264	270	274	149	152
IZL14_271	112	116	169	169	102	114	221	221	175	177	143	143	214	224	265	265	126	126	243	249	190	193	261	261	268	272	152	155
IZL14_272	116	120	169	173	98	106	221	221	177	179	143	145	206	210	265	265	126	126	243	243	190	193	261	261	270	272	149	149
IZL14_273	116	120	169	169	98	106	221	226	171	173	143	147	206	208	265	265	126	126	234	243	190	190	261	261	270	272	152	155
IZL14_274	116	120	165	169	102	106	221	221	175	177	145	145	230	232	265	265	126	129	243	243	190	193	261	264	270	272	158	158
IZL14_275	116	124	165	169	102	114	221	221	173	175	143	145	?	?	265	265	126	126	246	252	190	190	261	264	270	272	155	158
IZL14_276	112	116	165	169	102	110	221	221	175	177	145	145	210	230	265	265	126	126	240	243	184	190	261	261	270	270	149	158
IZL14_277	116	116	165	169	102	106	221	226	173	177	145	145	?	?	265	265	126	126	240	249	190	193	261	261	272	272	149	158
IZL14_278	120	120	165	169	102	110	221	221	173	175	145	145	210	210	265	265	126	126	246	246	190	190	255	264	272	274	152	158
IZL14_279	112	112	169	169	102	106	221	221	173	175	145	147	206	230	265	265	126	126	243	243	190	193	261	264	268	270	149	158
IZL14_280	116	116	165	169	102	102	221	221	175	175	145	145	?	?	265	265	126	126	243	246	190	190	261	261	270	272	152	155
IZL14_281	116	116	169	169	102	110	221	221	177	177	143	143	206	206	?	?	126	129	240	249	190	190	261	261	268	270	149	161
IZL14_282	116	116	169	169	102	114	221	221	175	177	145	147	208	220	265	265	126	126	243	243	190	190	261	264	272	272	158	158
IZL14_283	116	116	169	169	102	110	221	221	173	175	145	147	206	210	265	265	126	126	237	243	190	190	258	264	272	272	152	155
IZL14_284	116	116	169	169	102	110	221	221	175	175	145	147	206	210	265	265	126	126	237	243	190	190	258	264	272	272	152	155
IZL14_285	116	116	169	173	102	106	221	221	175	175	145	145	228	230	265	265	126	126	243	249	190	190	261	261	270	270	149	158
IZL14_286	112	128	169	169	102	114	221	221	175	177	145	145	206	208	265	265	126	126	243	243	190	190	258	261	270	272	152	158
IZL14_287	116	128	169	169	102	110	221	221	175	177	145	147	210	210	?	?	126	126	237	246	190	190	261	261	272	272	149	158
IZL14_288	116	124	169	169	102	110	221	221	173	175	145	147	208	230	265	265	126	126	243	243	190	193	261	264	270	272	152	158
IZL14_289	116	116	169	173	102	110	221	221	175	177	145	145	230	232	265	265	126	126	243	246	190	190	261	261	270	272	149	152
IZL14_290	120	124	169	169	102	106	221	221	175	177	145	145	208	208	265	265	126	126	243	246	190	190	261	261	272	272	149	152
IZL14_291	116	120	169	169	102	106	221	221	177	177	145	145	206	210	265	265	126	126	243	246	190	190	261	261	270	272	152	152
IZL14_292	116	116	169	169	102	106	221	221	175	177	143	145	?	?	265	265	126	126	243	249	190	193	261	261	270	270	152	152

IZL14_293	116	124	169	169	102	110	221	221	177	177	143	145	204	212	265	265	126	126	237	243	190	190	261	261	270	270	149	152
IZL14_294	116	120	165	169	102	110	221	221	175	177	145	145	226	230	265	265	126	126	243	243	190	190	261	267	270	270	149	158
IZL14_295	108	108	169	169	102	114	221	221	173	175	145	145	226	232	265	265	126	126	240	243	190	190	261	261	272	272	158	161
IZL14_296	112	116	169	169	102	110	221	221	175	175	145	147	?	?	265	265	126	126	234	243	190	190	261	261	272	272	152	152
IZL14_297	112	116	169	169	102	106	221	221	177	177	143	145	210	212	265	265	126	126	243	243	190	193	258	261	270	270	149	152
IZL14_298	108	116	169	169	102	106	221	221	175	177	143	145	?	?	265	265	126	126	240	243	190	190	261	264	270	272	149	158
IZL14_299	116	116	169	169	102	110	221	221	175	177	145	145	222	232	265	265	126	126	243	246	190	190	261	261	270	272	158	158
IZL14_300	116	116	169	169	102	102	221	221	175	177	145	145	214	236	265	265	126	126	243	243	190	190	258	261	270	272	155	161
IZL14_301	116	120	169	173	102	110	221	221	175	177	143	145	210	214	265	265	126	126	237	249	190	190	261	264	270	272	149	158
IZL14_302	116	124	169	169	102	114	221	221	171	175	145	147	224	236	265	265	126	126	234	249	184	190	261	261	270	272	149	158
IZL14_303	112	116	169	169	102	106	221	221	173	177	145	151	210	212	265	265	126	129	240	243	190	190	261	261	272	272	152	158
IZL14_304	116	116	169	169	102	110	221	221	175	175	145	147	208	210	265	265	126	126	237	246	190	190	261	261	270	272	152	158
IZL14_305	116	116	169	169	98	110	221	221	175	177	145	147	208	210	?	?	126	126	243	243	190	190	261	264	?	?	149	152
IZL14_306	116	116	169	169	102	106	221	221	173	175	143	145	206	230	?	?	126	126	243	246	190	193	264	270	270	272	149	152
IZL14_307	116	116	169	169	102	114	221	221	175	175	145	145	230	232	?	?	126	126	243	246	190	193	264	264	272	272	149	152
IZL14_308	116	116	169	169	102	114	221	221	173	175	145	145	210	212	265	265	126	126	243	249	190	190	261	264	270	270	155	158
IZL14_309	108	116	169	169	102	110	221	226	175	179	143	145	208	208	265	265	126	126	243	246	190	190	261	261	272	272	152	158
IZL14_310	108	116	169	173	102	114	221	221	175	177	143	145	210	210	265	265	126	126	243	252	190	193	261	261	270	272	158	158
IZL14_311	120	124	169	169	102	114	221	221	175	175	143	145	226	228	265	265	126	126	240	246	193	193	261	267	270	272	155	158
IZL14_312	116	116	169	169	102	110	221	221	177	177	143	143	216	216	265	265	126	126	243	243	184	193	261	261	270	270	149	149
IZL14_313	116	128	169	173	102	110	221	221	173	177	145	145	206	230	265	265	126	126	237	249	190	193	261	264	270	272	149	152
IZL14_314	112	116	169	169	102	106	221	221	175	177	145	145	206	228	265	265	126	126	243	246	190	190	261	264	270	272	149	155
IZL14_315	116	120	169	169	102	114	221	226	175	177	147	147	206	206	265	265	126	126	243	243	190	193	264	264	270	272	158	158
IZL14_316	116	116	169	169	102	110	221	221	177	177	145	145	210	216	265	265	126	126	243	261	190	193	261	264	270	272	152	158
IZL14_317	116	120	165	169	102	114	221	221	175	177	145	145	206	206	265	265	126	126	237	243	190	193	261	264	272	272	149	158

IZL14_318	112	112	165	169	102	110	221	221	173	175	145	145	?	?	265	265	126	126	243	243	190	190	261	261	268	272	152	158
IZL14_319	112	116	165	169	102	114	221	221	175	177	145	145	210	230	265	265	126	126	246	249	190	190	261	261	272	272	149	158
IZL14_320	116	116	169	169	102	106	221	221	177	177	145	147	228	230	265	265	126	126	243	243	190	190	261	264	270	272	158	161
IZL14_321	116	116	165	169	102	110	221	221	177	177	145	147	206	206	265	265	126	126	240	252	190	190	261	273	268	272	149	161
IZL14_322	116	116	169	169	102	114	221	221	175	177	145	145	206	230	265	265	126	126	243	246	190	190	261	261	270	272	155	158
IZL14_323	120	124	169	169	102	110	221	221	175	175	143	145	206	210	265	265	126	126	234	246	190	193	261	261	270	272	152	152
IZL14_324	112	112	169	169	102	114	221	221	173	177	145	145	210	210	265	265	126	126	237	243	190	193	261	261	272	272	149	155
IZL14_325	116	116	169	169	102	110	221	221	175	177	145	147	208	210	265	265	126	126	237	240	190	190	261	264	270	272	149	158
IZL14_326	116	116	169	169	98	110	221	221	175	177	143	147	210	230	265	265	126	126	237	240	190	193	261	264	270	272	149	158
IZL14_327	116	124	169	169	102	110	221	221	175	177	143	147	210	210	?	?	126	126	237	240	190	193	261	264	270	272	149	158
IZL14_328	116	116	169	169	102	110	221	221	175	177	143	147	210	212	265	265	126	126	237	243	190	193	261	264	272	272	149	158
IZL14_329	116	120	169	169	98	110	216	221	175	177	143	147	210	216	?	?	126	126	240	246	190	190	261	264	272	272	149	158
IZL14_330	116	116	169	169	102	110	221	221	175	177	143	147	208	210	265	265	126	126	237	240	190	190	261	264	270	272	149	158
IZL14_331	116	120	169	169	102	110	221	221	175	177	143	147	?	?	265	265	126	126	237	240	190	190	261	264	270	272	149	158
IZL14_332	112	116	169	169	102	110	221	221	175	177	143	147	208	210	?	?	126	126	240	249	190	193	261	264	272	272	149	158
IZL14_333	116	116	169	169	102	110	221	221	175	177	143	147	210	228	265	265	126	126	243	243	190	193	261	261	270	272	149	158
IZL14_334	116	120	169	169	102	110	221	221	175	177	143	147	206	210	265	265	126	126	237	240	190	190	261	264	270	272	149	158

Prilog B. Usporedba broja alela po lokusima u kodirajućim i UTR regijama atlantske plavoperajne tune *T. thynnus* iz dva uzastopna uzgojna ciklusa na uzgajalištu u blizini južne strane otoka Brača u Jadranskom moru

	Kodirajuća regija		UTR regija
Lokus	Broj alela	Lokus	Broj alela
Tth1	8	Tth3	6
Tth2	4	Tth11	5
Tth5	3	Tth12	7
Tth15	4	Tth13	19
Tth22	7	Tth18	10
Tth25	7	Tth19	3
		Tth23	5
$\bar{x}$	5,5	$\bar{x}$	7,8

9. **ŽIVOTOPIS**

Ime i Prezime: Ivana Radonić

Datum i mjesto rođenja: 08.03.1988., Split, Hrvatska

Kontakt: +385 (0)95 532 6885; radonic@izor.hr

Obrazovanje:

- 2006. godine završila 1. Jezičnu gimanziju (klasični smjer) u Splitu
- 2009. godine prvostupnica biologije i ekologije mora na Odjelu za studije Mora Sveučilišta u Splitu
- 2012. godine magistra biologije i ekologije mora na Odjelu za studije Mora Sveučilišta u Splitu
- 2012. godine upisala poslijediplomski studij na Sveučilištu u Zagrebu, Prirodoslovno matematički fakultet, Biološki odsjek

Radno iskustvo:

- 2013-2014 Stručno osposobljavanje za rad bez zasnivanja radnog odnosa (Institut za oceanografiju i ribarstvo, Split, Laboratorij za akvakulturu)
- 2014- 2015 Stručni suradnik na projektu Bioaqua; EU: European Social Found (ESF) (Institut za oceanografiju i ribarstvo, Split, Laboratorij za akvakulturu)
- 2016- sada Stručni suradnik na projektu AdriaMed (Institut za oceanografiju i ribarstvo, Split, Laboratorij za ribarstvenu biologiju i gospodarenje pridnenim i pelagičnim naseljima)

Znanstveni radovi:

1) Mladineo, Ivona; Bušelić, Ivana; Hrabar, Jerko; **Radonić, Ivana**; Vrbatović, Anamarija; Jozić, Slaven; Trumbić, Željka. Autochthonous bacterial isolates successfully stimulate in vitro peripheral blood leukocytes of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) *// Frontiers in Microbiology*, 7 (2016), 1244-11. doi:10.3389/fmicb.2016.01244 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

2) Mladineo, Ivona; Trumbić, Željka; **Radonić, Ivana**; Vrbatović, Anamarija; Hrabar, Jerko; Bušelić, Ivana. *Anisakis simplex complex*: ecological significance of recombinant genotypes in an allopatric area of the Adriatic Sea inferred by genome-

derived simple sequence repeats // *International journal for parasitology*, 47 (2017), 215-223.
doi:10.1016/j.ijpara.2016.11.003 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

3) Mladineo, Ivona; Bušelić, Ivana; Hrabar, Jerko; Vrbatović, Anamarija; **Radonić, Ivana.** Population parameters and mito-nuclear mosaicism of *Anisakis* spp. in the Adriatic Sea // *Molecular and biochemical parasitology*, 212(2017), 46-54.
doi:10.1016/j.molbiopara.2017.01.003 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima:

1) **Radonić, Ivana**; Trumbić, Željka; Šegvić-Bubić, Tanja; Grubišić, Leon; Mladineo, Ivona. Genetska analiza populacije atlantske plavoperajne tune, *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758) u kaveznom uzgoju primjenom mikrosatelitnih lokusa // *Abstract Book of the 12th Croatian Biological Congress with International Participation* / Sveti Martin na Muri, Hrvstska, 2015. str. 278-278 (poster, sažetak, znanstveni).

2) **Radonić Ivana**; Cvitković Ivan; Despalatović Marija. Rasprostranjenost, abundancija i razmnožavanje vrste *Siphonaria pectinata* (Gastropoda, Pulmonata) na području Marjana // *Abstract Book of the 12th Croatian Biological Congress with International Participation* / Sveti Martin na Muri, Hrvatska, 2015. str. 211-211 (poster, sažetak, znanstveni).

3) **Radonić, Ivana**; Vrbatović, Anamarija; Hrabar, Jerko; Bušelić, Ivana; Jozić, Slaven; Mladineo Ivona. Respiratory burst and phagocytic activity of peripheral blood leukocytes of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stimulated by three autochthonous and a commercially available bacteria // *Book of Abstracts of 6th Croatian Congress of Microbiology* / Roberto Antolović (ur.). Sveti Martin na Muri, Hrvatska, 2016. str. 44-44 (predavanje, domaća recenzija, sažetak, znanstveni)

4) **Radonić, Ivana**; Trumbić, Željka; Šegvić- Bubić, Tanja; Grubišić, Leon; Mladineo, Ivona. Populacijska analiza atlantske plavoperajne tune, *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758) u kaveznom uzgoju primjenom mikrosatelitskih lokusa // *Simpozij studenata doktorskih studija* PMF-a / Primožič, Ines; Hranilović Dubravka (ur.). Zagreb, Hrvatska, 2016. str. 59-60 (poster, sažetak, ostalo)

5) **Radonić, Ivana**; Trumbić, Željka; Šegvić-Bubić, Tanja; Grubišić, Leon; Mladineo, Ivona. Population analysis of cage-reared Atlantic bluefin tuna, Thunnus thynnus (Linnaeus, 1758) by application of microsatellite loci *// Simpozij studenata doktorskih studija* PMF-a / Primožič, Ines (ur.). Zagreb, Hrvatska, 2018, str. 48-48 (poster, sažetak, ostalo)

6) **Radonić Ivana**, Zorica Barbara, Čikeš Keč Vanja, Vuletin Vedran, Ezgeta- Balić Daria. Preliminary estimate of anchovy *Engraulis encrasicolus* (Linnaeus, 1758) spawning frequency and batch fecundity in the Adriatic Sea. // *Abstract Book of the 13th Croatian Biological Congress with International Participation* / Poreč, Hrvatska, 2018. str. 249-249 (poster, sažetak, znanstveni)

7) Lepen Pleić, Ivana; Ferri, Josipa; Trumbić, Željka; Petrić, Mirela; Pezelj, Roko; **Radonić, Ivana**; Vladislavić Stanić, Nikolina; Oraić, Dražen; Zrnčić, Snježana; Mladineo, Ivona. Effect of mixture composed of β glucanes and mos on the immunological parameters in the reared European sea bass *// Abstract book of the 16th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish* / Garcia, Jose (ur.). Helsinki: Nykypaino, Finska, 2013. str. 267-267 (poster, sažetak, znanstveni)

8) Lepen Pleić I, Ivana; Ferri, Josipa; Petrić, Mirela; Pezelj, Roko; **Radonić, Ivana**; Vladislavić Stanić, Nikolina; Oraić, Dražen; Zrnčić, Snježana; Mladineo, Ivona. Effect of Vetregard on the immunological parameters in the reared European seabass *// 1st International conference of fish and shellfish imunology. Book of abstracts* / Novoa, Beatriz ; Dios, Sonia ; Figueras, Antonio (ur.). Vigo, Španjolska, 2013. str. 1717-1718 (poster, sažetak, znanstveni)

9) Bušelić, Ivana; Hrabar, Jerko; Čalić, Antonela; **Radonić, Ivana**; Poljak, Vedran; Mladineo, Ivona. Risk factor analysis of human infection with Anisakis spp. in the European anchovy and sardine from the Eastern Adriatic Sea *// Abstract Book of the 17th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish* / Mladineo, Ivona (ur.). Las Palmas de Gran Canaria, Španjolska, 2015. str. 165-165 (predavanje, sažetak, znanstveni)

10) Bušelić, Ivana; Hrabar, Jerko; Čalić, Antonela; **Radonić, Ivana**; Poljak, Vedran; Mladineo, Ivona. Risk assessment of human infection with *Anisakis* spp. in the European anchovy and sardine from the Eastern Adriatic Sea // *9th International Symposium on Fish Parasites Book of Abstracts*/ Valencia, Španjolska, 2015. str. 138-138 (poster, sažetak, znanstveni)

11) Hrabar, Jerko; Bušelić, Ivana; **Radonić, Ivana**; Poljak, Vedran; Mladineo, Ivona. *Anisakis* spp. from large pelagic fish off Eastern Adriatic - molecular identification and risk analysis // *Abstract Book of the 17th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish* / Mladineo, Ivona (ur.). Las Palmas de Gran Canaria, Španjolska, 2015. str. 166-166 (predavanje, sažetak, znanstveni)

12) Hrabar, Jerko; Bušelić, Ivana; **Radonić, Ivana**; Poljak, Vedran; Mladineo, Ivona. *Anisakis* spp. and valuable large pelagic fish off Eastern Adriatic – epidemiology, molecular identification and risk analysis // *9th International Symposium on Fish Parasites Book of Abstracts* / Valencia, Španjolska, 2015. str. 145-145 (poster, sažetak, znanstveni)

13) Hrabar, Jerko; Bušelić, Ivana; Vrbatović, Anamarija; **Radonić, Ivana**; Jozić, Slaven; Mladineo, Ivona. Autochthonous intestinal *Enterovibrio* sp. or commercial *Lactobacillus casei*: Which one fits better as an immunostimulator in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)? // *Book of Abstracts of 6th Croatian Congress of Microbiology* / Roberto Antolović (ur.). Sveti Martin na Muri, Hrvatska, 2016. str. 48-48 (predavanje, domaća recenzija, sažetak, ostalo)

14) Bušelić, Ivana; Hrabar, Jerko; Vrbatović, Anamarija; **Radonić, Ivana**; Jozić, Slaven; Mladineo, Ivona. Expression of immune markers in in vitro stimulated peripheral blood leukocytes of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) by autochthonous intestinal Alteromonas sp. and Pseudoalteromonas sp. // *Book of Abstracts of 6th Croatian Congress of Microbiology* / Roberto Antolović (ur.). Sveti Martin na Muri, Hrvatska, 2016. str. 77-77 (poster, domaća recenzija, sažetak, ostalo)

15) Bušelić, Ivana; Hrabar, Jerko; **Radonić, Ivana**; Mladineo, Ivona. Population and genetic structure of *Anisakis* spp. from fish landed at local market of Island of Korčula, Adriatic Sea *// 46th WEFTA Conference Book of Abstracts* / Vidaček, Sanja; Bandarra, Narcisa; Careche, Mercedes; Halldórsdóttir, Sigrún M.; Luten, Joop; Undeland, Ingrid (ur.). Split, Hrvatska, 2016. str. 161-161 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

16) Bušelić, Ivana; Hrabar, Jerko; **Radonić, Ivana**; Vrbatović, Anamarija; Jozić, Slaven; Trumbić, Željka; Mladineo, Ivona. Sea bass autochthonous bacterial isolates as potential probiotics for aquaculture: in vitro stimulation of host peripheral blood leukocytes *// Abstract Book of the 18th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish* / Mladineo, I. (ur.). Belfast, Ujedinjeno Kraljevstvo, 2017. str. 93-93 (predavanje, sažetak, znanstveni)

17) Mladineo, Ivona; Trumbić, Željka; **Radonić, Ivana**; Vrbatović, Anamarija; Hrabar, Jerko; Bušelić, Ivana. Development of new genome-derived simple sequence repeats (SSRs) for *Anisakis simplex* s.s. and *Anisakis pegreffii // Abstract Book of the 18th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish* / Mladineo, Ivona (ur.). Belfast, Sjeverna Irska, 2017. str. 242-242 (poster, sažetak, znanstveni)