

UNIVERZITET CRNE GORE  
PRIRODNO–MATEMATIČKI FAKULTET

Mr Dragana Milošević

**MORFOLOŠKA, EKOLOŠKA I GENETIČKA DIFERENCIJACIJA  
VRSTA RODA *RUTILUS* RAFINESQUE, 1820  
(TELEOSTEI, CYPRINIDAE) IZ SKADARSKOG JEZERA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Podgorica, 2012.



Мат IV 2412

37055

Инв. бр. \_\_\_\_\_

## INFORMACIJE O DOKTORANTU

Ime i prezime: Dragana Milošević

Datum i mjesto rođenja: 25.02.1978. godine, Podgorica

Naziv završenog  
postdiplomskog studijskog programa: Biološki fakultet, Beograd  
smjer - Citologija

Godina završetka: 2005.

## INFORMACIJE O DOKTORSKOJ DISERTACIJI

Naziv doktorskih studija: Biologija

Naslov teze: Morfološka, ekološka i genetička  
diferencijacija vrsta roda *Rutilus*  
Rafinesque, 1820 (Teleostei, Cyprinidae)  
iz Skadarskog jezera

Fakultet na kojem je  
disertacija odbranjena: Prirodno-matematički fakultet,  
Univerzitet Crne Gore

## UDK, OCJENA I ODBRANA DOKTORSKE DISERTACIJE

Datum prijave doktorske teze: 7.11.2008. godine

Datum sjednice Senata Univerziteta  
na kojoj je prihvaćena teza: 26.02.2009. godine

Komisija za ocjenu podobnosti  
teze i kandidata: Dr Branko Radujković, red. prof. PMF-a,  
Univerzitet Crne Gore  
Dr Drago Marić, red. prof. PMF-a,  
Univerzitet Crne Gore  
Dr Marijana Krivokapić, vanred. prof. PMF-a  
Univerzitet Crne Gore

Mentor: Dr Drago Marić, red. prof. PMF-a,  
Univerzitet Crne Gore

Komisija za ocjenu  
doktorske disertacije: Dr Drago Marić, red. prof. PMF-a,  
Univerzitet Crne Gore  
Dr Vladimir Pešić, vanred. prof. PMF-a,  
Univerzitet Crne Gore  
Dr Predrag Simonović, red. prof.  
Biološki fakultet Beograd  
Dr Sreten Mandić, naučni savjetnik IBM  
Univerzitet Crne Gore  
Dr Aleksandar Joksimović, naučni saradnik IBM  
Univerzitet Crne Gore

Komisija za odbranu  
doktorske disertacije: Dr Drago Marić, red. prof. PMF-a,  
Univerzitet Crne Gore  
Dr Vladimir Pešić, vanred. prof. PMF-a,  
Univerzitet Crne Gore  
Dr Predrag Simonović, red. prof.  
Biološki fakultet Beograd  
Dr Sreten Mandić, naučni savjetnik IBM  
Univerzitet Crne Gore  
Dr Aleksandar Joksimović, naučni saradnik IBM  
Univerzitet Crne Gore

Datum odbrane: 16.01.2012. godine

A scroll with a light beige, textured surface, unrolled to reveal text. The scroll is held by two dark, cylindrical rods on the left and right sides. The text is centered and written in a black, serif font.

*Uvek je očiglednija celina nego deo celine.  
Ovo svakako zbog smislenosti i celishodnosti celine.*

*Vladika Nikolaj Velimirović*

*"Misli o dobru i zlu"*



## ZAHVALNICA

*Svaka riječ ove disertacije nosi zahvalnost onima koji su mi svako na svoj način olakšali rad i time doprinijeli da ona i ugleda svjetlost dana.*

*Neizmjernu zahvalnost dugujem svom profesoru i mentoru Prof. dr Dragu Mariću na izboru teme koja mi je omogućila da proširim oblast svojih dosadašnjih istraživanja i istovremeno dala mogućnost da upotrijebim i ne zanemarim do sada stečena znanja. Ističem njegovo ukazano povjerenje, posvećeno vrijeme, ustupljenu literaturu i pomoć prilikom terenskih istraživanja.*

*Zahvaljujem se Prof. dr Stevenu Weissu sa Instituta za Zoologiju, Karl-Franzens Univerziteta u Gracu, koji je prihvatio mentorstvo nad segmentom istraživanja koje sam odradila na pomenutom Univerzitetu, što mi predstavlja i posebnu čast. Njegova pomoć, sugestije i savjeti su mi pomogli da kvalitet istraživanja podignem na viši nivo.*

*Prof. dr Trajče Talevski mi je pružio veliku pomoć pri uzorkovanju materijala sa Prespanskog i Ohridskog jezera i pružio svesrdnu podršku tokom čitavog istraživanja. Na tome mu se najiskrenije zahvaljujem.*

*Želim da se zahvalim i mr Nikoli Pejoviću na povjerenju i pomoći, omogućivši mi rad u laboratoriji za patologiju Specijalističke Veterinarske ustanove u Podgorici.*

*Hvala:*

*Prof. dr Vladimiru Pešiću na konstantnoj podršci, savjetima i sugestijama.*

*Dr Danki Petrović koja je na sebi svojstven način bila važna karika u realizaciji ovog rada i koja je uvijek nalazila, za mene prave riječi i savjete.*

*Dr Sandri Kovačević na svim prijateljskim postupcima i stručnim sugestijama koje mi je uputila od prvog koraka ovog istraživanja do poslednjeg slova rada.*

*Dr Kathrin Winkler sa Instituta za Zoologiju, Karl-Franzens Univerziteta u Gracu na nesebičnom pružanju znanja o laboratorijskim tehnikama i metodama molekularne biologije, ogromnoj pomoći tokom eksperimentalnog dijela rada, obradi podataka i tumačenju rezultata.*

*Dr Danijeli Popović koja mi je svojom predusretljivošću i stručnošću bila od velike pomoći.*

*Dr Danilu Mrdaku na pomoći prilikom realizacije boravaka u Austriji.*

*Dr Danijeli Stešević i mr Bogiću Gligoroviću na ogromnoj pomoći pri tehničkoj realizaciji rada.*

*Mr Branki Knežević koja je uvijek imala strpljenja, volje i vremena, da mi pomogne u meni važnim momentima.*

*Zoranu Mrdaku, direktoru Nacionalnog parka Škadersko jezero, Minji Popoviću i Sretenu Đuroviću na pruženoj pomoći prilikom sakupljanja analiziranog materijala.*

*Kolegama sa Studijskog programa za Biologiju na podršci i razumijevanju.*

*Timu laboratorije za molekularnu biologiju u Gracu koji su svojom ljubaznošću i gostoprimstvom, dobrinijeli da mi boravak u tom gradu ostane u nezaboravnom sjećanju.*

*Poseban dio ove zahvalnice odnosi se na Mr Draganu Petrović i njenu porodicu koja je uvijek bila tu, za mene i moj rad, i na moje roditelje koji su mi pružili pažnju, podršku i razumijevanje na svim stepenicama mog dosadašnjeg školovanja.*

*Autor*

## PREDGOVOR

Stara jezera Balkanskog poluostrva - Prespansko, Ohridsko i Skadarsko jezero – odavno su prepoznata kao centri biodiverziteta i endemizma u kojima je period duge izolacije uzrokovao specifične procese alopatričnih i simpatričnih specijacija, što ih je postavilo u fokus geoloških, bioloških i ekoloških istraživanja i odredilo kao polazišta u ispitivanjima evolucionih mehanizama. Međutim, uprkos ovim činjenicama veliki dio bitnih saznanja o važnim biološkim i endemičnim jedinicama i dalje nedostaje. Nepotpunost podataka prisutna je i među elementima ihtiofaune kako u pogledu njihove taksonomije, idioekoloških i genetičkih obilježja tako i u stepenu endemizma.

Nepotpuno definisano pitanje taksonomije i konfuzna nomenklatura roda *Rutilus* predstavljaju povod višedecenijskih polemika kada je ihtiofauna Skadarskog jezera u pitanju. Postoji više pokušaja da se vrste ovog roda taksonomski verifikuju, utvrdi njihov sistematski položaj, ekološki prouče i odrede njihovi areali. Postojanje dvije vrste je već opšte prihvaćeno, ali su velike kontradiktornosti po pitanju toga koje su vrste prisutne i kojim su vrstama iz okruženja evolutivno bliže. Samo postojanje dvije vrste iz istog roda u jednom vodenom sistemu je rijetka pojava, što je i otežavajuća okolnost pri njihovoj determinaciji, a što upućuje na pretpostavku da jedna od njih nije evoluirala u ovom vodenom sistemu. Osim toga direktna veza sa Ohridskim jezerom, kao i u prošlosti velike transgresije i regresije Jadranskog mora, uz dosadašnje poznavanje morfologije, upućuju na pretpostavku da jedna od postojeće dvije vrste nije autohtona. Idioekološke karakteristike ovih vrsta su malo poznate, a informacije o genetskoj strukturi ne postoje.

Evaluacija postojećih literaturnih izvora o ovim taksonima ukazuje na nemogućnost jednostavne taksonomske revizije bez istraživanja koje bi obuhvatilo sve aspekte u proćavanju bioloških jedinica, kao i komparativnu analizu sa susjednim ekosistemima. Dosadašnja istraživanja ihtiofaune Skadarskog jezera i Crne Gore uopšte bila su isključivo bazirana na morfološkim i osteološkim podacima i ispitivanjima. Takođe veliki broj dosadašnjih istraživanja, uzimajući u obzir i ona realizovana u okruženju, fokusirao se samo na pojedine vodene sisteme i jedinice biodiverziteta u njima, bez uzimanja u obzir susjednih ekosistema sa kojima postoje potencijalne istorijske i recentne hidrografske veze. Nedostatak ovakvih načina proućavanja je nemogućnost dobijanja detaljnog uvida u areal rasprostranjenja važnih bioloških jedinica kao što sto su endemični elementi faune. Osim toga, u istraživanjima srodnih taksona ni jedan od aspekata - morfologija, ekologija genetika - ne smije biti zanemaren jer na taj način postoji rizik od izvođenja pogrešnih zaključaka.

Nepostojanje podataka o biologiji i ekologiji, kao i višedecenijske taksonomske nedoumice vezane za vrste roda *Rutilus* koje žive u Skadarskom jezeru, ukazali su na potrebu za sveobuhvatnom analizom ovih taksona, čiji bi rezultati doprinijeli rešenju navedene

problematike i obezbijedili dobru osnovu za buduća istraživanja vrsta iz ovog roda na području Balkanskog poluostrva. Iz tih razloga u okviru ovog rada primijenjen je sveobuhvatni komparativni pristup u istraživanju srodnih, geografski bliskih i udaljenih taksona. Ovakav vid proćavanja bioloških jedinica se može definisati kao istraživanje najvažnijih sinergistićki povezanih obilježja koji determinišu jedan takson, a istovremeno ga diferenciraju od drugog, njemu srodnog taksona. Fenotipski karakteri ukazuju na postojeće sličnosti i razlike među taksonima, ali nisu do kraja precizni u razlikovanju taksonomskih jedinica. S jedne strane posmatrano, morfologija makar djelimićno određuje mnoge ekološke karakteristike, dok s druge strane, ekološki faktori mogu izazvati fenotipske promjene. Ekološka diversifikacija unutar jedne grupe može voditi adaptivnoj evoluciji morfoloških karakteristika. Osim toga za razumijevanje morfološkog i ekološkog diverziteta neophodno je uzeti u obzir i genetićki diverzitet. Veliki izbor savremenih genetićkih markera visokog potencijala pruža veliku mogućnost za rešavanje taksonomskih dilema, određivanje stepena srodnosti na svim taksonomskim nivoima i daju odgovore na brojna ekološka pitanja. Za konaćnu ocjenu modela simpatrije neophodno je utvrditi i stepen reproduktivne izolovanosti simpatrićkih taksona. Osim toga, neophodno je uzeti u obzir i evolutivne mehanizme koji su doprinijeli postojanju simpatrićkih i alopatrićnih modela specijacije u važnim vodenim ekosistemima, kao i geografske procese koji su doprinijeli njihovom sadašnjem rasporedu.

## IZVOD

Utvrđivanje nivoa diferenciranosti taksona iz roda *Rutilus* Rafinesque, 1820 koji naseljavaju Skadarsko jezero sprovedeno je analizom sinergistički povezanih obilježja koji imaju ulogu u njihovoj determinaciji i istovremenoj separaciji na nivou osnovne sistematske kategorije. Za rasvjetljavanje taksonomskog problema i pitanja diverziteta vrsta iz roda *Rutilus* koji generalno postoji za vrste prisutne na Balkanskom poluostrvu ispitivani taksoni iz Skadarskog jezera su podvrgnuti komparativnoj analizi sa taksonima iz Ohridskog i Prespanskog jezera. Ovaj rad sadrži rezultate prve sveobuhvatne analize, morfološke i genetičke, vrsta roda *Rutilus* iz tri najveća Balkanska jezera. U radu su predstavljeni *de novo* klonirani mikrosatelitni lokusi (5 polimorfni i 3 monomorfni) ispitivanog roda, kao i novi set prajmera za amplifikaciju mtDNK cyt *b*. Sekvenciniranjem cyt *b* dobijeno je 17 haplotipova, od kojih je za jedan utvrđeno da je ancestralan za ispitivane taksoni. 15 haplotipova je pronađeno po prvi put. Podaci dobijeni analizom seta morfoloških karaktera, gena mitohondijalne DNK (cyt *b*), fragmenta nuklearne DNK i mikrosatelitnih lokusa dali su snažnu potvrdu modelu simpatrije u Skadarskom jezeru, dok je za Ohridsko i Prespansko jezero utvrđeno prisustvo jednog taksona. Ekološka analiza je potvrdila snažnu diferencijaciju simpatričkih taksona iz Skadarskog jezera budući da je obezbijedila rezultate koji ukazuju na njihovu diferenciranost u pogledu vremena mrijesta i time dokazala njihovu reproduktivnu izolovanost kao i diferencijaciju u pogledu modela rasta, načina ishrane i habitata koje naseljavaju. Rezultati dobijeni ovim istraživanjem nisu u saglasnosti sa nijednom do sada predloženom taksonomskom šemom za taksoni iz roda *Rutilus* koji naseljavaju Skadarsko jezero i kao posledica toga predložena je revizija vrsta koje naseljavaju stara jezera Balkanskog poluostrva. U pogledu diverziteta vrsta na istraživanim područjima rezultati su u saglasnosti sa jednim od postojećih mišljenja. Revizionna šema taksonomskog rešenja je da: 1) *R. prespensis* naseljava Prespansko i Skadarsko jezero i time gubi dosadašnji status endema Prespanskog jezera, 2) *R. ohridanus* naseljava Ohridsko jezero i dobija status endema, i 3) *R. albus* endemičan za Skadarsko jezero i u simpatriji je sa *R. prespensis*.

## ABSTRACT

Establishing the level of differentiation of taxa within genus *Rutilus* Rafinesque, 1820 that inhabit Skadar Lake, has been conducted by the analysis of synergistically connected characteristics that are of importance both for their determination and simultaneous separation on the level of basic systematic category. For clarifying taxonomic problem and diversity issue of *Rutilus* species, that is generally related to all species of Balkan Peninsula, investigated taxa from Skadar lake were subjected to comparative analysis with taxa from Ohrid and Prespa lake. This paper contains results of the first comprehensive morphological and genetic analysis of the *Rutilus* species from the three largest lakes of Balkan Peninsula. In the paper, *de novo* cloned microsatellite loci (5 polymorphic and 3 monomorphic) of investigated genera have been presented and also new set of primers for amplification of mtDNA *cyt b*. By *cyt b* sequencing, 17 haplotypes have been obtained and for one of those has been determined to be ancestral for examined taxa. 15 haplotypes have been found for the first time. Data that has been obtained by the analysis of set of morphological characters, genes of mitochondrial DNA (*cyt b*), fragments of nuclear DNA and microsatellite loci strongly confirmed sympatric model in Skadar lake, while for Ohrid and Prespa lakes presence of one taxon has been confirmed. Ecological analysis confirmed strong differentiation of sympatric taxa from Skadar lake by providing results that indicate their differentiation regarding spawning time and thus proved their reproductive isolation and differentiation in terms of growth model, nutrition and habitats. The results obtained within this study are not in compliance with any so far proposed taxonomic scheme for taxa of genus *Rutilus* that inhabit Skadar lake and consequently a revision of species that inhabit old lakes of Balkan Peninsula has been proposed. Regarding diversity of species in the investigated area, results are in accordance with one of existing opinions. Revision scheme of taxonomic status is as following: 1) *R. prespensis* inhabits Prespa and Skadar lake and thus loses former status as endemic species of Prespa lake; 2) *R. ohridanus* inhabits Ohrid lake and thus gets status as endemic species and 3) *R. albus* is endemic for Skadar lake and is in sympatry with *R. prespensis*.



# SADRŽAJ

PREDGOVOR .....	i
IZVOD .....	iii
ABSTRACT .....	iv
SADRŽAJ .....	v
1. UVOD .....	1
1.1. Pregled dosadašnjih istraživanja roda <i>Rutilus</i> iz Skadarskog jezera.....	1
1.2. Rod <i>Rutilus</i> Rafinesque, 1820.....	4
1.2.1. Rod <i>Rutilus</i> u vodama sliva Jadranskog mora s posebnim akcentom na vrste prisutne u Skadarskom jezeru .....	5
1.2.1.1. Opšte karakteristike istraživanih vrsta.....	7
1.3. Opis istraživanog područja.....	12
1.3.1. Postanak, geomorfologija i hidrografija Skadarskog jezera .....	12
1.3.2. Klimatske odlike .....	14
1.3.3. Biocenološki sastav ispitivanog područja .....	15
1.3.3.1. Makrofitska vegetacija .....	16
1.3.3.2. Fitoplankton .....	17
1.3.3.3. Zooplankton.....	17
1.3.3.4. Zoobentos .....	17
1.3.3.5. Nekton .....	18
1.4. Metode diferencijacije ribljih populacija .....	21
1.4.1. Morfološke metode diferencijacije ribljih populacija.....	21
1.4.2. Genetičke metode diferencijacije ribljih populacija .....	23
1.4.2.1. Mitohondrijska DNK kao genetički marker .....	23
1.4.2.2. Mikrosateliti .....	26
1.4.3. Ekološka diferencijacija vrsta (populacija).....	29
1.4.3.1. Reproductivna biologija.....	29
2. CILJ.....	33
3. MATERIJAL I METODE .....	34
3.1. Materijal .....	34
3.1.1 Materijal za morfološku analizu .....	36
3.1.2. Materijal za genetičku analizu .....	36
3.1.3. Materijal za ekološku analizu .....	36
3.2. Metode analize materijala .....	37
3.2.1. Morfološka analiza.....	37
3.2.1.1. Laboratorijske metode .....	37
3.2.1.2. Obrada podataka .....	37
3.2.2. Genetička analiza .....	39
3.2.2.1. Izolacija DNK .....	39
3.2.2.2. Provjera uspješnosti izolacije DNK.....	39
3.2.2.3. Lančana reakcija polimeraze (PCR).....	40
3.2.2.4. Sekvencioniranje .....	42
3.2.2.5. Kloniranje mikrosatelitih lokusa.....	44
3.2.2.6. Dizajniranje prajmera .....	47
3.2.2.7. Obrada podataka .....	48
3.2.3. Ekološka analiza .....	49
3.2.3.1. Analiza reproductivnog ciklusa.....	50
4. REZULTATI.....	53
4.1. MORFOLOŠKA ANALIZA .....	53
4.1.1. INTERPOPULACIONA DIFERENCIJACIJA .....	53
4.1.1.1. Deskriptivna statistička analiza .....	53

4.1.1.2. Multivarijantna statistička analiza glavnih komponenti (PCA).....	57
4.1.2. DIFERENCIJACIJA TAKSONA IZ SKADARSKOG JEZERA .....	61
4.1.2.1. Morfometrijski karakteri .....	61
4.1.2.2. Meristički karakteri .....	63
4.2. GENETIČKA ANALIZA .....	65
4.2.1. ANALIZA MITOHONDRIJALNE DNK .....	65
4.2.1.1. Dizajniranje seta novih prajmera za mtDNK cyt <i>b</i> roda <i>Rutilus</i> .....	65
4.2.1.2. Analiza sekvencioniranja mtDNK cyt <i>b</i> .....	66
4.2.3. ANALIZA MIKROSATELITNE DNK .....	72
4.3. EKOLOŠKA ANALIZA .....	81
4.3.1. ANALIZA RASTA.....	81
4.3.1.1. Analiza rasta populacije Skadar_bijeli.....	81
4.3.1.2. Analiza rasta populacija Skadar_žuti .....	85
4.3.2. ANALIZA ISHRANE.....	87
4.3.3. DISTRIBUCIJA I BROJNOST .....	88
4.3.4. ANALIZA REPRODUKTIVNOG CIKLUSA.....	90
4.3.4.1. Analiza reproduktivnog ciklusa populacije Skadar_bijeli.....	90
4.3.4.2. Analiza reproduktivnog ciklusa populacije Skadar_žuti .....	95
5. DISKUSIJA .....	100
6. ZAKLJUČCI.....	122
7. LITERATURA.....	124

## 1. UVOD

### 1.1. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA RODA *RUTILUS* IZ SKADARSKOG JEZERA

Radovi koji se bave istaživanjima ihtiofaune Skadarskog jezera pojavljuju se u drugoj polovini XIX vijeku. Autori tih radova uglavnom su bili strani istraživači koji su posjećivali ovaj prostor i u njima je moguće naći podatke najčešće u vidu kratkih informacija koje dokumentuju prisustvu nekog taksona. Početkom XX vijeka pojavljuju se i prvi stručni i naučni radovi koji su bazirani na detaljnijim ihtiološkim istraživanjima.

Prvi podacima o vrstama iz roda *Rutilus* datiraju iz 1883. godine. Naime, Steidachner (1883) za područje Skadarskog jezera navodi vrstu pod imenom *Leuciscus* (*Leucos*) *aula*. Početkom XX vijeka Jovičević (1909) u spisku vrsta Skadarskog jezera navodi žutalja, brcaka. Karaman (1933) na području Skadarskog jezera evidentira prisustvo vrste *Leucos aula*. Upotreba imena *Rutilus* za vrste prisutne u basenu Jadranskog mora navedeno je od strane Taler-a (1953) koji za područje Skadarskog jezera navodi vrstu *R. rubilio*. U kasnijim popisima riba Skadarskog jezera i Crne Gore datim od strane Drecun (1957, 1962) takođe se za područje Skadarskog jezera navodi vrsta *R. rubilio* (Bonaparte, 1837).

Detaljnija istraživanja pojavljuju u drugoj polovini XX vijeka. Tako, Ivanović (1967) prati embionalni razvoj vrste *R. rubilio* (Bonaparte 1837) - žutalja i to u prirodnim uslovima. Autor iznosi da se žutalj u Skadarskom jezeru mrijesti u proljećnom periodu (april, maj) i da ikru porciono odlaže na šljunkovitim i kamenitim obalama kao i na makrofitskoj vegetaciji. Ovim istraživanjem obuhvaćeno je i praćenje embrionalnog razvića u periodu od 23. aprila do 2. maja. Rezultati pokazuju da prvi slobodni embrioni dužine 14.5-16 mm izlaze iz jajnih opni 219 h nakon oplodnje. Iste godine (1967a) autor ispituje hibridizaciju vrsta *Pachychilon pictum* (♀) i *R. rubilio* (♂). U radu se prati i embrionalno razviće dobijenog hibrida u prirodnim uslovima. Rezultati pokazuju da uspješno dobijeni embrioni dužine od 4.6 - 5.2 mm izlaze iz jajne opne nakon 171 časa od trenutka oplodnje. Isti autor 1968. daje podatke o pokretljivosti spermatozoida vrste *R. rubilio* iz Skadarskog jezera.

Vuković & Seratlić-Savić (1967) iznose podatke o broju branhiospina i dužini crijevnog trakta populacije *R. rubilio* (Bonaparte) iz Skadarskog jezera i rijeke Bune. Kod vrste *R. rubilio* autori su konstatovali razlike u broju branhiospina spoljašnjeg i unutrašnjeg niza. Pri upoređivanju dužine crijevnog trakta autori pokazuju da je veća relativna dužina crijevnog trakta jedinki iz Skadarskog jezera. Kada je vrsta hrane u



pitanju autori zaključuju da je populaciji iz Skadarskog jezera u ishrani dominantna biljna komponenta.

Vuković & Vuković (1968) daju neke uporedne taksonomske karakteristike za populacije vrste *R. rubilio* (Bonaparte) iz voda Jugoslavije i sjeverne Italije. U ovom rada prezentovanom uporednom analizom utvrđene su razlike kako u morfometrijskim tako i u merističkim karakterima. Konstatovano je da su morfometrijski karakteri ove vrste podložni velikim promjenama. Analizirajući srednje vrijedosti i variranje broja krljušti u bočnoj liniji autori nalaze da se populacije voda Jugoslavije karakterišu većim vrijednostima i većim variranjem ovog karaktera u poređenju sa populacijama iz voda sjeverne Italije.

Vuković & Ivanović (1970) kompariraju morfometrijske i merističke karaktere žutalja iz Skadarskog jezera i sliva Neretve. U okviru ovog rada urađena je analiza nekih morfometrijskih i merističkih karaktera populacija iz rijeka Bune i Bregave (pritoka Neretve) sa populacijom iz Skadarskog jezera. Među ispitivanim populacijama nađene su izvjesne razlike u morfometrijskim karakterima. Ispitivani meristički karakteri su pokazali da se populacije iz sliva rijeke Neretve razlikuju od populacije iz Skadarskog jezera u broju granatih zraka u podrepnom peraju, dok se razlike između ispitivanih populacija nisu ispoljile kod broja krljušti u bočnoj liniji i broju granatih zraka u leđnom peraju.

Vuković, N. *et al.* (1970) upoređuju podatke o težini srca i mozga vrste *R. rubilio* iz Skadarskog jezera i rijeke Bune. Na osnovu ovih istraživanja autori zaključuju da se težinski odnosi mozga i tijela mogu koristiti u biosistematskim istraživanjima.

Seratić-Savić & Vuković (1971) prate neke merističke karaktere na primjercima *R. rubilio* (Bonaparte) iz Skadarskog jezera i rijeke Trebižat (sliv rijeke Neretve). Autori zaključuju da se populacija iz Skadarskog jezera odlikuje manjim brojem kičmenih pršljenova (srednja vrijednost 35.72) u poređenju sa populacijom iz rijeke Trebižat (srednja vrijednost 37.42). Takođe su konstatovane i statistički najveće razlike pri poređenju nekih drugih merističkih karaktera populacije iz Skadarskog jezera i rijeke Trebižat ( $t=7.99$ ), za razliku od poređenja iste populacije žutalja Skadarskog jezera sa populacijom iz rijeke Bregava (sliv rijeke Neretva) gdje je konstatovan manji statistički značaj razlika ( $t=3.4$ ).

Vuković *et al.* (1972) saopštavaju podatke o dužini crijevnog trakta u zavisnosti od zastupljenosti biljne i životinjske hrane u njemu. Autori upoređuju dužinu crijevnog trakta jedinki iz rijeke Bune sa jedinkama iz Skadarskog jezera. Rezultati pokazuju da dužina crijeva iznosi 104,77% standardne dužine jedinki iz rijeke Bune, dok za jedinke iz Skadarskog jezera taj odnos iznosi 143,63%.

U knjizi "Ichthyofauna of Skadar Lake", Ivanović (1973) daje potpunije podatke o merističkim i morfometrijskim karakteristikama žutalja Skadarskog jezera, osobenostima njene biologije i ekonomskom značaju.

U svom magistarskom radu Kavarić (1974) daje podatke o morfologiji krvnih elemenata vrste *R. rubilio*.

Sezonski razvoj gonada vrste *R. rubilio* iz Skadarskog jezera prate Knežević & Ivanović (1975). Na polno zrelih jedinkama tokom 1966. godine praćene su makroskopske promjene na gonadama, a izučavana je i dužina i težina gonada. Paralelno je rađena histološka analiza cikličnih promjena na gonadama. Autori iznose zaključak da ovu vrstu odlikuje asinhroni tip rasta gonada i da se porciono mrijesti.

Podatke o dužinskom i težinskom rasteњу žutalja Skadarskog jezera daje Knežević (1976). Dužinsko i težinsko rasteње je proučavano na jedinkama lovljenim na različitim lokalitetima Skadarskog jezera. Isti autor 1977. godine saopštava podatke o fekunditetu populacije *R. rubilio* Skadarskog jezera. U radu je razmatrana brojnost jaja u odnosu na starost, dužinu i težinu. Ispitivana je i veličina ikre, kao i plodnost po uzrasnim klasama.

Šorić (1983) daje prvu detaljniju komparativnu analizu populacija vrste *R. rubilio* iz Ohridskog i Skadarskog jezera i rijeke Beli Drim i upoređuje ih sa podacima ranijih autora koji su radili na populacijama ove vrste na području Jugoslavije i Italije (Karaman, 1924; Arbocco, 1966; Vuković & Vuković, 1968; Vuković & Ivanović, 1970; Tortonese, 1970; Ivanović, 1973).

Marić (1989) daje reviziju vrsta roda *Rutilus* Rafinesque, 1820 zapadnog dijela Balkanskog poluostrva. Autor za područje Skadarskog jezera prvi registruje prisustvo dvije vrste iz roda *Rutilus* i detaljno opisuje dvije podvrste i to: *R. basak ohridanus* (Karaman 1924) i *R. prespensis vukovici* ssp.n. i prikazuje njihova najvažnija morfološka obilježja.

Šorić (1990) istražuje ihtiofaunu Ohrid-Drim-Skadar sistema. Istraživanje je pokazalo da ovaj sistem naseljava podvrsta *R. rubilo rubilio* (Bonaparte, 1837), dok podvrsta *R. rutilus ohridanus* opisana od strane Karamana 1924. godine za Ohridsko jezero nije konstatovana.

Hadžiablahović (2001) se u svojoj doktorskoj disertaciji bavi istraživanjem biohemijskih i citogenetičkih osobina *R. rubilio* (Bonaparte, 1837) Skadarskog jezera.

Komparativnu analizu uz redeskripciju morfoloških karakteristika populacija *Rutilus*-a iz Ohridskog, Skadarskog i Prespanskog jezera daju Marić & Radujković (2009) godine. Oni pokazuju da Skadarsko, Ohridsko i Prespansko jezero naseljava vrsta *R. ohridanus* (Karaman, 1924).

## 1.2. ROD *Rutilus* RAFINESQUE, 1820

Rod *Rutilus* Rafinesque, 1820 pripada porodici Cyprinidae jednoj od najbrojnijih porodica slatkovodnih košljoriba (infraclassis: Teleostei). Porodica Cyprinidae broji 210 rodova i 2010 vrsta (Nelson, 2006). Osim velikog diverziteta vrsta karakteriše je i široka rasprostranjenost. Predstavlja jednu od najrasprostranjenijih slatkovodnih porodica riba. Autohtono odsustvuje jedino sa područja Madagaskara, Novog Zelanda, Australije i južne Amerike.

Predstavnici vrsta roda *Rutilus* uključuju vrste koje se po veličini mogu svrstati u ribe srednjih dimenzija, standardne dužine od 130 mm (*R. ohridanus*) - 600 mm (*R. meidingeri*) (Kottelat & Freyhof, 2007). Naseljavaju pretežno lentičke sisteme. Ekološki diverzitet vrsta je u opsegu od euritopičnih (kojima pripada veoma dobro proučena vrsta *R. rutilus*) do kriptičnih vrsta (na primjer slabo proučena vrsta *R. virgo*). Najveći diverzitet vrsta izražen je u južnom dijelu Balkanskog poluostva, pri čemu treba istaći da su ove vrste u svima aspektima najmanje istražene počevši od taksonomije do biologije i ekologije.

Rod se odlikuje široko Evropskim rasprostranjenjem. Rasprostranjen je u centralnom i zapadnom Paleartričkom regionu dok sa Iberijskog poluostva odsustvuje (Bianco *et al.*, 2004). Karakteriše ga i mogućnost hibridizacije sa drugim rodovima. Tako na primjer *R. rutilus* hibridizuje sa vrstom *Abramis brama* (Wood & Jordan, 2006), a registrovan je i prirodni hibrid između vrsta *Alburnus alburnus* i *R. rubilio* u maloj Prespi (Crivelli & Dupont, 1987).

Precizna dijagnoza, taksonomski sastav i distribucija vrsta roda *Rutilus* objekti su višedecenijskih rasprava većeg broja istraživača. Taksonomija roda, a naročito endemičnih taksona iz vodenih ekosistema Balkanskog poluostva je daleko od rasvjetljavanja, što između ostalih ističu i autori radova novijeg datuma Bianco *et al.*, (2004) i Marić & Radujković (2009). U prilog tome ide i činjenica o novootkrivenim vrstama - *R. panosi*, Bogutskaya & Iliadou, 2006 i *R. albus*, Marić, 2010.

Postoji više razloga ovakvoj situaciji. Jedan od njih je veoma neprecizna nomenklatura roda koja je u prošlosti u značajnoj mjeri bila na udaru sinonima. Vrste koje mu pripadaju u prošlosti su opisivane u okviru rodova *Cyprinus*, *Leuciscus*, *Gardonus*, *Leucos*, *Chondrostoma*, *Squalius*. Howes (1981) čak koristi sinonime za rodove: *Rutilus*, *Scardinius*, i *Pachychilon*. Nominalna vrsta roda je *Cyprinus Rutilus* Linnaeus, 1758 = *Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758). Otežavajuća okolnost pri proučavanju vrsta iz ovog roda javlja se u područjima koja simpatrički naseljavaju dvije ili više vrsta kao npr. na području Italije ili Skadarskog jezera što diferencijaciju među vrstama čini prilično komplikovanom.

Osim toga, dijagnoze koje su u prošlosti navođene često su bile neprecizne i nejasne. Obuhvatale su širok spektar karaktera od pleziomornih i apomornih do autapomornih karakteristika. Tako na primjer, Berg (1949) navodi da je autapomorfna karakteristika za rod 6-5 ždrijelnih zuba.

Bogutskaya (1998) navodi sledeće apomorfne karakteristike roda *Rutilus*: 1. Leđno peraje sadrži 4 i 5 negranatih žbica (**Slika 1**); 2. Ždrijelni zubi u jednom nizu, 5-5 ili 6-5; 3. Posteriorni nastavak pteroticuma je širok i bočno spljošten; 4. Kostí koje se nalaze posteriorno u odnosu na subtemporalnu jamu (lat. *fossa subtemporalis*) formiraju široku horizontalnu ploču koja je sa ventralne strane konkavna i služi kao mjesto početka posteriornog dijela mišića *levator posterior*; 5. Mastikatorna ploča ždrijelnog nastavka (lat. *pharyngeal process*) je relativno velika i horizontalno orijentisana, anteriorna polovina joj se nalazi ispod tijela os *bassiocipitale*; 6. Posteriorni dio ždrijelnog nastavka je bočno proširen i duž njegove gornje ivice se formira dorzalna ploča koja je široka ali nikad nije šira od mastikatorne ploče. Kombinacija karaktera 5. i 6. je jedinstvena i apomorfna za prestavnike roda *Rutilus*. Na osnovu ovih karakteristika Bogutskaya & Iliadou (2006) rod *Rutilus* dijele na dva podroda: *Rutilus* i *Pararutilus*. Vrste svrstane u podrod *Rutilus* su ribe manjih dimenzija u poređenu sa vrstama svrstanim u podrod *Pararutilus*; odlukuju se manjim brojem kičmenih pršljenova (< 43) i manjim mrijesnim (svadbenim) kvržicama koje su uočljive kod mužjaka u periodu mrijesta. U podrod *Rutilus* iz evropskih voda svrstane su sledeće vrste: *R. aula* (Bonaparte, 1841), *R. basak* (Heckel, 1843), *R. caspicus* (Yakovlev, 1870), *R. karamani* Fowler, 1977, *R. ohridanus* (Karaman, 1924), *R. prespensis* (Karaman, 1924), *R. rubilio* (Bonaparte, 1837), *R. rutilus* (Linnaeus, 1758), *R. ylikiensis* Economidis, 1991 i *R. panosi* (Bogutskaya & Iliadou, 2006). Podrodu *Pararutilus* Berg, 1912 pripadaju sledeće vrste: *R. frisii* (Nordmann, 1840), *R. kutum* Kamensky, 1901, *R. meidingeri* (Heckel, 1851), *R. pigus* (La Cepède, 1803) i *R. virgo* (Heckel, 1852). Ovu podjelu Kotellat & Freyhoff (2007) ne uzimaju u obzir već prethodno navedene vrste svrstavaju isključivo u rod *Rutilus*.

### **1.2.1. ROD *RUTILUS* U VODAMA SLIVA JADRANSKOG MORA S POSEBNIM AKCENTOM NA VRSTE PRISUTNE U ŠKADARSKOM JEZERU**

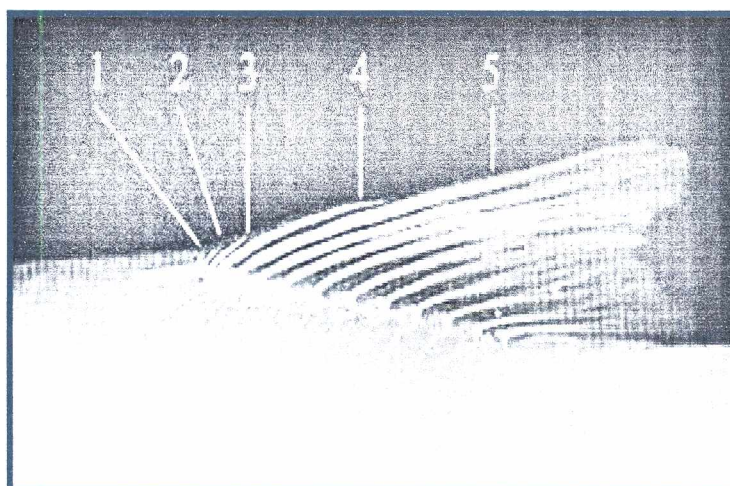
Područje Evrope naseljava 16 vrsta iz roda *Rutilus* od kojih je 9 prisutno na Balkanskom poluostrvu. Slivno područje Jadranskog mora naseljavaju 5 vrsta (Kotellat & Freyhoff, 2007) (**Tabela 1**). Imajući u vidu činjenicu da je taksonomski status, a time i stepen endemizma ovih vrsta još uvijek pod znakom pitanja reviziji može podleći i broj vrsta sa ovog područja.



Prvi podaci o vrstama koje su danas svrstane u rod *Rutilus*, a egzistiraju na području Balkanskog poluostrva potiču iz 1858. godine. Naime, Heckel & Kner (1858) u knjizi "Slatkovodne ribe Austrougarske monarhije" opisuju tri zasebne vrste: *Leucos aula* Bonaparte, *L. basak* Heckel i *L. rubella* Heckel and Bonaparte. U knjizi "Pisces Macedonie" Karaman, (1924) opisuje dva varijeteta vrste *L. aula*. Jedna od njih je iz Ohridskog jezera (*L. aula* v. *ohridanus*), a druga iz Prespanskog jezera (*L. aula* v. *prespensis*). Za područje Dalmacije tačnije za sliv Neretve Karaman (1928), navodi podvrstu *L. aula aula* Bonaparte. Autor takođe iznosi mišljenje da vrsta *L. basak* Heckel iz Prološkog jezera pripada neretvanskoj *L. aula aula* Bonaparte. Vladikov & Petit (1930) za Ohridsko jezero opisuju novi nation *R. aula* nation *karamani*. Fowler (1977), po kodeksu zoološke nomenclature, ovaj nation podiže na nivo podvrste *R. rubella karamani*. Kasnije Kotellat (1997) podvrstu *Rutilus rubella karamani* imenuje kao *R. karamani* Fowler, 1977. Pored ovih vrsta slivno području rijeke Po i manje rijeke na području Istre naseljava vrsta *R. aula* (Bianco & Taraborelli, 1985).

**Tabela 1.** *Rutilus*-i Evrope (po Kotellat & Freyhoff, 2007). \*označava vrste prisutne na Balkanskom poluostrvu, a♦ označava vrste prisutne u slivu Jadranskog mora

<b><i>Rutilus</i>-i Evrope</b>	
<i>R. frisii</i>	<i>R. aula</i> ♦
<i>R. meidingeri</i>	<i>R. karamani</i> ♦
<i>R. virgo</i>	<i>R. prespensis</i> ♦
<i>R. rutilus</i> *	<i>R. ohridanus</i> ♦
<i>R. caspicus</i>	<i>R. sp. sperchios</i> *
<i>R. heckelii</i>	<i>R. ylikiensis</i> *
<i>R. pigus</i>	<i>R. basak</i> ♦
<i>R. rubilio</i>	<i>R. panosi</i> *



**Slika 1.** Snimak žbica u dorzalnom peraju vrsta iz roda *Rutilus*. Slika prikazuje postojanje anteriornih negratanih žbica (Kotellat & Freyhoff, 2007)

U ranijim radovima (Taler, 1953; Drecun, 1957 i 1962; Poljakov *et al.*, 1958; Sket, 1967; Tortonese, 1970; Vuković & Ivanović, 1970; Vuković, 1977 i 1982) za područje Dalmacije, Skadarskog, Ohridskog i Prespanskog jezera navođena je samo jedna vrsta i to *R. rubilio* (Bonaparte, 1837). Naprijed citirani autori za područje Ohridskog jezera navode podvrstu *R. r. ohridanus* (Karaman, 1924); *R. r. prespensis* (Karaman, 1924) za Prespansko jezero i *R. r. rubilio* (Bonaparte, 1837) za Skadarsko jezero i područje

Dalmacije. Bianco & Taraborelli (1985) dokazuju da u vodama Dalmacije egzistira jedna vrsta i to *R. basak* (Heckel & Kner, 1858). Po Mariću (1989) područje Dalmacije i Bosne i Hercegovine naseljava podvrsta *R. basak basak*; Skadarsko jezero naseljavaju dvije vrste izdiferencirane na nivou podvrsta i to: *R. basak ohridanus* i *R. prespensis vukovici*; Ohridsko jezero naseljava *R. basak ohridanus* dok područje Prespanskog jezera naseljava *R. prespensis prespensis*. Po literaturnim podacima novijeg datuma postoje suprotstavljena mišljenja o broju vrsta i njihovoj nomenklaturi naročito za područja Skadarskog, Ohridskog i Prespanskog jezera. Autori, Bogutskay & Iliadou (2006) i Kotellat & Freyhoff (2007) za područje Bosne i Hercegovine i Hrvatske navode vrstu *R. basak*; za Prespansko jezero *R. prespensis*, a za Ohridsko i Skadarsko jezero navode dvije vrste i to: *R. karamani* i *R. ohridanus*. Po Marić & Radujković (2009) *R. ohridanus* naseljava Prespansko, Ohridsko i Skadarsko jezero. Pored ove vrste autori za područje Skadarskog jezera ističu postojanje još jedne vrsta precizno nedefinisanog sistematskog statusa, koju Marić (2010) opisuje kao novu za nauku pod imenom *R. albus*.

Vrste roda *Rutilus* u Skadarskom jezeru po brojnosti predstavljaju jednu od najbrojnih vrsta riba. Budući da se rijetko koriste u ishrani ljudi i predstavljaju ekonomski beznačajne vrste veće količine se uglavnom love zajedno sa ekonomski značajnim vrstama, pri čemu se *Rutilus*-i svrstavaju u tzv. "škart ribu". Lokalno stanovništvo taj izlov uglavnom nakon obrade koristi u ishrani domaćih životinja.

#### 1.2.1.1. OPŠTE KARAKTERISTIKE ISTRAŽIVANIH VRSTA

S obzirom na postojanje oprečnih mišljenja o tačnom broju, imenima, a time i distribuciji proučavanih vrsta roda *Rutilus* kroz tri najveća jezera na Balkanskom poluostrvu, a radi jasnijeg uvida u aktuelnu problematiku u **Tabeli 2** je prikazan hronološki redosled navođenja ovih vrsta od strane brojnih autora koji su radili na njihovom proučavanju. Iz tabele se jasno vidi da sva dosašnja istraživanja nedvosmisleno pokazuju postojanje jedne vrste u Prespanskom jezeru. Takođe se uočava da svi autori koji su radili na proučavanju ovih vrsta u poslednjih 20 godina eksplicitno ističu prisustvo dvije vrste u Skadarskom jezeru. Najveća neslaganja se odnose na broj vrsta (jedna ili dvije) područja Ohridskog jezera kao i njihov sistematski status. Međutim, Marić & Radujković (2009) analizirajući podatke ranijih radova sa sopstvenim materijalom smatraju da je izvršena pogrešna identifikacija i da je to vjerovatno jedan od razloga zbog kojeg su neki autori za Ohridsko jezero navodili dvije vrste. Isti autori navode da u Prespanskom, Ohridskom i Skadarskom jezeru egzistira ista vrsta (*R. ohridanus*) koja se u zavisnosti od lokaliteta izdiferencirala u različite podvrste.

Tabela 2. Hronološki pregled dosadašnjih podataka o istraživanim vrstama

Autor	Prespansko jezero	Ohridsko jezero	Skadarsko jezero
Karaman (1924)	<i>L. aula v. prespensis</i>	<i>L. aula v. ohridanus</i>	
Vladikov & Petit (1930)		<i>R. aula natio karamani</i>	
Poljakov et al., 1958	<i>R. rubilio ohridanus</i>	<i>R. rubilio ohridanus</i>	<i>R. rubilio ohridanus</i>
Fowler (1977)		<i>R. rubella karamani</i>	
Šorić (1983)		<i>R. rubilio rubilio</i>	<i>R. rubilio rubilio</i>
Marić (1989)	<i>R. prespensis prespensis</i>	<i>R. basak ohridanus</i>	<i>R. basak ohridanus</i> i <i>R. prespensis vukovici</i>
Georgiev (1998)	<i>R. rubilio</i>	<i>R. rubilio</i>	
Bogutskay & Iliadou (2006)	<i>R. prespensis</i>	<i>R. karamani</i> i <i>R. ohridanus</i>	<i>R. karamani</i> i <i>R. ohridanus</i>
Kotellat & Freyhoff (2007)	<i>R. prespensis</i>	<i>R. karamani</i> i <i>R. ohridanus</i>	<i>R. karamani</i> i <i>R. ohridanus</i>
Marić & Radujković (2009)	<i>R. ohridanus</i>	<i>R. ohridanus</i>	<i>R. ohridanus</i> i <i>Rutilus sp.</i>
Marić (2010)			<i>R. ohridanus</i> i <i>R. albus</i>

Uzimajući u obzir naprijed iznešene literaturne činjenice koje ukazuju na postojeću nomenklaturnu neusaglašenost za proučavane vrste u ovom radu se neće koristiti latinska imena već će se razmatrati pod narodnim, odnosno shodno lokalitetima sa kojih i potiču.

#### 1. Rutilus sp. iz Ohridskog jezera

LOKALNI NAZIV: Ohridski grunec (**Slika 2**)

DIJAGNOZA (Marić & Radujković, 2009):

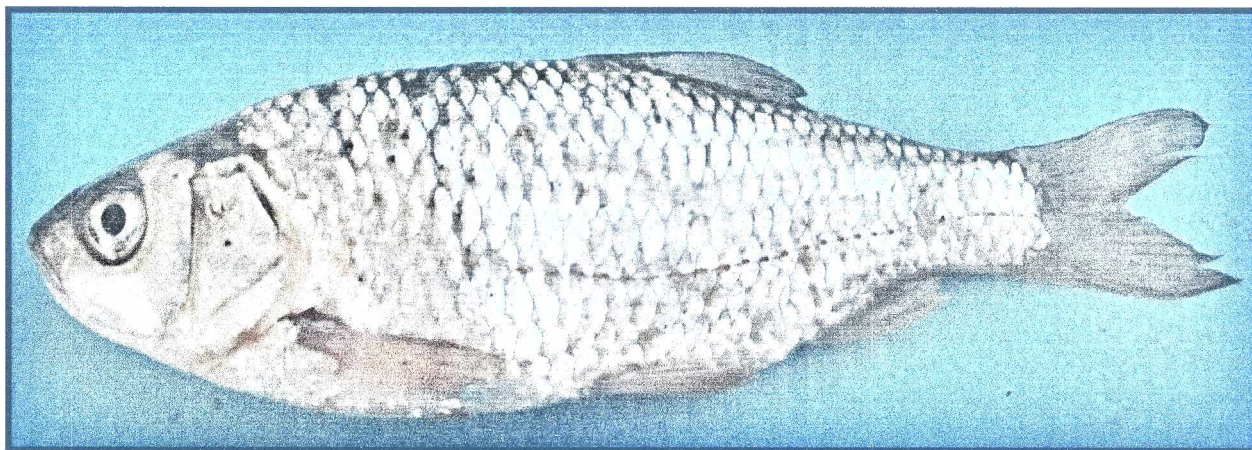
8½-9½ granatih žbica u dorzaln timeraju; 8 ½ granatih žbica u analnom timeraju; broj krljušti u bočnoj liniji 37-40; broj granatih žbica u pektoralnom timeraju je 13-16, a u ventralnom 7-8; broj krljušti iznad bočne linije je 7-8, a ispod 3-4; broj branhiospina u spoljašnjem nizu je 8-10, a u unutrašnjem 10-14; dijametar oka 6,1-7,7 % SL i 1,3-1,6 puta stane u međuočni prostor, dužine glave 25,1-27,4% SL; njuška uglasta, usta



terminalna; zlatno žuta obojenost tijela; pektoralno, ventralno i analno peraje su žućkasta, a dorzalno i repno peraje su sivkasto obojena; dorzalno i analno peraje su konkavna; dostiže standardnu dužinu do 190 mm.

DISTRIBUCIJA: Ohridsko jezero (Makedonija, Albanija)

KONZERVACIONI STATUS: Neugrožena vrsta (Kotellat & Freyhoff, 2007)



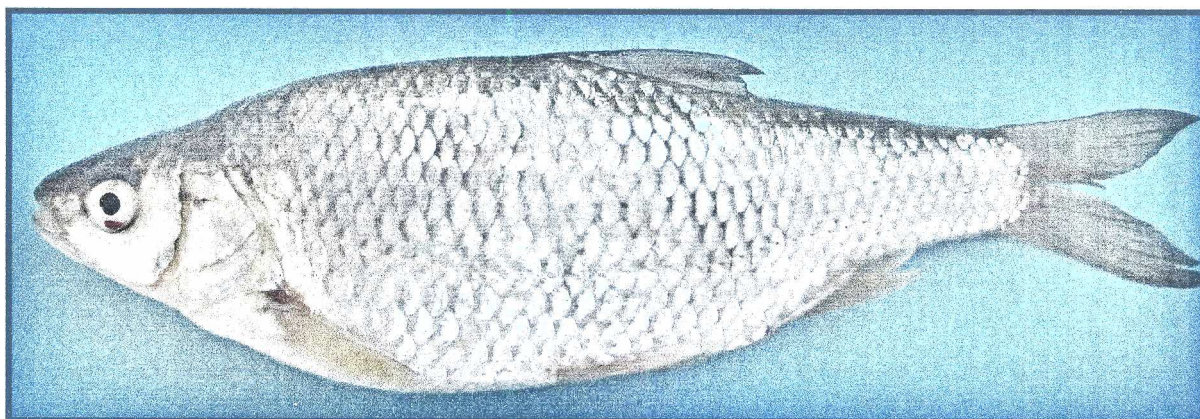
**Slika 2.** *Rutilus* sp. iz Ohridskog jezera

## 2. *Rutilus* sp. iz Prespanskog jezera

LOKALNI NAZIV: Prespanski grunec (**Slika 3**)

DIJAGNOZA: 9 ½ granatih žbica u dorzalnem peraju; 8 ½ granatih žbica u analnom peraju; broj krljušti u bočnoj liniji 38-42 + 3; diameter oka 4-5% SL, 19-22% dužine glave, 1.7-1.9 puta stane u međuočni prostor; njuška zaobljena; peraja su sivkasto obojena, vrhovi analnog i trbušnog peraja su žućkasti; dostiže standardnu dužinu do 170 mm.





**Slika 3.** *Rutilus* sp. iz Prespanskog jezera

**DISTRIBUCIJA:** Po Marić (1989) osim Prespanskog naseljava i Skadarsko jezero, a po Kotellat & Freyhoff (2007) samo područje Prespanskog jezera.

**KONZERVACIONI STATUS:** VU D2 (ranjiva vrsta sa veoma ograničenim arealom rasprostranjenja) (Kotellat & Freyhoff, 2007).

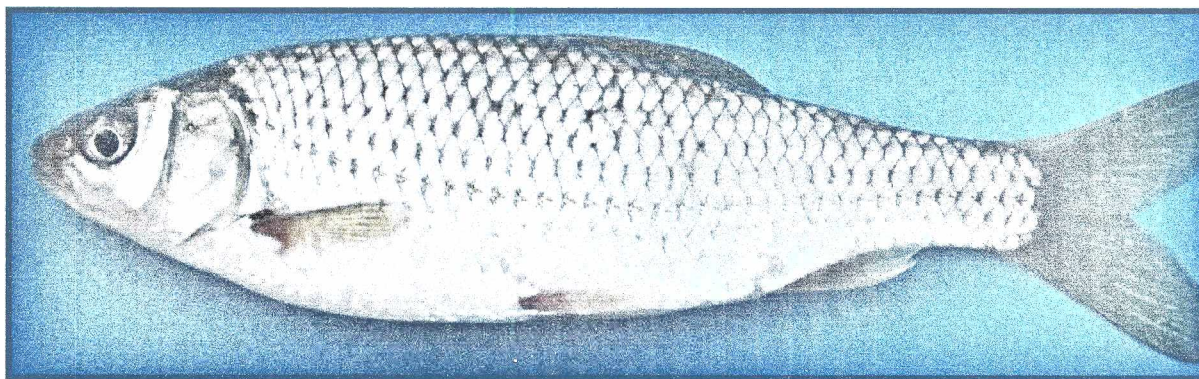
### 3. *Rutilus* sp. iz Skadarskog jezera

**LOKALNI NAZIV U CRNOJ GORI:** žuti brcak, žuta brona (**Slika 4**)

**DIJAGNOZA** (Marić, 1989): 8-9 granatih žbica u dorzalnom peraju; 7-9 granatih žbica u analnom peraju; 13-17 granatih žbica u pektoralnom peraju; broj krljušti u bočnoj liniji 37-41; dijametar oka 5,5-6,6 % SL, dužine glave iznosi 22,3-25,9 % SL; njuška zaobljena; usta su terminalna; tijelo je zlatno-žute boje; džepovi na krljuštima su upodaljivo tamnije obojena; dok su peraja su žuto narandžsasto obojena (Marić, 2010). Dostiže dužinu do 206 mm (Knežević, 1976).

**DISTRIBUCIJA** (Marić, 1989; 1995; Marić & Milošević, 2011) naseljava sliv Skadarskog jezera (Crna Gora i Albanija).

**KONZERVACIONI STATUS:** Neugrožena vrsta (Kotellat & Freyhoff, 2007):



**Slika 4.** *Rutilus* sp. iz Skadarskog jezera (žuti brcak)

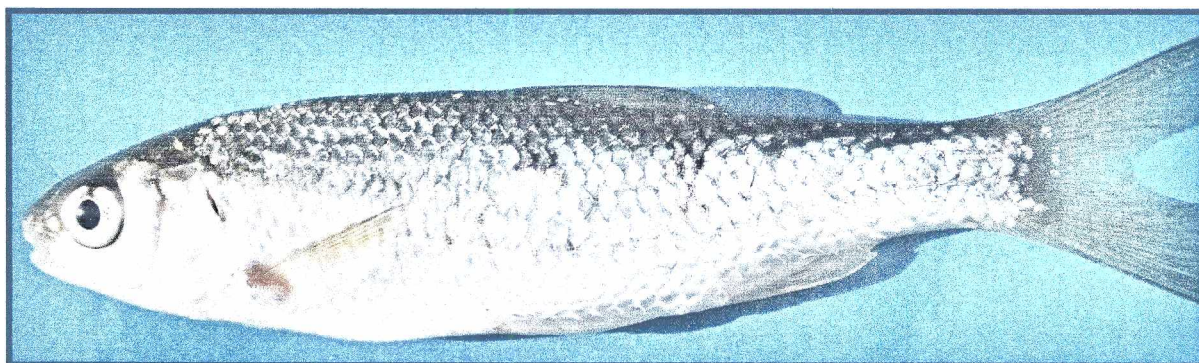
#### 4. *Rutilus* sp. iz Skadarskog jezera

LOKALNI NAZIV U CRNOJ GORI: bijeli brcak, bijela brona (**Slika 5**)

DIJAGNOZA (Kotellat & Freyhoff, 2007): 8-9 granatih žbica u dorzalnom peraju; 8 granatih žbica u analnom peraju; broj granatih žbica u ventralnom peraju je 8, a u grudnom 15-17; broj krljušti u bočnoj liniji 41-46; dijametar oka 4-7 % SL, dužine glave 22,0 -27,5 % SL; dužina repnog stabla iznosi 20,5-23,5% SL; ždrijelni zubi 5-5; broj branhiospina spoljašnjeg niza je 8-11, a unutrašnjeg 12-16; usta subterminalna; njuška zaobljena; tijelo je srebrne boje; peritoneum je crn; peraja su sivkasto obojena; dorzalno i ventralna peraja su blago konkavna; dostiže dužinu do 160 mm.

DISTRIBUCIJA (Marić & Radujković, 2009; Marić, 2010): Skadarsko jezero (Crna Gora)

KONZERVACIONI STATUS: Neugrožena vrsta (Kotellat & Freyhoff, 2007)



**Slika 4.** *Rutilus* sp. iz Skadarskog jezera (bijeli brcak)



Bez obzira na naprijed iznesene činjenice i podatke neophodno je istaći da su istraživane populacije prvi put opisane pod sledećim latinskim imenima: populacija Ohrid – *Leucos aula* v. *ohridana* Karaman, 1924; populacija Prespa – *Leucos aula* v. *prespensis* Karaman, 1924; populacija žutog brcaka kao *R. prespensis vukovici* Marić, 1989 i populacija bijelog brcaka kao *R. albus* Marić, 2010.

### 1.3. OPIS ISTRAŽIVANOG PODRUČJA

#### 1.3.1. POSTANAK, GEOMORFOLOGIJA I HIDROGRAFIJA SKADARSKOG JEZERA

Skadarsko jezero se nalazi u jugoistočnom dijelu Crne Gore između 19 i 19°30' istočne geografske dužine i 42 i 42°30' sjeverne geografske širine, na crnogorsko albanskoj granici. Pruža se u pravcu sjeverozapad-jugoistok i zahvata prostor od rijeke Bojane i Skadarske ravnice do sjevernog oboda Zetske ravnice, a prema zapadu do Obodske pećine (Nedeljković, 1959). Jezero je smješteno na karstnom terenu, u unutrašnjem dijelu jugoistočnih Dinarida. Po površini koju zahvata predstavlja najveće jezero na Balkanskom poluostrvu. Ukupna površina slivnog područja Jezera uključujući slivove Morače i ostalih pritoka iznosi 5490 km<sup>2</sup>. Od ove površine teritoriji Crne Gore pripada oko 4460 km<sup>2</sup> (81,2%), a teritoriji Albanije oko 1030 km<sup>2</sup> (18,8%) (Radulović, 1989). Površina sliva Skadarskog jezera, na teritoriji Crne Gore, po Vodoprivrednoj osnovi RCG (2001) je 4273 km<sup>2</sup>. Dužina jezera zajedno sa Rijekom Crnojevića iznosi oko 50 km, dok je širina na različitim mjestima različita. Najveća širina je na profilu pored granice sa Albanijom, gdje iznosi 14 km. Obim jezera je u prosjeku 162 km. Iako velike površine Jezero je poznato po maloj dubini vode, što je od posebnog značaja za njegov termički režim, a samim tim i za živi svijet. Srednja dubina jezerske vode iznosi 5,01 m. Najveća zabilježena dubina jezera, od 60 m, zabilježena je u Raduškom oku, poznatoj sublakustričnoj vrtači. Dubina jezera duž sjeverne i sjeverozapadne obale se kreće od 1-3 m, uz jugozapadnu obalu od 2-6 m, a u pelagijalu 4-7 m (Karaman & Beeton, 1981). Dakle, Skadarsko jezero je kriptodepresija male dubine sa dnom ispod nivoa mora i vodenim stubom svega nekoliko metara iznad nivoa mora. Ova osobina ima poseban značaj za protočnost vode, a samim tim i za intenzitet samoprečišćavanja jezerske vode.

O postanku Skadarskog jezera postoje dvije teorije. Po teoriji (Cvijić, 1902) Skadarsko jezero predstavlja tektonskim procesima potopljeno karsno polje. Naime, nabiranje zemljine kore i dejstvo fluvijalne erozije dovelo je do nastanka kotline Skadarskog jezera koja se postepeno spuštala, usljed čega je njeno dno potonulo ispod nivoa mora. Kriptodepresija nastala na taj način zatim je i potopljena. Po Stanković (1926) Jezero je pliocenske starosti. Prvobitno je bilo zaliv Jadranskog mora (o čemu

svjedoče brojni paleontološki podaci), a zatim je izdizanjem terena oko Bojane i taloženjem materijala koga su donosile rijeke nastala barijera između mora i današnjeg jezera. Stalnim dotokom vode Jezero je postalo slatkovodni basen.

Skadarsko jezero je oblika izdužene elipse. U sredini te elipse, između hotskih i kastratskih brda, nalazi se prošireni dio jezera koji se zove Humsko blato. Velje blato se nalazi na potezu Vranjina-Tanki rt, odnosno južno od nasipa kojim idu automobilski i željeznički put. Dio jezera između Žabljaka Crnojevića i Sinjca zove se Gornje blato, dok je Vučko blato prostor od ušća Rijeke Crnojevića pa do nasipa. Sjeverna obala jezera je ravna i gusto obrasla makrofitama, južna je gola, strma i stjenovita.

Posebno obilježje Skadarskom jezera daju sublakustrični izvori u narodu poznati kao "oka". To su kriptodepresije dubine i do 60 m, malog prečnika i ljevkastog oblika. Ima ih preko 30 i nalaze se uz sjeverozapadni, zapadni i jugozapadni dio oboda Jezera i prema tome se dijele u tri grupe. Prvu grupu čine "oka" u sjeverozapadnom dijelu (područje ušća rijeke Crnojevića) poznata pod imenom ceklinski ribolovi. Drugu grupu čine "oka" na području Malog blata, a treću oka u Veljem blatu, poznata kao crmničko-krajinski ribolovi (Drecun & Ristić, 1964).

Jezersko dno se postepeno spušta od sjeverne obale ka južnoj i jugozapadnoj. Kada je u pitanju mehanički sastav sedimenata u Skadarskom jezeru na potezu od Vranjine do Plavnice dominira sitni pijesak, a na potezu od ušća Rijeke Crnojevića do pelagijala, preovlađuje glina. Jezero kao i njegovo slivno područje, leži na krečnjačkoj, geološkoj podlozi, što je uzrok jako sporom procesu formiranja zemljišta, koje je siromašno hranljivim solima. Na pojedinim mjestima sjeverne obale se formiralo organogeno barsko zemljište (Podhum, Rijeka Crnojevića, Plavnica) sa dosta humusa, i moćnom makrofitskom vegetacijom (Nedeljković, 1959).

Sa crnogorske strane u Jezero se ulivaju sledeće rijeke: Morača, Rijeka Crnojevića, Karatuna, Crmnica, Plavnica, Zetica, Gostiljska rijeka, Pjavnik i Mrka. Sa albanske strane Jezero se napaja vodom iz rijeka: Proni Tat, Rijola i Kiri. Pored ovih rijeka Značajan dio vode (oko 30%) Jezero dobija i iz sublakustričnih izvora, od kojih treba istaći Raduško (44 m dubine), Karučko (20 m) Sijeračko i Krnjčko (14 m), Toplansko (12 m), Šestansko (9 m). Jezero ima samo jednu otoku – rijeku Bojanu, koja ističe na krajnjem jugoistoku jezera. Korito rijeke Bojane se stalno zasipa usljed prodiranja Drima, što utiče na konstatno podizanje nivoa vode jezera. Pored toga, na podizanje nivoa vode utiču jesenje i zimske padavine, koje uslovljavaju ogroman priliv vode u jezero iz Morače, Rijeke Crnojevića, Karuča itd. To je uzrok i velikih poplava koje nekada traju i do 6 mjeseci.

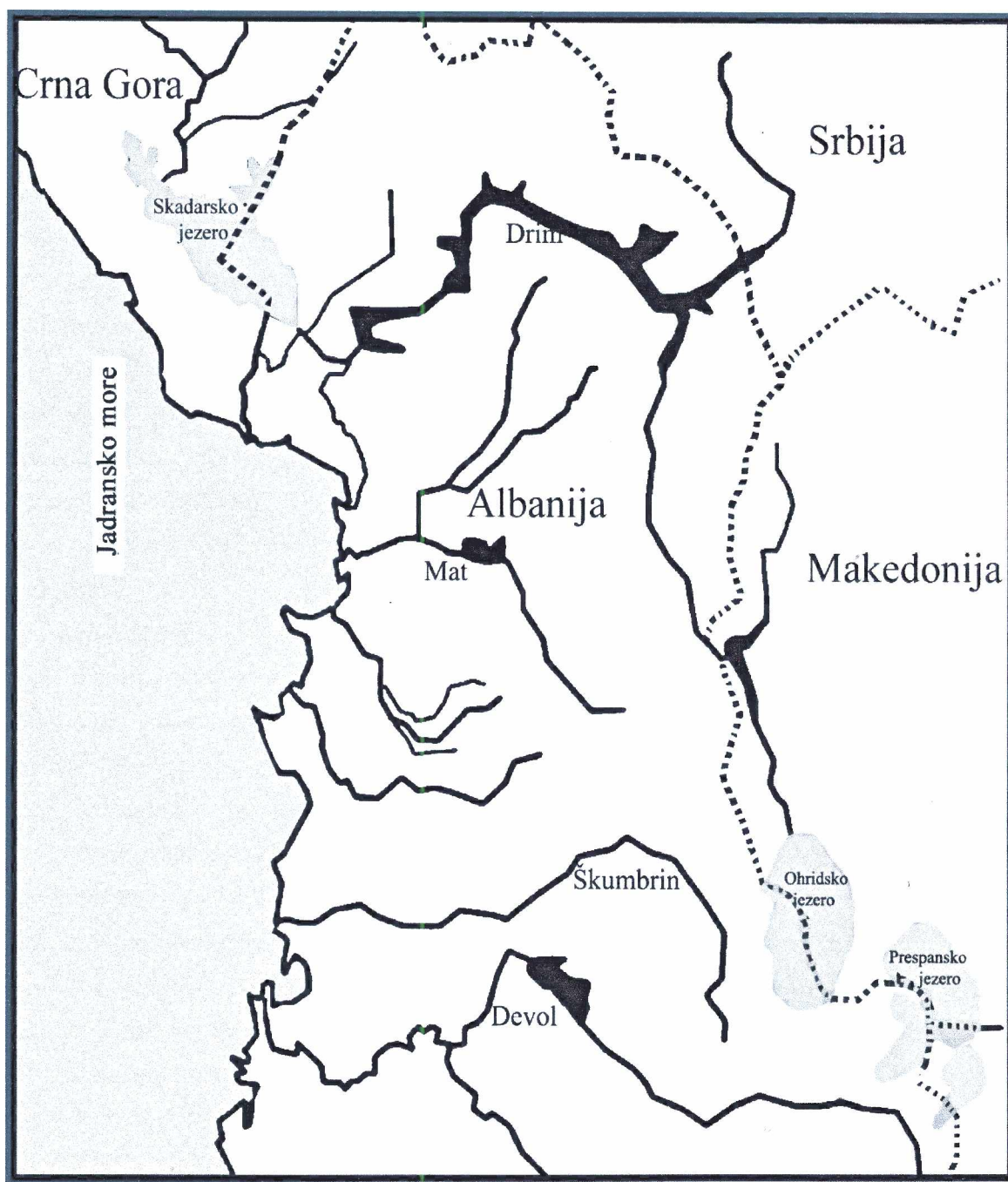
Za vrijeme visokih vodostaja dio vode Skadarsko jezero dobija od rijeke Drim, čije slivno područje iznosi oko 14 000 km<sup>2</sup>. U blizini Skadra račva se na dva kraka, jedan koja

se uliva u Jadransko more i drugi koji utiče u rijeku Bojanu. Za vrijeme perioda godine kada su kote voda rijeke Drima na njegovom ušću u rijeku Bojanu, više od nivoa Skadarskog jezera, dio njegovih voda skreće na sjever i vodotokom Bojane uliva se u Skadarsko jezero, a dio otiče u pravcu juga takođe Bojanom u Jadransko more. Pretpostavlja se da se ovakva situacija javljala i ranije. Od kada postoje zabilježeni podaci (1846) kada je Drim napustio svoje korito od Vaudeisa, na jugu prema Lješju, i oformio novo prema zapadu i sjeverozapadu u pravcu Bojane. Od 1886. godine Drim je i potpunosti napustio staro korito južno od Vaudeisa. Ušće Drima u Bojanu je na oko 2,5 km, od njenog izlaza iz Jezera, pri vodostajima nižim od 7, 5 mnm (Hrvačević, 2004). Na ovaj način rijeka Drim ima posredan i povremen uticaj na vode Skadarskog jezera. Osim toga na ovaj način je i ostvarena komunikacija između dva najveća jezera na Balkanskom poluostrvu (Ohridskog i Skadarskog jezera), budući da Drim nastaje od Bijelog i Crnog Drima (glavne otoke Ohridskog jezera) (Slika 6). Kao posledica izgradnje brana na rijeci Drim recentni hidrološki putevi elemenata biodiverziteta su prekinuti.

Vode Skadarskog jezera karakteriše još uvijek povoljan sadržaj rastvorenog kiseonika i relativno niske vrijednosti rastvorenih soli. U zavisnosti od dubine vode i uticaja podzemnih voda temperatura vode je različita u njegovim pojedinim djelovima. Na području vrulja temperatura vode je i do 13°C. U površinskim djelovima tokom ljeta temperature vode na mjestima gdje nema vrulja može dostići i preko 27°C.

### 1.3.2. KLIMATSKE ODLIKE

Geografski položaj Skadarskog jezera u području mediteranske zone uslovljava i niz specifičnosti u njegovom klimatskom režimu. Po svojim klimatskim odlikama Jezero pripada semiaridnoj mediteranskoj zoni. Aridnost i neravnomjerna raspodjela padavina u toku godine su glavne karakteristike ove zone. U godišnjem ciklusu uglavnom su ispoljena dva perioda: topli, sušni period niskog vodostaja i hladni, sa obiljem atmosferskog taloga i visokim vodostajem. Na području Skadarskog jezera duvaju česti i jaki vjetrovi koji utiču na isparavanje i sušenje pedološke podloge jezerskog područja.



**Slika 6.** Ohrid-Drin-Skadar sistem. Na slici je prikazano i Prespansko jezero zbog njegovog uticaja na vodni režim Ohridskog jezera.



### 1.3.3. BIOCENOLOŠKI SASTAV ISPITIVANOG PODRUČJA

#### 1.3.3.1. MAKROFITSKA VEGETACIJA

Vidljiva karakteristika basena Skadarskog jezera je izražena makrofitska vegetacija koja ima i veliki značaj u životu jezera. Njen značaj se prvenstveno ogleda u kruženju nutrijenata, potom u ulozi da služi kao supstrat na kome se razvijaju epifitske zajednice mikroflore i mikrofaune, a takođe predstavlja i jedno od glavnih mrijestilišta nekih ciprinidnih riba. Osim toga, makrofitska vegetacija jezera predstavlja habitat i izvor hrane nekim vrstama riba, a ima i veliku ulogu u zaštiti od predatora budući da je neke ribe koriste kao privremeno sklonište.

U pojedinim djelovima jezera diverzitet makrofitske vegetacije je različito izražen. Najizraženiji diverzitet makrofita je duž litoralnog dijela istočne obale, dok se nepristupačna južna i jugozapadnoj obala odlikuje oskudnom makrofitskom vegetacijom (Talevska *et al.*, 2009). U Skadarskom jezeru su prisutne sve tri ekološke grupe ovih biljaka: emerzne, flotantne i submerzne makrofite koje su distribuirane u vidu pojaseva (Nedeljković, 1959).

Najznačajnije zajednice emerzne vegetacije su: *Eleochari-Hippuridetum* Passage 1955., *Sparganio-Glycerietum* fluitantis Br.-Bl. 1925., *Scirpo-Phragmitetum* W. Koch 1926., *Menthetum aquaticae* Lakušić & Pavlović 1976 i *Ludwigietum-Palustris* Lakušić & Pavlović 1976.

Flotantna vegetacija Jezera pripada svezi *Nymphaeion* Oberd 1957., i diferencira se u više asocijacija od kojih su najvažnije: *Myriophyllo-Nupharetum lutei* W. Koch 1926, *Nymphoidetum peltatae* (All, 1926) Oberd & Mull 1960. Ove fitocenoze najčešće naseljavaju vodu dubine 1-3 m. Flotantnoj vegetaciji pripadaju i zajednice *Nymphaetum albo-lutae* Nowinski 1928. i *Trapetum natantis* Th. Mullet Gors 1960. Treba napomenuti i to da je u Jezeru prisutna flotantna *Trapa longicarpa* M.Jank. ssp. *scutarensis* M.Jank (vodeni orašak) koja predstavlja endemičnu podvrstu Skadarskog jezera.

Submerzna vegetacija obuhvata zajednice *Najadetum marinae* Fuk. 1961., *Potameto-Najadetum* Hić & Micevski 1960., *Potametum perfoliati* Lakušić & Pavlović 1976. i *Potametum lucentis* Hueck 1931., koje pripadaju svezi *Potamion erosibiricum* (W. Koch 26) Oberd 1956. Takođe su prisutni i predstavnici Charophyta. Kao dominantni predstavnici javljaju se *Chara vulgaris* L. i *Chara fragilis* Desv.

### 1.3.3.2. FITOPLANKTON

U kvalitativnom smislu strukturu fitoplanktonskih zajednica sačinjava veliki broj vrsta i formi. Poslednja istraživanja (Rakočević, 2006) pokazuju da je u zajednici fitoplanktona dominantna grupa Bacillariophyta, od kojih je zabilježeno 87 taksona, što čini 52.8% ukupnog broja taksona zabilježenih u zajednici. Zatim slijedi grupa Chlorophyta sa 20 evidentiranih taksona, koje čine 29.7% kvalitativne strukture fitoplanktonske zajednice. Ostale grupe su zastupljene sa znatno manjim brojem taksona: Pyrrophyta sa 4 (2,4%), Chysophyta sa 3 (1.8%) i Euglenophyta sa 2 taksona (1.2%).

### 1.3.3.3. ZOOPLANKTON

Zajednicu zooplanktona Skadarskog jezera karakteriše veliki broj vrsta. Za period 1973-1978. godine registrovano je 355 vrsta. Najbrojnije među njima bile su vrste iz grupe Rotatoria sa 205 vrsta, potom Cladocera sa 54 vrste, Protozoa sa 50 vrsta, dok su Copepoda bile zastupljene sa 29 predstavnika. Podaci navedeni u Karaman & Beeton (1981) govore da je u jezeru registrovano 438 vrsta, varijeteta i formi. Dominantna grupa su Rotatoria sa 262 vrste, a nakon njih Protozoa sa 82 vrste. Od 134 registrovana roda po broju vrsta najbrojniji su sledeći: Lecane sa 34 vrste, Trichocerca sa 25, Brachionus sa 17, Euchlanis i Keratella sa 16. Zatim slijede Testudinella sa 12, Diffugia sa 11, Arcella sa 10 i Alona sa 8.

Ukupna brojnost zooplanktonskih organizama poklapa se sa periodom stabilnih hidroloških prilika u jezeru tako da se maksimalne vrijednosti registruju u periodu maj-okrobar. U ljetnjem periodu često dolazi do masovne produkcije pojedinih vrsta, npr *Stentor* sp. kada se pojavljuje tzv. "cvjetanje vode". Po broju vrsta sublakustrični izvori se praktično ne razlikuju od ostalog dijela jezera dok se između ušća rijeka i ostalog dijela jezera uočavaju znatne razlike.

### 1.3.3.4. ZOOBENTOS

Istraživanje Karamana & Nedića (1981) pokazuje da su u zoobentoskoj zajednici Skadarskog jezera dominantne sledeće grupe organizama: Chironomidae, Oligochaeta, Gastropoda i Bivalvia. U manjem broju prisutne su grupe Trichoptera, Ephemeroptera i Amphipoda. Po kvalitativnom sastavu zoobentoske zajednice cijelo jezero ima veoma





uniforman sastav. Kada se posmatra kvalitativni sastav ove zajednice uočavaju se znatne razlike. Ove razlike se naročito manifestuju između sublakustričnih izvora i ostalog dijela jezera. U centralnom, otvorenom dijelu jezera mnogo je veća gustina populacije bentoskih organizama, nego u litoralnoj zoni. Među Gastropodama najbrojniji je *Viviparus acerosus* (Bourguignat, 1862) koji je dominantan u zoni makrofita. U otvorenom dijelu jezera, a naročito u sublakustričnim izvorima brojne su vrste roda *Pyrgulla*. Grupa *Bivalvia* je zastupljena sa nekoliko vrsta, među kojima se najčešće srijeću *Unio* sp., *Anodonta* sp., *Pisidium* sp. i *Dreissena polymorpha* koja je naročito brojna duž južne jezerske obale, gdje dostiže brojnost od 300 ind/m<sup>2</sup>. Kao članovi faune dna Skadarskog jezera u velikom broju nalaze se i bentoske Cladocera i Copepoda.

### 1.3.3.5. NEKTON

Nektonska komponenta, odnosno ihtiofauna Skadarskog jezera odlikuje se velikim kvalitativnim i kvantitativnim bogatstvom svojih članova. Predstavlja veoma značajnu kariku u lancima ishrane i ima važnu ulogu u strukturi ovog ekosistema. Ihtiofauna Jezera se karakteriše prisustvom kako slatkovodnih, tako i morskih vrsta riba koje povremeno naseljavaju jezero. Na sastav nektonske komponente jezera niz faktora je imalo uticaja. Prvenstveno treba istaći hidrografski položaj i karakter jezera, zatim klimu, fizičko-hemijske osobine vode, kao i povezanost sa rijekama i Jadranskim morem. Na sastav ihtiofaune jezera veliki uticaj ima i Ohrid-Drim-Skadar sistem koji je veza jezerskog, riječnog i morskog ekosistema. Drim predstavlja glavnu vezu između dva jezera, a rijeka Bojana nekim vrstama predstavlja glavni migracioni put između Skadarskog jezera i mora, a takođe omogućava i prodiranje nekih morskih vrsta u jezero.

Različiti negativni uticaji, prvenstveno antropogenog porijekla kao što su razne vrste zagađenja, introdukcija novih vrsta i prekomjeran izlov uticali su na izmjenu strukture ihtiofaune Jezera tako da se današnje stanje značajno razlikuje od onog prije 30-40. godina. Literaturni podaci (Marić & Milošević, 2010) govore da dvije vrste roda *Acipenser* nisu registrovane u jezeru za poslednjih 20. godina. Tako na primjer vrsta *Acipenser sturio*, koja iz mora zalazi u slatke vode nije registrovana u poslednjih 15. godina. Vrste iz porodice Salmonidae danas u jezeru predstavljaju pravu rijetkost. Brojnost populacija nekad ekonomski najvažnih vrsta (*Chondrostoma ohridanum*, *Cyprinus carpio*, *Alburnus scoranza*) je značajno smanjena, dok se brojnost ekonomski manje značajnih vrsta (npr. *Squalius squalus* i *Rutilus* sp.) jako povećala.

Na osnovu dosadašnjih istraživanja u slivu Skadarskog jezera registrovano je 50 vrsta od kojih su 37 autohtone i 13 alohtonih (Marić & Milošević, 2011) (**Tabela 3**). U ihtiofauni Skadarskog jezera dominantni su predstavnici familije Cyprinidae (22 vrste).

Spektar prisutnih ekoloških formi je veoma raznovrstan. U pogledu ishrane odsustvuju jedino autohtoni detritofagi. Od autohtonih plantofagnih zastupljena je ukljeva (*Alburnus scoranza*), a od alohtonih sivi (*Hypophthalmichthys nobilis*) i bijeli (*H. molitrix*) tolstolobik. Od piscivornih vrsta koja ima značajniju brojnost je unešena vrsta grgeč *Perca fluviatilis*. Jedina vrsta koja se hrani perifitonom je skobalj (*Chondrostoma ohridanum*), čija je nekad brojna populacija prekomjernim izlovom dovedena do statusa ugroženosti. U pogledu biomase najznačajnije vrste su ukljeva (*A. scoranza*), krap (*Cyprinus carpio*), srebrni karaš (*Carassius gibelio*) i grgeč (*P. fluviatilis*). Po ekonomskom značaju najznačajni vrste riba su ukljeva (*A. scoranza*) i krap (*C. carpio*). U pogledu razmnožavanja u jezeru nisu prisutni tipični autohtoni pelagofili. Od alohtonih su prisutni *H. molitrix* i *H. nobilis* ali budući da se oni ne mogu razmnožavati moguće je kontrolisati njihovu brojnost.

Prisustvo velikog broja sublakustričnih izvora daju posebnu specifičnost biologiji i ekologiji elemenata ihtiofaune. Ova specifičnost se naročito izražava tokom zimskog perioda jer oka karakteriše povoljni termički režim i time predstavljaju važna zimovališta za neke vrste riba. Istovremeno predstavljaju i glavna područja izlovljavanja većih količina ekonomski značajnih vrsta riba u toku zimskog perioda, a sredinom XX vijeka u ukupnom ulovu svih vrsta jezerskih riba u toku godine, ulov ukljeve iz "oka" je bio 33% (Drecun & Ristić, 1964). Najveća količina od 213,5 tona ribe ulovljena je u oku zvanom Ploča 1957. godine (Drecun & Ristić, 1964), a najveći ulov u jednom potegu mreže iznosio je 150 tona u istom oku marta 1949. godine (Drecun & Miranović, 1962). Osim ekonomski važnih vrsta riba značajna komponenta izlova u sublakustričnim izvorima predstavljaju i ekonomski beznačajne vrste kao što su vrste iz rodova *Rutilus*, *Scardinius* i drugih, čija se brojnost znatno povećala krajem XX vijeka (Marić & Krivokapić, 1989). Tako na primjer u crmničko-krajinskim (posebno u Raduškom "oku") dominantne su vrste roda *Rutilus*, dok je u ceklinskim sublakustričnim izvorima dominantna ukljeva, a na drugom mjestu je *Rutilus* sp. (Marić & Kažić, 1990).

Tabela 3. Popis riba basena Skadarskog jezera (po Marić &amp; Milošević, 2011).

	Vrsta	Domaći naziv	Engleski naziv	Autohtona vrsta	Alohtona vrsta
1.	<i>Acipenser naccarii</i> Bonaparte, 1834-1841	Jadranska jesetra	Adriatic sturgeon	+	
2.	<i>Acipenser sturio</i> Linnaeus, 1758	Atlantska jesetra	Atlantic sturgeon	+	
3.	<i>Alburnoides ohridanus</i> (Karaman, 1928)	Ohridska ukļjevlca	Ohrid spirin	+	
4.	<i>Alburnus scoranza</i> (Heckel & Kner, 1858)	Ukljeva	Scoranza	+	
5.	<i>Alosa fallax</i> (La Cépède, 1803)	Kubla, fraga	Twait shad	+	
6.	<i>Alosa</i> sp.	Zimska fraga	Skadar shad	+	
7.	<i>Ameiurus nebulosus</i> Lesueur, 1819	Američki somić	Brown bullhead		+
8.	<i>Anguilla anguilla</i> (Linnaeus, 1758)	Jegulja	European eel	+	
9.	<i>Atherina boyeri</i> Risso, 1810	Gavun		+	
10.	<i>Barbatula zetensis</i> (Šortić, 2000)	Zetska brkica	Zeta stone loach	+	
11.	<i>Barbus rebelli</i> Koller, 1925	Ohridska (primorska) mrena	Western Balkana barbel	+	
12.	<i>Carassius gibelio</i> (Bloch, 1783)	Srebrni karaš, kinez	Prussian carp	+	
13.	<i>Chondrostoma scodrensis</i> Elvira, 1987	Skadarski skobalj	Skadar nase	+	
14.	<i>Chondrostoma ohridanus</i> Karaman, 1924	Ohridski skobalj	Ohrid nase	+	
15.	<i>Citharus linguatulus</i> (Linnaeus, 1758)	Pijosnatica	Atlantic spotted flounder	+	
16.	<i>Ctenopharyngodon idella</i> (Valenciennes, 1844)	Vilun	Ohrid spined loach	+	
17.	<i>Cyprinus carpio</i> Linnaeus, 1758	Bijeli amur	Grass carp	+	
18.	<i>Dicentrarchus labrax</i> (Linnaeus, 1758)	Saran, krap	Carp	+	
19.	<i>Gambusia holbrooki</i> (Girard, 1859)	Lubin, levrek	Sea bass	+	
20.	<i>Gasterosteus gymnotus</i> Cuvier, 1829	Gambuzija	Eastern mosquitofish	+	
21.	<i>Gobio skadrensis</i> Karaman, 1933	Bodonja	Western threespine stickleback	+	
22.	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i> (Valenciennes, 1844)	Skadarska mrenica	Skadar gudeon	+	
23.	<i>Hypophthalmichthys nobilis</i> (Richardson, 1844)	Bijeli tolstolobik	Silver carp	+	
24.	<i>Lisa ramada</i> Risso, 1826	Sivi (glavati) tolstolobik	Bighead carp	+	
25.	<i>Megalobrama terminalis</i> (Richardson, 1844)	Cipol balavac	Thinlip mullet	+	
26.	<i>Mugil cephalus</i> Linnaeus, 1758	Amurska ceverika	Black Amur bream	+	
27.	<i>Mylopharyngodon piceus</i> Richardson, 1845	Cipol glavša	Striped mullet	+	
28.	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Walbaum, 1792)	Crni amur	Black carp	+	
29.	<i>Pachychilon pictum</i> (Heckel & Kner, 1858)	Kalifornijska (dužica) pastmka	Rainbow trout	+	
30.	<i>Pelagus minutus</i> Karaman, 1924	Saradan, brcač	Spotted roach	+	
31.	<i>Perca fluviatilis</i> Linnaeus, 1758	Ohridska gaovica	Ohrid minnow	+	
32.	<i>Phoxinus phoxinus</i> Schinz, 1811	Grgeč	Perch	+	
33.	<i>Pleurocetes flossus</i> Pallas, 1811	Gaovica, gagica, zelenak	Italia, Adriatic minnow	+	
34.	<i>Pomatoschistus montenegrensis</i> Miller & Šanda, 2008	Iverak, list	Flounder	+	
35.	<i>?Pomatoschistus marmoratus</i> (Risso, 1810)	Morački vodenjak, glavč	Skadar goby	+	
36.	<i>Pseudorasbora parva</i> Temmin & Schlegel, 1846	Mramorasti glavč		+	
37.	<i>Rhodeus amarus</i> (Bloch, 1782)	Amurski čebačok	Pseudorasbora	+	
38.	<i>Rutilus albus</i> sp. nov.	Gavčica	Bitterling	+	
39.	<i>Rutilus ohridtrius</i> (Karaman, 1924)	Bijelaš, bijeli brcač, bijela brona	White roach	+	
40.	<i>Salapia fluviatilis</i> Asso, 1801	Žutaj, žuti brcač, žuta brona	Ohrid roach	+	
41.	<i>Salmo fario</i> Linnaeus, 1758	Riječna babica	Freshwater blenny	+	
42.	<i>Salmo marmoratus</i> Cuvier, 1817	Primorska potočna pastmka	Balkan brook trout	+	
43.	<i>Salmothymus zetensis</i> Hadžišćić, 1962	Glavatica	Marble trout	+	
44.	<i>Salvelinus fontinalis</i> Mithrilli, 1815	Zetska mekousna	Soft-muzzled trout	+	
45.	<i>Scardinius knzevici</i> (Bianco & Kottelat, 2005)	Potočna zlatovčica, barjaktarica	Brook char	+	
46.	<i>Squalius squalus</i> Bonaparte, 1837	Lola, lclja	Skadar rudd	+	
47.	<i>Syngnathus abaster</i> Risso, 1826	Silo	Cavedano chub	+	
48.	<i>Telestes montenigrinus</i> (Vuković, 1965)	Mekiš, primorski kiljen		+	
49.	<i>Thica tinca</i> Linnaeus, 1758	Mekiš, moračka jelšovka	Montenegro riffle dace	+	
50.		Linjak	Tench	+	

## 1.4. METODE DIFERENCIJACIJE RIBLJIH POPULACIJA

Za diferencijaciju ribljih populacija najčešće se upotrebljavaju dvije osnovne grupe metoda i to: morfološke i genetičke metode. Za utvrđivanje nivoa diferencijacije među srodnim simpatričkim vrstama neophodno je utvrditi i stepen fenotipske divergencije. Međutim, s obzirom na značajan uticaj uslova koji vladaju u jednom vodenom ekosistemu na fenotipski izgled i osobenosti pojedinih populacija pri njihovoj diferencijaciji važnu ulogu imaju i kriterijumi diferencijacije na osnovu ekoloških pokazatelja.

### 1.4.1. MORFOLOŠKE METODE DIFERENCIJACIJE RIBLJIH POPULACIJA

I pored razvoja savremenijih metoda klasična morfološka istraživanja i dalje predstavljaju nezaobilazan pristup i izvor podataka za utvrđivanje sličnosti/razlika između pojedinih grupa riba. U upotrebi su kako ona koja se bave spoljašnjom morfologijom, tako i osteološka istraživanja. Najčešće primjenjivane su morfometrijske i merističke metode. Razlozi njihove široke upotrebe su jednostavnost i pristupačnost budući da morfološki karakteri ostaju sačuvani i pri konzervaciji jedinki. Odabirom pravog seta karaktera i vrste analize dobijeni rezultati će se nesumljivo pokazati pouzdani. S obzirom na to da je razvitak svake populacije utemeljen na genetičkim osobenostima kao i na raznovrsnim uticajima spoljašnje sredine, morfometrijske metode su dobri pokazatelji interakcije genoma i habitata.

Karakteristi koji se najčešće koriste u morfološkim istraživanjima su morfometrijski i meristički karakteri. Ove dvije grupe karaktera se razlikuju statistički (morfometrijski su neprekidni, kontinuirani, a meristički su diskontinuirani) i biološki (morfometrijski su podložni promjenama pod uticajem sredinskih faktora, a meristički su fiksirani rano u toku embrionalnog razvika) (Ihssen *et al.*, 1981). Pri opisivanju vrsta i sagledavanju njihovog sistematskog statusa, diskontinuiranim karakteristikama se zbog manje promjenljivosti pridaje veći značaj. Iako predstavljaju veoma stabilne karaktere u postembrionalnom razviku, po pravilu u svim populacijama postoji veća ili manja unutarpopulaciona varijabilnost. Meristički karakteri predstavljaju diskretne, serijski ponavljajuće i brojive parametre. U merističkim analizama ribljih populacija najčešće se koriste sledeći karakteri: broj krljušti u bočnoj liniji, broj žbica u perajima (tvrdih i mekih), broj kičmenih pršljenova i broj branhiospina na škržnim lucima.

Mjerenje, analiza i kvantifikacija morfološke varijabilnosti pripadaju oblasti morfometrije, disciplini morfologije, koja se bavi karakterizacijom bioloških struktura na osnovu kvantifikacije morfološke varijabilnosti (Ivanović & Kalezić, 2009). Morfometrijskim metodama se utvrđuju dimenzije pojedinih delova tijela, kao i odnosi među pojedinim karakteristikama (na primjer: dužina glave u odnosu na dužinu tijela, horizontalni dijametar oka u odnosu na dužinu glave itd). Najčešće korištene karakteristike u analizi oblika i veličine tijela predstavljaju rastojanja između



anatomskih tačaka na longitudinalnoj osi (dužinske karakteristike), dorzoventralnoj osi (karakteristike visine) i osi koja povezuje lijevu i desnu stranu tijela (karakteristike širine) (Marić, S., 2005). Nedostatak tradicionalne morfometrije (upotreba dužinskih mjera) jeste u tome što je mogućnost opisivanja oblika preko ovih mjera ograničena, kao i mogućnost razdvajanja veličine od oblika tijela. Takođe, bez obzira na broj mjera, primijenjenu šemu mjerenja, ili raspored specifičnih tačaka koje definišu data rastojanja, tradicionalna morfometrija i dužinske mjere ne nose informaciju o geometriji same morfološke cjeline (Zelditch *et al.*, 2004). Zato su sve češće u upotrebi alometrijske analize koje uključuju poređenja odnosa veličine i oblika morfoloških cjelina na različitim nivoima.

Morfološki karakteri se tradicionalno koriste kao validni karakteri u sistematici i taksonomiji, zatim u antropologiji i evolucionoj biologiji. Međutim sve se više morfometrija primjenjuje u ekologiji, genetici i biologiji razvića (Ivanović & Kalezić, 2009). Treba istaći i veliki značaj morfoloških pokazatelja u istraživanjima koja su predmet ekomorfologije (Ricklefs & Miles, 1996; Klingenberg, 1996). Morfološka istraživanja su često i izvor podataka za analizu filogenetskih odnosa (Wiens, 2004). Studije o morfološkim variranjima među populacijama imaju značajnu ulogu i u identifikaciji ribljih fondova budući da ustaljene razlike u obliku između grupa riba mogu pokazati različit rast, mortalitet ili reproduktivnu stopu što je relevantan pokazatelj stanja ribljeg fonda (Cadrian, 2000).

## GENETIČKE METODE DIFERENCIJACIJE RIBLJIH POPULACIJA

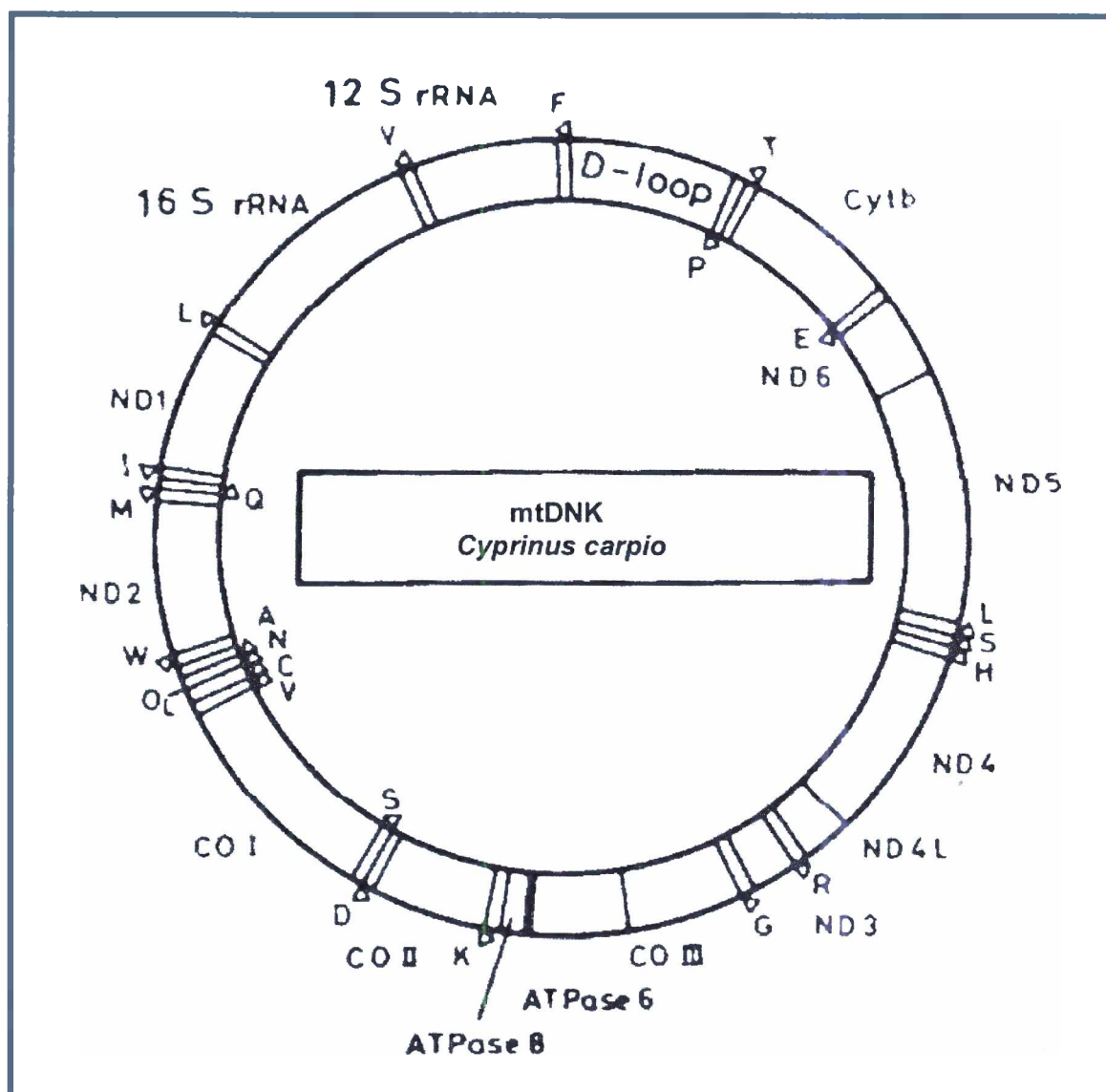
Veći broj molekularnih tehnika danas se koriste u cilju dobijanja važnih genetičkih podataka od različitih vrsta riba. Poznavanje genetičkih sličnosti-razlika među vrstama kao i populacijama ima važnu primjenu u taksonomiji, ekologiji, konzervacionoj biologiji, i dr. Pouzdane procjene stepena diferencijacije među izučavanim biološkim jedinicama imaju značaja u razumijevanju nivoa sličnosti i razlika što predstavlja važnu stavku u određivanju taksonomskog nivoa i (uspostavljanju) predlaganju konzervacionih planova. Za razumijevanje taksonomskog nivoa od velike je važnosti odrediti stepen genetičke diferencijacije.

Genetička raznovrsnost vrsta i populacija može se utvrditi korišćenjem molekularnih tehnika. Razvoj novih, visoko varijabilnih i relativno lako dostupnih genetičkih markera doprinosi potpunijem razumijevanju nekadašnjih znanja i pružio niz mogućnosti u sticanju novih. Jedan od takvih marker predstavlja sekvencu na molekulu DNK ili proteinu koja se lako može izolirati i čije je nasljeđivanje moguće pratiti (Ford-Lloyd, 1996). Upotrebom različitih markera, kako jedarnih tako i mitohondrijalnih, lokusa koji su pod uticajem selekcije (kao i lokusa koji ne podliježu selekciji (mikrosateliti), najlakše se može dobiti uvid u strukturu populacije. Za tačnije utvrđivanje filogenetskih odnosa između taksona i potpunije slike genetičkog polimorfizma neophodno je uključiti što veći broj genetičkih marker.

U cilju utvrđivanja i praćenja genetičke varijabilnosti vrsta i populacija kao i u sistematici danas se najčešće koriste dvije grupe genetičkih markera i to: jedarna DNK i ponavljajuće sekvence jedarne DNK- mikrosateliti.

### MITOHONDRIJSKA DNK KAO GENETIČKI MARKER

Mitohondrije su semiautonomne ćelijske organele u kojima se obavljaju procesi od velikog značaja za ćelijski metabolizam. Prisutne su u svim ćelijama kičmenjaka osim u crvenim krvnim zrnima sisara. Broj mitohondrija po ćeliji se u velikoj mjeri razlikuje od jedne do druge vrste i – može ih biti od jedne do više hiljada ili čak nekoliko stotina u ćelijama sisara (Casto 2001). S obzirom da posjeduju sopstveni nasledni "zapis" (mitohondrijalna DNK) i da su u mogućnosti da vrše autonomnu replikaciju, kao i da vrše transkripciju i translaciju genetičke informacije u proteine, jedarni i mitohondrijalni genom su funkcionalno semiautonomni (Casto *et al*, 1998).



**Slika 7.** Raspored gena na mt DNK kod šarana *Cyprinus carpio* (po Chang *et al.*, 1994)

Mitohondrijalna DNK (mtDNK) je cirkularni dvolančani molekul dužine 15-20 kb (Avisé, 1994) i predstavlja značajan dio genoma koji čini do 1% ukupne ćelijske mase DNK (Cables, 2001). Genomska organizacija mtDNK kod riba veoma je slična (Lee *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2004) sa ostalim kičmenjacima, uključujući i ljude (Wallace, 1992; Kogelnik *et al.*, 2005). Chang *et al.* (1994) je sekvencirao kompletan genom mtDNK (16575bp) šarana (*Cyprinus carpio* L.) i uporedio ga mtDNK ostalih kičmenjaka (**Slika 7**). Kao i kod ostalih kičmenjaka mtDNK šarana sadrži set od 37 gena i to: dva za kodiranje rRNK, 22 gena koji kodiraju tRNK i 13 proteinskih gena za kodiranje polipeptida angažovanih u transportu elektrona i oksidativnoj fosforilaciji. Osim nabrojanih gena na mtDNK se nalazi i kontrolna regija (*eng.* D-loop) dužine oko 1000 bp sa sekvencama čija je uloga u regulaciji replikacije i transkripcije. Na mtDNK kodiraju se sledeći proteini: citohrom *b*, tri podjedinice citohrom oksidaze, dvije podjedinice ATP sintetaze i sedam podjedinica NADH (**Slika 7**). Kod većine vrsta mtDNK se nasleđuje po materinskoj liniji

(Giles *et al.*, 1980), mada ima primjera i biparentalnog nasljeđivanja kod beskičmenjaka (Hoeh *et al.*, 1991). Budući da se mitohondrijalni genom jednostrano nasljeđuje za razliku od jedarne DNK ne podliježe rekombinaciji za vrijeme mejoze ili neke druge faze ciklusa. Kao posljedica toga mtDNK se nepromijenjena prenosi sa roditelja na potomstvo.

mtDNK karakteriše i visok stepen mutacija što je naročito važno pri njenom korišćenju kao genetičkog markera naročito u evolucionim studijama. Utrđeno je da stepen supstitucija za pojedinačno nukleotidno mjesto iznosi  $5,7 \times 10^{-8}$  za godinu dana, što znači da mtDNK akumulira 2-4% mutacija za milion godina, a to govori da i 10 puta brže evoluira u odnosu na nuklearnu DNK (Brown *et al.*, 1979). Visoka mutaciona stopa mtDNK može za relativno kratak vremenski period stvoriti intraspecifični polimorfizam i interspecifičnu divergenciju (Avice *et al.*, 1987). Najvarijabilniji dio genoma mtDNK je kontrolna regija (Moritz *et al.*, 1987), dok se regioni koji kodiraju rRNK karakterišu najnižom frekvencijom mutacija. Nesklad koji postoji u stopi evolucije između mitohondrijalne i nuklearne DNK je dokaz da su genomi u različitim subćelijskim strukturama unutar organizma pod različitom kontrolom i različitim evolucionim pritiskom, koji se razlikuje među taksonima (Brown *et al.*, 1979).

Glavne karakteristike koje mtDNK čine važnim genetičkim markerom su: jednostavna organizacija, materinsko nasljeđivanje, odsustvo rekombinacija i visok stepen mutacija (Avice, 1994). Kao genetički marker koristi se u taksonomskim, evolucionim i filogenetskim istraživanjima (Wallace, 1992; Avice, 2001). Mnogi djelovi mtDNK se koriste kao i važni genetički markeri u procjeni intra i interspecijskog diverziteta, pri evaluaciji genetičke strukture vrsta ili populacije, kod ukrštanja, introgresija kao i evolucionih odnosa bliskih vrsta ili populacija. Podaci koji se dobijaju analizama sekvenci mtDNK mogu poslužiti i za utvrđivanje genealoških odnosa ispitivanih taksona i procjeni vremena divergencije od zajedničkog pretka.

Mitohondrijalna DNK riba je veoma dobro proučena. Poznavanje i mogućnost amplifikacije pojedinih njenih djelova reakcijom lančane polimerizacije uz korišćenje "univerzalnih" prajmera učinili su je prihvatljivim alatom u molekularnoj genetici riba. S obzirom da regioni koji se najčešće koriste u tim analizama sadrže visoko konzervativne bočne regione nije neophodno dizajnirati prajmere za svaku vrstu ponaosob već je moguće koristiti prajmere srodnih vrsta. Područje kontrolne regije kao i područja gdje su smješteni geni za kodiranje proteina pokazali su se kao naročito korisni pri analizama nedavno odvojenih populacija. Najčešće upotrebljivanih geni mtDNK u analizi genetičke diferencijacije na nivou vrsta i familija riba kao i u filogenetskim istraživanjima su citohrom *b* (cyt *b*) i citohrom oksidaza 1 (Co-1) (Johns & Avice, 1998; Kartavtsev & Lee, 2006).

Cyt *b* je vjerovatno najbolje proučen gen mtDNK kod riba i pokazano je da je veoma informativan kao genetički marker u utvrđivanju odnosa među košljoribama. U velikom broju radova na predstavnicima ciprinida koristi se u razmatranjima filogenetskih odnosa kako u okviru čitave familije Cyprinidae tako i njenih pojedinih rodova. U tom kontekstu Zardoya &



Doadrio (1999) su izolovali sekvencu *cyt b* dužine 1140 bp iz 89 ciprinidnih taksona sa područja Evrope u cilju ispitivanja filogenetskih odnosa evropskih ciprinida, dok su Zardoya *et al.* (1999) koristili kompletnu sekvencu *cyt b* u cilju utvrđivanja filogenetskih odnosa ciprinida Grčke. Korišćenjem *cyt b* utvrđivana je genetička varijacija i filogenetski odnosi unutar nekoliko ciprinidnih rodova: *Barbus*-a sa područja Iberijskog poluostrava (Callejas & Ochando, 2000), *Chondrostoma* (Robalo *et al.*, 2007), *Telestes*-a i *Scardinius*-a (Ketmaier *et al.*, 2004), *Rutilus*-a (Ketmaier *et al.*, 2008). Najnoviji radovi u kombinaciji sa nuklearnim sekvencama koriste *cyt b* za rekonstrukciju evolucione istorije nekih ciprinidnih rodova (kao npr. roda *Barbus*) i ocjenu stepena endemizma (Marková *et al.*, 2010). Osim toga koriste se u filogeografskim (Kotlík *et al.*, 2008) i biogeografskim studijama kao i u analizama koje se bave procjenama vremena divergencije pojedinih taksona (Zardoya & Doadrio, 1999; Ketmaier *et al.*, 2008).

Osim istaknutih prednosti mtDNA kao genetičkog markera treba istaći i neke mane. Kao prvo materinsko nasljeđivanje čini ga nepouzdanim markerom pri razlikovanju hibrida. Takođe u analizama srodnih vrsta za rešavanje stepena njihove diferencijacije ili rešavanja taksonomskog problema ne preporučuje se njena upotreba kao jedinog genetičkog markera zbog premale varijabilnosti za ove tipove studija. U tim slučajevima se predlaže upotreba informativnijih genetičkih markera kao što su ponavljajuće sekvence nuklearne DNK - mikrosateliti.

#### 1.4.2.2. MIKROSATELITI

Mikrosateliti predstavljaju jednostavne nukleotidne nizove sastavljene od tandemski ponavljajućih osnovnih motiva dužine od 1 do 6 nukleotida. Broj ponavljanja osnovnih motiva kreće se od 5 do preko 100 po lokusu (Stallings *et al.*, 1991). Nađeni su u genomu svi do sada proučavanih prokariota i eukariota (Zane *et al.*, 2002), a prvi put su otkriveni u eukariotskim ćelijama početkom 1970. godine (Fan & Chu, 2007). Frekvencija njihove zastupljenosti u genomu varira među različitim taksonima (Hancock, 1999). Prisutni su kako u kodirajućim tako i u nekodirajućim regionima, a manji broj ih se nalazi na telomernim i centromernim regijama (Zane *et al.*, 2002). Budući da nisu podložni jakom selekcionom pritisku mikrosateliti su svrstani u grupu neutralnih genetičkih markera. Na osnovu dužine osnovnog ponavljajućeg motiva mogu biti klasifikovani na mono-, di-, tri-, i tetra, penta-, i hexanukleotide (Fan & Chu, 2007).

Na osnovu strukture ponavljanja osnovnog motiva mikrosateliti se dijele u tri grupe:

1. potpuni mikrosateliti (GACAGACAGACAGACACA),
2. sastavljeni mikrosateliti (GACAGACAGACAGATAGATAGATA)
3. prekinuti mikrosateliti (GACATTGACAGATTGACACA)

Sastavljeni i prekinuti mikrosateliti pokazuju manji stepen polimorfizma od potpunih mikrosatelita (Jarne & Lagoda, 1996).

Mikrosateliti karakterišu visoka stopa mutacija (između  $10^{-2}$  i  $10^{-6}$  mutacija po lokusu po generaciji) što prouzrokuje visok nivo diverziteta alela koji je neophodan za genetičke studije (Schlötterer, 2000). Za objašnjenje mutacionog procesa danas je opšte prihvaćen mehanizam replikacijskog ispada ili klizanja (eng. *replication slippage*) koji je prvi put je predložen od strane Kornberg *et al.*, 1964. Ispad se događa tokom replikacije kada molekul DNK postaje jednolančan i svaki lanac služi kao matrica za polimerizaciju novog komplementa. Do te pojave dolazi kada je normalno sparivanje baza dva komplementarna lanca DNK ometeno razmicanjem ponavljajućeg niza na oba lanca, što dovodi do pogrešnog nizanjanja ponavljajućih sekvenci.

Visoka stopa genetičke varijabilnosti i jednostavno kodominantno mendelističko nasleđivanje čini ih genetičkim markerima visokog potencijala da odgovore na brojna pitanja i zato danas predstavljaju jedan od najpopularnijih izbora u raznim vrstama istraživanja. Koriste se za utvrđivanje genetičke strukture i varijabilnosti prirodnih populacija (Balloux & Lugon-Moulin, 2002), pri utvrđivanju porijekla i srodničkih odnosa između jedinki, pri procjenama efektivne veličine populacije kao i mapiranju genoma kod mnogih organizama (Schuler *et al.*, 1996; Knapik *et al.*, 1998). Visoko polimorfni mikrosatelitni lokusi su veoma informativni markeri u rešavanju taksonomskih dilema naročito kod bliskih vrsta. Osim toga njihova primjena pokriva i druge oblasti kao npr. u forenzici, konzervacionoj biologiji, molekularnoj ekologiji itd. (Jarne & Lagoda, 1996). Analiza mikrosatelitnih lokusa postala je takođe i jedan od najpopularnijih izbora pri proučavanju evolucione istorije populacija i vrsta (Kalinowski, 2002). Osim u fundamentalnim naučnim istraživanjima mikrosateliti se sve više upotrebljavaju i u ribarstvu i akvakulturi. Danas se intenzivno koriste u procjenama stanja nativnih ribljih fondova naročito u područjima u kojima je prisutna introdukcija, za kontrolu djelovanja unešenih linija na autohtone vrste i u procjenama stepena hibridizacije. Ovakve vrste studija su u najvećem broju posvećene komercijalno važnim vrstama riba kao što su na primjer predstavnici salmonida (Winkler & Weiss, 2008). Tome u prilog ide i činjenica da je jedna od prvih vrsta riba na kojoj je urađena intra i interpopulaciona analiza varijabilnosti uz korišćenje mikrosatelita dužičasta pastrmka *Oncorhynchus mykiss* (Nielsen *et al.*, 1994). Kod predstavnika ciprinida već je objavljen veliki broj sekvenci prajmera za mikrosateliti kao npr kod *Cyprinus carpio* (Crooijmans *et al.*, 1997), *Rhodeus sericeus* (Dawson *et al.*, 2003), *Leuciscus cephalus* (Vyskočilová *et al.*, 2007).

Glavna mana mikrosatelita je da moraju biti izolovani *de novo* za vrste koje se ispituju po prvi put (Zane *et al.*, 2002). Strategija dizajniranja "univerzalnih" prajmera koja je uspješna za mitohondrijalnu DNK (Kocher *et al.*, 1989) neodrživa je kod mikrosatelita. Proces izolacije vrši se iz genomske biblioteke željene vrste uz korišćenje protokola za njihovu izolaciju (O'Connell & Wright, 1997). Za uspješne studije i preciznije rezultate neophodno je izolovati i za analize upotrijebiti što veći broj lokusa. Važnu ulogu u identifikaciji lokusa ima sekvenca DNK

koja okružuje mikrosatelitni lokus i nosi naziv bočni region (eng. *flanking region*). Za razliku od mikrosatelita koje karakteriše visoka stopa mutacija sekvenca ovog regiona je konzervirana kod jedinki iste vrste. Iz tog razloga se koristi i za identifikaciju samog lokusa jer se na osnovu njene sekvence dizajniraju parovi oligonukleotidni počeci (prajmeri) koji omogućavaju amplifikaciju lokusa reakcijom lančane polimerizacije.

### 1.4.3. EKOLOŠKA DIFERENCIJACIJA VRSTA (POPULACIJA)

Morfološka adaptacija na uslove sredine u kojoj žive, ribama omogućava niz pogodnosti za opstanak. Te se promjene prvenstveno odražavaju i najlakše uočavaju na osnovu fenotipskog izgleda. Postoje brojne studije na ovu temu kako one koje se bave ispitivanjima morfoloških razlika među srodnim simpatričkim vrstama koje su slične u ekološkim zahtjevima (Helland *et al.*, 2009) tako i one koje se bave proučavanjima razlika u ekološkim zahtjevima morfološki sličnih vrsta. Za diferencijaciju bliskih simpatričkih vrsta u jednom ekosistemu neophodno je osim izučavanja fenotipskih sličnosti i razlika pažnju usmjeriti i na njihove zahtjeve u pogledu hranidbenih resursa kao i habitata koje preferiraju duž bentosno-pelagičke ili litoralno-pelagičke ose. Naravno, kao nezaobilazna studija koja ima ključnu ulogu u diferencijaciji taksona na specijskom nivou je stepen reproduktivne izolovanosti.

#### 1.4.3.1. REPRODUKTIVNA BIOLOGIJA

Reprodukcija predstavlja ključni mehanizam opstanka i fundamentalni aspekt u razumijevanju biologije svake vrste. Zato je i jedna od najvažnijih studija pri proučavanju vrsta upravo upoznavanje njihove reproduktivne biologije. Prvi korak koji se vrši u svim reproduktivnim studijama je određivanje pola. Sledeći koraci zavise od potreba samog istraživanja ali se najčešće odnose na utvrđivanje trajanja godišnjeg reproduktivnog ciklusa kao i perioda i mjesta mrijesta. Značajnu ulogu svakako ima i proučavanje fekunditeteta, fertiliteta, embrionalnog razvika i drugih važnih karakteristika. Dosta pažnje je posvećeno proučavanju ovog važnog mehanizma, a rezultati pokazuju da postoje različiti modeli reprodukcije među živim organizmima. Postoje i različiti pristupi pri proučavanju reproduktivne biologije jedne vrste, ali treba istaći i to da većina reproduktivnih studija daju prioritet analizama ženskog pola tj. analizi ovarijalnog ciklusa u odnosu na analize muškog pola.

Generalno posmatrano ribe pokazuju veliki diverzitet reproduktivnih strategija. Karakteriše ih specifičan tip organizacije ovarijuma, fertilnosti i mrijesta (McMillan, 2007). Kod većine riba reprodukcija predstavlja cikličan proces, mada je dužina trajanja ciklusa izrazito varijabilna. Tako se na primjer neke salmonidne vrste, kao i neke vrste jegulja mrijeste jednom u toku života i zatim umiru, druge se razmnožavaju svake dvije do tri godine, dok se većina riba razmnožava jednom, a ponekad i više puta u toku godine.

Kod riba sa cikličnom reprodukcijom izgled ovarijuma značajno varira tokom ciklusa. Identifikacija faza sazrijevanja može se postići makroskopskim i mikroskopskim analizama. Makroskopska analiza stadijuma zrelosti gonada bazirana je na posmatranju promjena u spoljašnjim karakteristikama kao što su promjene u boji, veličini, težini, distribuciji krvnih sudova i makroskopskoj procjeni stepena zrelosti ikre. Mikroskopske analize se vrše na osnovu



citološkog stanja ovarijuma. Procjena stepena zrelosti gonada bazirana isključivo na osnovu spoljašnjih morfoloških karakteristika gonada pokazuje niz mana i nedostataka naročito u ocjeni stepena zrelosti. Ova činjenica nedvosmisleno nameće potrebu za paralelnim analizama razvojnih stadijuma oocita na osnovu histoloških presjeka ovarijuma. Posmatranje razvoja oocita je važan karakter za bolje razumijevanje reproduktivne biologije svake vrste. Naime, ocjena razvojnog stadijuma oocita bilo koje vrste je od izuzetne važnosti zato što sa prelaskom iz jednog u drugi razvojni stadijum promjene registrovane makroskopski ne odražavaju u potpunosti događaje i promjene koje se dešavaju u unutrašnjosti gonada. Iz tih razloga histološke analize ovarijuma omogućavaju preciznije podatke o stepenu zrelosti ovarijama i detaljima u toku ovarijalnog ciklusa jedne vrste.

U toku godišnjeg ciklusa neophodno je obezbijediti dovoljnu količinu zrelih oocita što je moguće samo u slučaju pravilnog procesa oogeneze. To je veoma dinamičan process u kojem oocite prolaze kroz različite razvojne faze do postizanje potpune funkcionalne zrelosti. Iako među pojedinim vrstama riba postoje određene razlike, među košljoribama se generalno može napraviti sledeći redosled faza razvoja oocita: primarni rast, faza kortikalnih alveola, vitelogeneza i faza zrelosti (McMillan, 2007). Naravno, u zavisnosti od vrste i potreba samog istraživanja moguće je izvršiti njihove modifikacije u smislu veće ili manje detaljne razrade pojedinih razvojnih faza. Kriterijumi koji se koriste za određivanje stepena razvoja oocita su: struktura nukleusa, nagomilavanje vitelusnog materijala i formiranje acelularnih i celularnih slojeva folikularnog omotača (*zona radiata*, *zona granulosa* i sloja teka ćelija). Svaka od razvojnih faza karakteriše se određenim morfofiziološkim stanjem oocita:

- ❖ **Faza primarnog rasta** - ova faza podrazumijeva primarni rast oocita koji je praćen jedarnim promjenama. Na osnovu morfološkog izgleda nukleusa ova faza se može podijeliti na dvije podfaze: hromatin nukleusnu i perinukleusnu (McMillan, 2007).
- ❖ **Faza kortikalnih alveola** – u ovoj fazi dolazi do značajnog povećavanja dimenzija oocite. Kortikalni alveoli predstavljaju vezikule ispunjene glikoproteinima nastalim u oocitama (Selman & Wallace, 1989). Sadržaj ovih granula se oslobađa u perivitelinskom prostoru za vrijeme fertilizacije u toku kortikalne reakcije (McMillan, 2007). Inicijalno se pojavljuju na periferiji ooplazme. Sa napredovanjem faze povećava im se broj i veličina, da bi na kraju ove faze citoplazma oocite bila u potpunosti ispunjena ovim vezikulama. Na preparatima bojenim H&E bojenjem uočavaju se kao prazne loptice budući da sadržaj kojim su ispunjene nema afinitet ka hemikalijama koje se koriste u ovoj vrsti bojenja (Honj *et al.*, 2006). Događaj koji karakteriše ovu fazu je i početak formiranja acelularnog sloja između membrane oocite i granulosa sloja folikularnog omotača. Za opis ovog sloja koriste se

brojni nazivi: vitelinski omotač, horion, *zona pelucida* ili *zona radiata* (Oppen-Berntsen *et al.*, 1990).

- ❖ **Faza vitelogeneze** – najočigledniji događaj koji označava početak ove faze jeste pojava žumančanih granula koje se javljaju između kortikalnih alveola na periferiji ooplazme. Kod većine košljoriba dolazi do akumulacije žumančanih proteina unutar ovih žumančanih granula koje u toku rasta oocite mogu zadržati svoj integritet ili podleći međusobnoj fuziji i tako stvoriti jedinstvenu žumančanu masu (McMillan, 2007). U toku ove faze dolazi do značajnog povećavanja dimenzija oocita i samim tim i težina gonada značajno raste.
- ❖ **Faza zrelosti** – predstavlja finalnu fazu u sazrijevanju oocita. Ova faza započinje polarizacijom oocite, a završava se ovulacijom. Događaji koji je karakterišu su: migracija nukleusa na animalni pol i dezintegracije nukleusne membrane. Paralelno sa nuklearnim promjenama dešavaju se i promjene u folikularnom omotaču i apsorpcija vode u folikulu. Procesom hidratacije oocite dostižu svoje maksimalne dimenzije. Hidratisane oocite predstavljaju najefemerniju od svih klasa oocita, budući da se u ovom stadijumu nalaze manje od jednog dana najčešće 12 h prije mrijesta (Hunter & Macewicz, 1985)

Na osnovu modela sazrijevanja oocita kod košljoriba se razlikuju tri tipa organizacije ovarijuma (Wallace & Selman, 1981):

**1. Sinhroni** – sve oocite se istovremeno razvijaju i ovuliraju. Ovaj tip organizacije ovarijuma se susrijeće kod riba koje se jednom u toku svog života mrijeste i zatim umiru, kao što su anadromne salmonidne vrste, *Oncorhynchus* sp., *Anguilla* sp, itd.

**2. Grupno sinhroni** – u svim fazama ciklusa u ovarijumu se mogu razlikovati dvije populacije oocita i to: populacija istovjetnih krupnijih (koje su obično nalaze u grupi) koje će se mrijestiti u tekućoj godini i heterogena populacija manjih oocita koje će se mrijestiti naredne sezone. Ovaj tip ovarijuma se susrijeće kod vrsta koje se mrijeste odmah nakon završetka ovarijalnog ciklusa i to jednom u toku godine. Ovo je i najčešći tip organizacije ovarijuma među košljoribama.

**3. Asinhroni** - u svim fazama ciklusa ovarijumi sadrže oocite svih razvojnih stadijuma razvoja bez prisustva dominantne populacije. Ovaj tip organizacije ovarijuma javlja se kod vrsta sa dugim mrijesnim periodom, budući da im nagomilavanje žumančanih materija i razvoj oocita zavisi od količine dostupne hrane u tom trenutku (Hunter & Leong, 1981). Vrste koje se karakterišu asihronim tipom ovarijuma mrijeste se više puta u toku mrijesne sezone kao što su: *Carassius* sp., *Scomber scomber*, *Merluccius merlucciu* (Murua & Saborido-Rey, 2003).

Na osnovu ritma kojim oocite ovuliraju tj. načinu odlaganja ikre Tyler & Sumpter (1996) razlikuju se dva modela mrijesta: jednovremeni i porcioni mrijest. Prvi se odnosi na vrste kod kojih se u toku jednogodišnjeg reproduktivnog ciklusa proces ovulacije dešava odjednom i polaganje ikre predstavlja jedinstven događaj u toku kratkog vremenskog intervala, nedjelju ili dvije po Holden & Raitt (1974). Drugi model karakteriše vrste sa asinhronim ovarijumima. Kod njih oocite ovuliraju u nekoliko grupa za vrijeme prolongirane mrijesne sezone tako da se i odlažu u porcijama.

## 2. CILJ

U okviru ovog rada postavljeni su sledeći ciljevi:

- ✓ Utvrditi i opisati nivo morfološke diferencijacije simpatričkih taksona roda *Rutilus* iz Skadarskog jezera
- ✓ Utvrditi i opisati nivo ekološke diferencijacije simpatričkih taksona iz Skadarskog jezera kao i njihove ekološke osobenosti, s posebnim naglaskom na stepen reproduktivne izolovanosti kao jednom od važnijih mehanizama koji sprečavaju hibridizaciju sestrinskih vrsta u simpatriji
- ✓ Upotrebom molekularno genetičkih metoda utvrditi genetičku strukturu ispitivanih populacija, međusoban stepen genetičke diferencijacije simpatričkih taksona iz Skadarskog jezera kao i stepen srodnosti sa taksonima iz Ohridskog i Prespanskog jezera
- ✓ Utvrditi vrijeme divergencije simpatričkih skadarskih taksona i komparativnom analizom sa taksonima iz Ohridskog i Prespanskog jezera utvrditi autohtonost proučavanih vrsta u tri jezera, odnosno stepen endemizma
- ✓ Na osnovu dobijenih rezultata i uz pregled postojećih literaturnih podataka dati predlog revizije roda *Rutilus* za područje Prespa-Ohrid-Skadar sistem



### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. MATERIJAL

Uzorci vrsta iz roda *Rutilus* analizirani u ovom radu sakupljani su u periodu od juna 2007. godine do februara 2010. godine. Uzorkovanje materijala vršeno je na Skadarskom, Prespanskom i Ohridskom jezeru (**Slike 8, 9 i 10**). Jedinke sa Ohridskog i Prespanskog jezera korištene su kao komparativan materijal za morfološku i genetičku analizu. Obim ispitivanih uzoraka po lokalitetu i vrsti analize data je u **Tabeli 4**. Zbog nejasne nomenklature ispitivanih vrsta do izvođenja zaključaka rada korištena su imena populacija shodno lokalitetu sa koga i potiču uzorci - Prespa, Ohrid i Skadar. Polazeći od činjenice da lokalitet Skadarskog jezera naseljavaju dvije vrste kao i njihove očigledne razlike u obojenosti (zlatno-žuta i bijela), uzorci sa ovog lokaliteta su i podijeljeni na osnovu izgleda njihovog fenotipa (žuti i bijeli) i kroz rad su za njih korišteni nazivi Skadar\_žuti i Skadar\_bijeli.

**Tabela 4.** Pregled broja analiziranih uzoraka po lokalitetu i vrsti analize. Broj jedinki koji je naveden za ekološku analizu odnosi se na jedinke koje su upotrijebljene za eksperimentalni dio istraživanja, dok je za analizu brojnosti i distribucije pregledano više stotina jedinki populacija iz Skadarskog jezera.

Vrste  Analiza	Morfološka analiza	Ekološka analiza	Genetička analiza		
			cyt <i>b</i>	fragmenti nDNK	mikrosateliti
Skadar_žuti	30	100	16	21	38
Skadar_bijeli	30	50	13	19	32
Ohrid	20	-	7	20	44
Prespa	20	-	12	18	42
<b>Σ</b>	100	150	48	78	156

Za potrebe ovog rada uzorkovanje materijala na Skadarskom jezeru vršeno je na različitim lokalitetima (Virpazar, Bobija, Raduš, Karučki zaliv, Plavnica, Orahtovštica, Zeta, Morača, Rijeka Crnojevića, Virštica) uz upotrebu mreža stajaćica promjera 14-20 mm, gribom-plivaricom, vršama i elektro-agregatom u zavisnosti od lokaliteta sakupljanja materijala. Manji broj analiziranih jedinki sakupljen je udičarskim alatom koji se koristi u rekreativnom ribolovu. Materijal sakupljen na Prespanskom i Ohridskom jezeru lovljen je stajaćim mrežama promjera 14-20 mm.





**Slika 8.** Skadarsko jezero (Foto: Mihailo Jovičević)



**Slika 9.** Prespansko jezero (Foto: Trajče Talevski)



**Slika 10.** Ohridsko jezero (Foto: Trajče Talevski)



### **3.1.1 MATERIJAL ZA MORFOLOŠKU ANALIZU**

Za morfološku analizu upotrijebljene su jedinke fiksirane u 4% formaldehid-u. Obrada materijala urađena je u laboratorijama Studijskog programa za biologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Podgorica.

### **3.1.2. MATERIJAL ZA GENETIČKU ANALIZU**

Nakon izlova, jedinkama je odrezan dio pektoralnog peraja i fiksiran u 96% alkoholu. Uzorci su adekvatno etiketirani i čuvani u posebnim tubicama. Djelići uzorkovanih peraja dalje su korišteni za molekularne analize. Iste jedinke su iskorištene i za morfološku analizu, a jedinske sa Skadarskog jezera i za ekološku analizu.

### **3.1.3. MATERIJAL ZA EKOLOŠKU ANALIZU**

Ekološkoj analizi podvrgnute su jedinke simpatričkih taksona iz Skadarskog jezera. Za ispitivanje dužinskog i težinskog rasta upotrijebljene su jedinke fiksirane u 4% formaldehid-u. U cilju analize ishrane upotrijebljene su svježe jedinke kojima je odmah nakon izlova vršena disekcija trbušne duplje. Izvađeni crijevni sistemi fiksirani su u 4% formaldehid-u. Fiksirani sadržaj dalje je podvrgnut kvalitativnoj analizi. Obrada materijala urađena je u laboratorijama Studijskog programa za biologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Podgorica.

Jedinke korišćene u cilju analize reproduktivnog ciklusa sakupljane su od novembra do maja mjeseca 2008-2009.godine, što odgovara periodu sazrijevanja gonada i mriješta ispitivanih vrsta. Nakon izlova jedinkama je urađena disekcija trbušne duplje i izvađene gonade su dalje podvrgnute utvrđivanju pola i makroskopskoj procjeni stepena zrelosti. Ispitivane gonade su fiksirane u 4% formaldehid-u i Bujanovom (eng. Bouin) rastvoru. Za pravljenje histoloških preparata korišten je isječak središnjeg dijela gonada. Ovaj dio eksperimenta urađen je u laboratoriji za patologiju Specijalističke veterinarske ustanove u Podgorici.

## **3.2. METODE ANALIZE MATERIJALA**

### **3.2.1. MORFOLOŠKA ANALIZA**

#### **3.2.1.1. LABORATORIJSKE METODE**

Za proučavanje morfoloških odlika ispitivanih populacija upotrijebljen je set podataka uzetih za 22 morfometrijska (kontinuirana) i 6 merističkih (diskontinuiranih) karaktera (**Tabela 5**). Morfometrijska mjerenja su obavljena pomičnim kljunastim mjerilom "nonijus" sa preciznošću 0,02 mm. Prikupljeni podaci su uzimani sa lijeve strane ribe kad god je to bilo moguće. Sva mjerenja urađena su po šemi Kottelat & Freyhof (2007) izuzev 2 karaktera (dužina gornje vilice-lmx i dužina donje vilice-lmd) koji nisu navedeni u ovoj šemi i izmjereni su po principu datom od strane Holčík-a (1989). S obzirom da posljednje dvije žbice u dorzalnom i analnom peraju imaju zajedničku osnovu računata su kao jedna. Branhiospine su brojane u spoljašnjem i unutrašnjem nizu prvog lijevog škržnog luka. Brojanje branhiospina vršeno je upotrebom stereo mikroskopa Zeiss Stemi 2000-C. Broj krljušti u nizu bočne linije računat je od prve do posljednje krljušti koja se nalazi na kraju repnog stabla.

#### **3.2.1.2. OBRADA PODATAKA**

SPSS program verzija 16.0 korišten je za statističku obradu numeričkih podataka. Za sve ispitivane karaktere urađena je deskriptivna analiza sa rasponom minimalna-maksimalna vrijednost, aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom kao mjerama unutar i interpopulacionih variranja karaktera među četiri *a priori* definisane populacije.

U cilju utvrđivanja statistički značajnih razlika među ispitivanim populacijama za svaki karakter urađen je neparametarski Kraskal-Volisov (*eng.* Kruskal-Wallis) test. Karakteri koji su se pokazali kao statistički značajni između četiri populacije dalje su u parovima testirani uz korišćenje T-testa i Man-Vitnijev U (*eng.* Mann-Whitney U) testa. Multivarijantna analiza i to analiza glavnih komponenti (*Principal component analysis*) urađena je u PAST programu (Hammer *et al.*, 2001) i SPSS programu. Multivarijantna analiza urađena je korišćenjem dva pristupa i to: PCA je najprije primijenjena na kombinovanom setu merističkih i originalnih morfometrijskih podataka, a zatim i na setu podataka podvrgnutih postupku transformacije u odnosu na totalnu dužinu tijela (TI). Budući da je za čitav set podataka utvrđena značajna korelacija između veličine i morfometrijskih karaktera, a u cilju eliminacije variranja koja su rezultat alometrijskog rasta urađena je transformacija apsolutnih mjera svih morfometrijskih karaktera u odnosu na totalnu dužinu tijela. Transformisani podaci su upotrijebljeni za univarijantne testove. Nakon utvrđene značajne strukturiranosti simpatričkih taksona iz



Skadarskog jezera oni su u paru podvrgnuti detaljnijoj analizi. Setovi merističkih i originalnih morfometrijskih karaktera su zasebno podvrgnuti multivarijantnoj analizi glavnih komponenti.

**Tabela 5.** Ispitivani morfometrijski i meristički karakteri. Skraćenice su date po Holčik (1989)

Skraćenica karaktera	Morfometrijski karakteri	Meristički karakteri
D		Broj žbica u leđnom peraju
P		Broj žbica u pektoralnom peraju
V		Broj žbica u ventralnom peraju
A		Broj žbica u analnom peraju
I.I		Broj krljušti u bočnoj liniji
gl I/O		Broj branhiospina unutrašnjeg/spoljašnjeg niza
TI	Totalna dužina tijela	
SI	Standardna dužina tijela	
H	Najveća visina tijela	
h	Najmanja visina tijela	
hc	Visina glave	
lc	Dužina glave	
Oh	Horizontalni dijametar oka	
iO	Međuočno rastojanje	
prO	Predočni prostor	
poO	Zaočni prostor	
pD	Predorzalno rastojanje	
poD	Postdorzalno rastojanje	
pV	Preventralno rastojanje	
Lpc	Dužina repnog stabla	
ID	Dužina leđnog peraja	
hD	Visina leđnog peraja	
IA	Dužina analnog peraja	
hA	Visina analnog peraja	
IP	Dužina pektoralnog peraja	
IV	Dužina ventralnog peraja	
Lmx	Dužina maksile	
Lmd	Dužina mandibule	

### **3.2.2. GENETIČKA ANALIZA**

Ovaj segment istraživanja odrađen je na Institutu za Zoologiju, Karl-Franzens Univerziteta u Gracu.

#### **3.2.2.1. IZOLACIJA DNK**

DNK je izolovana iz tkiva peraja metodom Amonijum-acetatne ekstrakcije.

##### Amonijum-acetatna ekstrakcija

Dio peraja (oko 2 mm<sup>2</sup>) je nakon sušenja pomoću papirnog ubrusa stavljan u tubice (Eppendorf) od 1.5 ml. Nakon toga dodato im je 480 µl ekstrakcionog pufera, 120 µl 10% SDS-a i 5 µl proteinaze-K. Sadržaj posudica je zatim vorteksiran i posudice su stavljane na inkubiranje preko noći na 37°C.

Nakon završene inkubacije sadržaj je vorteksiran sve dok je i jedan komadić tkiva bio uočljiv, a zatim su tubice stavljane u zamrzivač 30-40 minuta. U posudice je zatim dodato 350 ml 5M Amonijum acetata. Sadržaj je promiješan i centrifugiran 15 min na 132 00 rpm.

Poslije završenog centrifugiranja, u posudicama je uočena gornja (supernatant) i donja (talog) frakcija. Gornja frakcija u kojoj je rastopljena DNK odpipetirana je u nove posudice, vodeći računa da ne dođe do uzimanja dijela taloga donje frakcije u kome se nalaze proteini.

U sledećem koraku dodato je 600 µl hladnog izopropanola i nakon ručnog miješanja tubice su stavljane u zamrzivač 2h. Potom je vršeno centrifugiranje 30 min na 132 00 rpm. Centrifugiranje je rezultiralo dobijanjem dvije frakcije i to: supernatanta i taloga.

Sledeći korak je podrazumijevao ispiranje taloga etanolskom precipitacijom. Nakon završenog ispiranja dobijeni talog DNK je osušen u koncentratoru na 60°C. DNK je potom rastvorena u 30µl TE pufera i čuvana u frižideru na + 4°C do upotrebe.

#### **3.2.2.2. PROVJERA USPJEŠNOSTI IZOLACIJE DNK**

Uspješnost izolacije DNK, kao i određivanje dužine PCR produkata, može se provjeriti elektroforezom na agaroznom gelu, zahvaljujući sposobnosti molekula DNK da se mogu kretati u električnom polju. Brzina njihovog kretanja zavisi od same veličine fragmenata DNK, gustine medijuma i jačine struje.

Provjera izolacije DNK vrši se na 1-2% agaroznom gelu u zavisnosti od veličine fragmenata koji se žele razdvojiti. Agarozni gel se priprema od agaroze i 0,5% TE pufera. Smješa agaroze i pufera se zagrijava do tačke ključanja. Ovako pripremljena i ohlađena smješa koristi se za dalji rad. Neposredno prije upotrebe u rastvor agaroze dodaje se Sajber

green boja (SYBR Green) koja omogućava vizualizaciju željenih produkata. Nakon toga, gel se nanosi u modele za elektroforezu i ostavlja da se stegne oko 30 min. Poslije stezanja gela, modeli se prenose u kadice za elektroforezu u kojima se nalazi 0,5% TE pufer. Prije nanošenja na gel, uzorku DNK se dodaje koncentrovani 6x ili razblaženi 1x pufer za elektroforezu (eng. gel loading dye blue 6x). Smješa DNK i pufera se odpipetira u rupice na gelu. Da bi se odredila veličina fragmenata DNK uz uzorke se na gel nanosi i marker od 100 bp (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder). Elektroforeza se izvodi pri stalnom naponu struje od 95-100 V u trajanju od 35-45 min. Nakon završene elektroforeze vrši se vizualizacija fragmenata pomoću UV-transluminatora i njihovo fotografisanje.

Provjera izolacije DNK izvršena je na 1% agaroznom gelu pri naponu struje od 95 V u trajanju od 35 min. Nakon utvrđivanja uspješnosti izolacije DNK pripremljene su radne koncentracije i to razblaživanjem osnovne 10 puta dodavanjem destilovane sterilne vode. Dobijena razblaženja (~10-50 ng/μl) dalje su upotrijebljena kao radni rastvori za izvođenje PCR reakcija.

### **3.2.2.3. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE (PCR)**

PCR reakcija (eng. *Polymerase Chain Reaction*) predstavlja metodu amplifikacije nukleinskih kiselina u *in vitro* uslovima pomoću DNK polimeraze. Otkrio je i automatizovao Kary Mullis 1985. godine (Saiki *et al.*, 1988). Uz pomoć ove metode željeni fragment DNK se može umnožiti u velikom broju kopija.

Lančana reakcija polimeraze izvodi se u većem broju ciklusa (najčešće 30-35). Od ishodišnog molekula DNK (željenog fragmenta DNK) geometrijskom progresijom nastaje onoliki broj molekula koliko se odredi ciklusa sinteze. Svaki ciklus reakcije ima tri koraka koji se odvijaju na različitim temperaturama. Prvi korak koji se naziva denaturacija odvija se na visokoj temperaturi. U njemu dolazi do denaturacije tj. razdvajanja lanaca dvolančane ispitivane DNK. Snižavanjem temperature u drugom koraku, početni oligonukleotidi se vezuju za komplementarna mjesta na jednolančanom molekulu ispitivane DNK. Ovaj korak naziva se hibridizacija (eng. *annealing*). Uz prisustvo enzima polimeraze u trećem koraku se sintetiše komplementarni lanac DNK između početnih oligonukleotida. Taj proces naziva se polimerizacija, elongacija ili ekstenzija.

U ovom radu metod je upotrijebljen za amplifikaciju mitohondrijalnog citohroma *b* (cyt *b*), fragmenata nuklearne DNK (nDNK), kao i u pojedinim koracima protokola kloniranja mikrosatelitnih lokusa.

Koristeći prajmere i uslove PCR reakcije iz Ketmaier *et al.* 2004 (po preporuci Ketmaier *et al.*, 2008) za umnožavanje mtDNK cyt *b* dobijeni su kratki fragmenti koji su determinisani kao djelovi nuklearnog genoma i nazvani su fragmenti nDNK. Na osnovu njihove sekvence *de novo*

je kreiran par oligonukleotidnih početaka *cyt b*: reverzni 5'GGTTGTTTGACCCCGTTC3' i forwardni: 5'TCTTCGCATTCCACTTCCTTC3'.

Sastav reakcijske smješe za *cyt b* i fragmente nDNK prikazan je u **Tabeli 6**. Pripremljene reakcijske smješe stavljene su u PCR mašinu (Applied Biosystems, Gene Amp PCR System 9700). Vremenensko temperaturni program PCR reakcije za *cyt b* prikazan je u **Tabeli 7**. Za amlifikaciju fragmenata nDNK upotrijebljen je modifikovani PCR, tačnije touch-down PCR. Temperaturno vremenski program izvedenog touch-down PCR-a prikazan u **Tabeli 8**.

**Tabela 6.** Sastav reakcijske smješe zapremine od 25 µl mtDNK *cyt b* i fragmenata nDNK

Σ 25 µl	mt DNK <i>cyt b</i>	fragmenti nDNK
2 µl	Ispitivana DNK (radni rastvor)	Ispitivana DNK (radni rastvor)
2,5 µl	10 x PCR pufera	10 x PCR pufera
0,5 µl	2 mM smješe dNPT (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	2 mM smješe dNPT (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
1,5 µl	25 mM MgCl <sub>2</sub>	25 mM MgCl <sub>2</sub>
0,5 µl	10 pmol/ µl početnog oligonukleotida L15267	10 pmol/ µl početnog oligonukleotida L15267
0,5 µl	10 pmol/ µl početnog oligonukleotida 5'GGTTGTTTGACCCCGTTC3'	10 pmol/ µl početnog oligonukleotida H16526
0,1 µl	<i>Taq</i> DNA polimeraza 5U/ µl (PeqLab)	<i>Taq</i> DNA polimeraza 5U/ µl (PeqLab)
17,4 µl	destilovane sterilne vode	destilovane sterilne vode

**Tabela 7.** Vremensko temperaturni program PCR reakcije za mt DNK *cyt b*

	Temperatura/ °C	Vrijeme	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95	5 min	1
Denaturacija	95	1 min	
Hibridizacija	55	45 sek	35
Elongacija	72	1 min	
Konačna elongacija	72	10 min	1
Hlađenje	8	∞	



**Tabela 8.** Vremensko temperaturni program touch-down PCR reakcije fragmenata nDNK

	Temperatura/ °C	Vrijeme	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95	5 min	1
Denaturacija	95	1 min	2
Hibridizacija	48	45 sek	
Elongacija	72	1 min	
Denaturacija	95	1 min	33
Hibridizacija	55	45 sek	
Elongacija	72	1 min	
Konačna elongacija	72	10 min	1
Hlađenje	8	∞	

Nakon završenih reakcija amplifikacije vršena je provjera kvaliteta i dužine PCR produkta na 2% agaroznom gelu u 0,5x TE puferu pri naponu struje od 100 V u trajanju od 45 min. (Priprema gela i postupak elektroforeze opisan je u poglavlju 3.2.2.2).

#### 3.2.2.3.1. PREČIŠĆAVANJE PRODUKATA PCR REAKCIJE

Produkti PCR reakcije su podvrgnuti procesu prečišćavanja (uklanjanje prajmera i dNTPs) uz pomoć ExoSAP-IT reakcije. U 10 µl produkta PCR reakcije dodaje se 1 µl ExoSAP mix-a (1:2 rastvor ExoSAP-IT i 10x reakcionog pufera) i stavljaju se u PCR mašinu na vremensko temperaturni program koji se sastoji iz dva koraka i to: 45 minuta na 37°C i 15 minuta na 80°C.

#### 3.2.2.4. SEKVENCIONIRANJE

Redosled nukleotida cyt b i fragmenata nDNK utvrđivan je metodom sekvencioniranja. U tu svrhu korišćen je automatski sekvencer 213 ABI PRISM 3100 xl Perkin Elmer (sa 16 kapilara).

## 3.2.2.4.1. PRIPREMA REAKCIJE ZA AUTOMATSKI SEKVENCER

Sekvencijska reakcija volumena 8  $\mu$ l sastojala se od 3  $\mu$ l prečišćenog PCR produkta, 1,6  $\mu$ l 5x pufera za BigDue (Applied Biosystems), 0,2  $\mu$ l BigDue (Applied Biosystems), 0,125  $\mu$ l forwardnog prajmera L15267 (Ketmaier *et al.*, 2004) i za postizanje konačnog volumena dodata je sterilna destilovana voda. Na ovaj način pripremani su uzorci za cyt *b* i fragmente nDNK. Pripremljene sekvencijske reakcije stavljane su u PCR mašinu. Program sekvencijske reakcije nalazi se u **Tabeli 9**.

**Tabela 9.** Vremensko temperaturni proces sekvencijske reakcije za cyt *b* i fragmente nDNK.

	Temperatura/ °C	Vrijeme	Broj ciklusa
Početna denaturacija	94	3 min	1
Denaturacija	94	10 sek	35
Hibridizacija	50	10 sek	
Elongacija	60	4 min	
Hlađenje	8	$\infty$	

## 3.2.2.4.2. PREČIŠĆAVANJE PRODUKATA SEKVENCIJSKE REAKCIJE

☞ Priprema DNK fragmenata (cyt *b* i fragmenata nDNK) za sekvenciniranje

Produktima sekvencijske reakcije (8  $\mu$ l) koji su odpipetirani u nove posebno obilježene tubice (1,5 ml Eppendorf) dodaje se destilovana sterilna voda do finalnog volumena od 25  $\mu$ l. Postupak čišćenja izvršen je pomoću pripremljenih Sephadex G-100 (Sigma-Aldrich) kolona na sledeći način:

- Centri-Sep kolone sa filterom stavljene su u tubice za centrifugu (1,5 ml)
- Pipetirano je 500  $\mu$ l rastvora Sephadex-a u Centri-Sep kolone nakon čega su centrifugirane 4 min na 4000 rpm.
- Centri-Sep kolone su zatim prenošene u nove prethodno obilježene tubice (1,5 ml Eppendorf).

- Produkti koji se pripremaju za sekvenciniranje pažljivo se pipetiraju na sami centar sefadex kolonice i centrifugiraju 4 min na 4000 rpm.
- Prečišćeni uzorci su osušeni u koncentratoru 15 min na 60°C. Neposredno pred stavljanje u automatski sekvencer dodato im je 20 µl HPLC vode.

### 3.2.2.5. KLONIRANJE MIKROSATELITIH LOKUSA

Protokol kloniranja mikrosatelitnih lokusa urađen po Winkler & Weiss (2008), sastojao se iz sledećih koraka:

#### 1. Izolacija genomske DNK

Genomska DNK izolovana je postupkom amonijum-acetatne ekstrakcija (protokol opisan u poglavlju 3.2.2.1)

#### 2. Digestija genomske DNK restrikcionim enzimom *Sau3AI*

Nakon određivanja optimalne koncentracija enzima *Sau3AI* pripremana je reakcijska smješa za restrikciju genomske DNK. Reakciona smješa krajnjeg volumena od 200 µl sastojala se od 125 µl genomske DNK, 3,7 µl *Sau3AI* (10U/ µl), 2 µl BSA, 20 µl RNK-aze i do finalnog volumena dodata je destilovana sterilna voda. Provjera uspješnosti reakcije vršena je elektroforezom 95 min na 80V. Nakon završetka elektroforeze dobijeni željeni fragmenti veličine 500-1500 bp izrezani su iz gela i prečišćeni uz pomoć kita Wizard SV Gel i PCR-Clean Up System (Promega).

#### 3. Ligacija linkera

U ovom koraku dodati su linkeri na oba kraja fragmenata dobijenih u prethodnom koraku. Korišteni su specifični linkeri: RBgl24: 5'-AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGCA-3' i RBgl12: 5'- GATCTGCGGTGA-3'. Ligaciona smješa volumena 20 µl sastojala se od: 5 µl DNK, 10 µl mješavine linkera, 2 µl 10x ligacionog pufera, 1 µl T4-ligaze i 2 µl destilovane sterilne vode. Ligaciona smješa je inkubirana preko noći na 16°C, a zatim podvrgnuta reakciji inaktivacije ligaze na 70°C u trajanju od 15 min.

## **5. Amplifikacija fragmenata DNK**

Nakon uspješnog vezivanja linkera za DNK fragmente vršena je njihova amplifikacija s ciljem dobijanja dovoljne količine PCR produkata neophodnih za sledeći korak kloniranja. Reakcijska smješa volumena 50 µl sastojala se od: 1 µl DNK fragmenata za koji su vezani linkeri, 0,6 µl RBgl24 (100 µM), 5µl reakcionog pufera 10 x PE, 8 µl MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1,5 µl smješe dNTP, 0,2 µl Taq-Polymerase (5 U/ µl) i destilovane sterilne vode do finalnog volumena. Vremensko temperaturni program PCR reakcije sastojao se od početnog denaturacionog koraka 5 min na 95°C; 18 ciklusa sledećih koraka: 1 min na 95°C, 1 min na 68°C i 3 min na 72°C kao i koraka finalne ekstenzije 10 min na 72°C.

## **6. Hibridizacija i hvatanje mikrosatelita korišćenjem metoda magnetnih kuglica**

Ovaj korak sastojao se iz dvije hibridizacije. Za prvu hibridizaciju iskorišteno je približno 500 ng materijala iz prethodnog koraka. Hibridizacija je vršena uz pomoć 3' biotinskih proba koje sadrže 3'-ATAGAATAT rep i mikrosatelitne motive (GACA)<sub>8</sub>, (GATA)<sub>8</sub> i (TATC)<sub>8</sub>. Rađene su dvije odvojene hibridizacije sa po 150 nm biotinom obilježenim oligo probama u 6× SSC/0,1% SDS na 43°C 1h. Hibridizovani fragmenti DNK su zatim hvatani uz pomoć Streptavidinom obloženim magnetnim kuglicama (Streptavidin Magnesphere Paramagnetic Particles, 300 mg, Promega) na 68°C. Kuglice su zatim ispirane dva puta u 6× SSC/0,1% SDS-u na sobnoj temperaturi, dva puta u 3× SSC/0,1% SDS na 68 °C i dva puta na sobnoj temperaturi u 6× SSC. DNK je zatim denaturisana 5 minuta na 95°C, a potom i prečišćena.

## **6. Amplifikacija uhvaćenih DNK fragmenata**

5 µL prečišćene DNK iz prethodnog koraka upotrijebljeno je kao uzorak za sledeću PCR amplifikaciju. Reakcijska smješa sadržala je 5 µl reakcionog pufera, 8 µl MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1,5 µl smješe dNTP (10mM), 0,6 µl RBgl24 (100µM) i 0,2 µl Taq polimerase (5U/ µl) kao i destilovanu sterilnu vodu do krajnjeg volumena od 50 µl. PCR program sastojao se od početnog koraka denaturacije 5 min na 95°C i 20 ciklusa denaturacije na 95°C u trajanju od 1 min, hibridizacije na 68°C u trajanju od 1 min i elongacije na 72°C u trajanju od 2 min, kao i koraka ekstenzije na 72°C u trajanju od 10 minuta.

## **7. Druga hibridizacija**

25 µl prečišćenog PCR produkta iz prethodnog koraka upotrijebljeno je za drugu hibridizaciju. Postupak hibridizacije tekao je na isti način i pod istim uslovima kao i prva. Nakon



druge hibridizacije uhvaćeni obogaćeni fragmenti su amplifikovani na isti način kao i nakon prve hibridizacije.

## **8. Uklanjanje linkera uz pomoć enzima *Sau3AI***

U ovom koraku se uz pomoć restrikcionog enzima *Sau3AI* uklanjaju linkeri. Smješa volumena 100 µl koja se sastojala od: 25 µl prečišćenog PCR produkta iz prethodne reakcije, 15 U *Sau3AI*, 10 µl 10x restrikcionog pufera inkubirana je 1 h na 37°C, a zatim je vršena inaktivacija enzima u trajanju od 10 min. na 70°C.

## **9. Ligacija fragmenata u vektor pUC19 (MBI Fermentas)**

Korišten je defosforilisani i uz pomoć enzima *BamHI* obrađeni plazmidni vektor pUC19. Reakcija se izvodila preko noći na 16°C u PCR mašini. Ligaciona smješa sastojala se od DNK uzorka iz prethodnog koraka, vektora pUC19 (100 ng), ligacionog pufera (10x), T4-DNK ligaze (10U/ µl) i vode. Nakon završene reakcije ligacije, vršena je inaktivacija ligaze u trajanju od 15 min na 70°C. DNK je potom prečišćena etanolskom precipitacijom.

## **10. Transformacija u hemijski kompetentnim ćelijama *E. coli***

Za ovaj korak upotrijebljen je hemijski kompetentan soj *E.coli* (One Shot MAX Efficiency DH5α-T1R (Invitrogen)). Transformacija je izvedena temperaturnim šokom. Tubice sa ćelijama čuvanim na temperaturi od -70°C lagano su otapane na ledu u trajanju od 10 min. U tubice je zatim dodato po 2 µl produkta ligacije. Nakon laganog miješanja držane su na ledu 30 minuta. Poslije isteka tog vremena sproveden je temperaturni šok: tubice su inkubirane na tačno 42°C tačno 30 sekundi, a zatim prenošene na led 5 minuta. Nakon izvršenog temperaturnog šoka dodato im je 250 µl SOC i ostavljene su 60 minuta na 37°C. Dobijeni bakterijski klonovi prenešeni su na svježe pripremljene LB petrijeve šolje sa ampicilinom. Nanijeta su različita razblaženja bakterijskih klonova pri čemu je krajnji volumen svih nanosa bio 200 µl. Tako pripremljene petrijeve šolje su inkubirane preko noći na 37°C. Sledećeg dana vršena je selekcija dobijenih kolonija. Princip selekcije sastojao se u tome da su za nastavak procedure odabrane samo pozitivne kolonije (kolonije sa rekombinovanim plazmidom), dok su negativne eliminisane (kolonije sa nerekombinovanim plazmidom). Fenotipski posmatrano pozitivne kolonije su bijele, a negativne plave boje. Identifikovane pozitivne kolonije su presijane u nove LB petrijeve šolje.

## 11. PCR reakcija kolonija (Colony - PCR)

Pozitivne kolonije su rastvarane u 20  $\mu$ l sterilne vode i stavljane u PCR mašinu 5 minuta na 95°C. 2  $\mu$ l ove suspenzije je dalje upotrijebljeno za PCR reakciju. PCR smješa volumena 20  $\mu$ l osim suspenzije sadržala je i 2,5  $\mu$ l 10x reakcionog pufera, 1,4  $\mu$ l  $MgCl_2$  (25mM), 0,5  $\mu$ l smješe dNTP-a, po 0,5  $\mu$ l univerzalnih prajmera M 13-20 i M 13-26 (10 $\mu$ M) i 0,1  $\mu$ l Taq polimeraze. Vremensko temperaturni PCR program sastojao se od početnog koraka denaturacije 3 min na 94°C; 35 ciklusa: denaturacija 30 sek na 94°C, hibridizacija 30 sek na 57°C, elongaciji 30 sek na 72°C i finalne ekstenzije 5 min na 72°C. Veličina dobijenih PCR produkata provjerena je elektroforezom.

## 12. Prečišćavanje i sekvenciniranje uhvaćenih i mikrosatelitnih DNK fragmenata

Za reakciju sekvenciniranja izabrani su fragmenti veličine 400-1000 bp. PCR produkti se prečišćavaju postupkom opisanim u poglavlju 3.2.2.4.2. Nakon završene sekvencijske reakcije, uzorci su sekvencirani na automatskom sekvenceru 213 ABI PRISM 3100xl, Perkin Elmer.

### 3.2.2.6. DIZAJNIRANJE PRAJMER A

Na osnovu dobijenih nukleotidnih sekvenci kod kojih je detektovano prisustvo mikrosatelitnih motiva dizajnirani su specifični parovi početnih oligonukleotida (prajmera). Dizajniranje prajmera vršeno je u programu CPRIMERS (Bristol & Anderson, 1995).

#### 3.2.2.6.1. TESTIRANJE PRAJMER A I OPTIMIZACIJA PCR REAKCIJE

Cilj testiranja prajmera je bio da se ispita njihova funkcionalnost na ispitivanim uzorcima i odredi najoptimalnija  $T_a$  njihove aktivnosti. Kao uzorci su korišteni radni rastvori DNK jedinki iz sve četiri ispitivane populacije. *De novo* dizajniranim forwardnim prajmerima je dodata M13 (-21) univerzalna prajmer sekvenca CAGTCGGGCGTCATCA, a reverznim GTTTCTT rep na 5' kraju.

Lokusi su pojedinačno amplifikovani u smješi reakcionog volumena 10  $\mu$ l koja se sastojala od 2  $\mu$ l ispitivane DNK, 0,6  $\mu$ l  $MgCl_2$ , 0,25  $\mu$ l smješe dNTP-a, po 0,25  $\mu$ l svakog prajmera i 0,1  $\mu$ l Taq polimeraze. Vremensko temperaturni program PCR reakcije sastojao se od početnog koraka denaturacije 5 min na 95 °C i 35 ciklusa: 45 sekundi na 95°C, 10 sekundi na  $T_a$ , 30 sekundi na 72°C i krajnji korak ekstenzije 10 minuta na 72°C.

### 3.2.2.6.2. PROVJERA USPJEŠNOSTI OPTIMIZACIJE PRAJMERA

Genotipizacija amlifikovanih lokusa vršena je na automatskom sekvenceru 213 ABI PRISM 3100xl, Perkin Elmer uz korištenje standarda GeneScan-500ROX (Applied Biosystems), a analiza u softverskom program GENEMAPPER verzija 3.7 (Applied Biosystems).

### 3.2.2.7. OBRADA PODATAKA

#### 3.2.2.7.1. PROGRAMSKA ANALIZA CYT *b* I FRAGMENTA NDNK

Editovanje i alignement sekvenci *cyt b* i fragmenata nDNK urađen je u programu MEGA 4.1 (Tamura *et al.*, 2007). Upotrebom statističkog 95% "parsimony" kriterijuma u programu TCS1.13 (Clement *et al.*, 2000) konstruisana je mreža (kladogram) pronađenih haplotipova. Na osnovu nukleotidne divergencije (Da) izračunate u MEGA programu utvrđena je međusobna udaljenost ispitivanih populacija.

U cilju dobijanja informacija o evoluciji taksona iz Skadarskog jezera, urađena je analiza izračunavanja vremenski najbližeg zajedničkog pretka TMRCA (eng. Time to the most recent common ancestor) u programskom paketu BEAST v.1.5.4 (Drummond & Rambaut, 2009). Na osnovu testa odnosa hijerarhijskih vjerovatnoća (eng. hierarchical likelihood ratio test) dobijenog u MODELTEST (Posada & Crandall, 1998) korišten je HKY model supstitucija i evolucionu stopu od 0.0027 supstitucija/million godina (Ketmaier *et al.*, 2008). Izračunavanje je sprovedeno za konstantnu veličinu populacija i uz korišćenje preciznog molekularnog sata.

#### 3.2.2.7.2. STATISTIČKA ANALIZA MIKROSATELITNIH PODATAKA

Analiza seta mikrosatelitnih podataka upotrijebljena je za utvrđivanje genetičke strukture ispitivanih populacija kao i za utvrđivanje interpopulacionih odnosa i stepena diferencijacije proučavanih populacija.

Uvid u genetičku strukturu populacija dobijen je korištenjem dva pristupa i to: utvrđivanjem stepena polimorfizma i ocjenom ravnoteže genotipova unutar populacija. Genetski polimorfizam svake od izučavanih populacija određen je na osnovu broja alela po lokusu, očekivane i utvrđene heterozigotnosti. Ovi parametri su izračunati u softverskom programu GENETIX verzija 4.05 (Belkhir *et al.*, 1996-2004).

Za ocjenu ravnoteže unutar populacija korištena je *F* statistika koja ocjenjuje odstupanje od Hardy-Vajnbergovog ekvilibrijuma (eng. Hardy-Weinberg equilibrium). U tom cilju upotrijebljen je *F<sub>IS</sub>* parametar (eng. inbreeding coefficient). Softverski program FSTAT verzija 2.9.3.2

(Goudet, 2001) je upotrijebljen za izračunavanje  $F_{IS}$  vrijednosti kao i za računanje faktora bogatstva alela (*eng.* allelic richness).

Za utvrđivanje stepena interpopulacione diferencijacije korištene su vrijednosti  $F_{ST}$  i  $R_{ST}$ .  $F_{ST}$  vrijednost je izračunata u programu FSTAT dok je vrijednost  $R_{ST}$  izračunata u programskom paketu Arlequin (Schneider *et al.*, 2000). Statistička značajnost ovih parametara izračunata je permutacionim testovima na osnovu oko 10,000 permutacija.

Za utvrđivanje potencijalnog prisustva nultih (nula) alela korišten je softverski program Micro-Checker (van Oosterhout *et al.*, 2004). U programu GENEPOP 4.0.7 (Rousset, 2008) koristeći algoritam Markovog lanca urađen je test da li se mikrosateliti nasleđuju zajedno tzv. *linkage disequilibrium*. Dodatni uvid u nivo interpopulacione diferencijacije stečen je izračunavanjem broja privatnih alela uz korišćenje programa HP-RARE (Kalinowski, 2005). Računanje je izvršeno za čitav set podataka i posebno za ispitivane taksone iz Skadarskog jezera.

Generalna struktura populacija ocijenjena je pomoću programa STRUCTURE sa modelom "model-based clustering model". Implementiran je model miješanja koji podrazumijeva nezavisne frekvencije alela sa sledećim parametrima "burn in of 50 000 followed by 100 000 iterations" Za utvrđivanje broja populacija ( $K$ ) testirane su  $K$  vrijednosti od 1 do 5, za jedan broj više od pretpostavljenog broja početnih populacija. Najvjerovatnija, stvarna  $K$  vrijednost dobijena je korišćenjem stopa promjena drugog reda  $L''(K)$  po Evanno *et al.* (2005) uz korišćenje online programa Structure Harvester verzija 56.4 ([http://taylor0.biology.ucla.edu/struct\\_harvest](http://taylor0.biology.ucla.edu/struct_harvest)). Grafički prikaz diferencijacije genotipova na individualnom nivou dobijen je pomoću Faktorijalne Korespondentne Analize koja je urađena GENETIX-u.

### 3.2.3. EKOLOŠKA ANALIZA

Starost je određivana na osnovu naraštajnih zona na krljuštima uzetim neposredno ispod leđnog peraja. Krljušti su posmatrane pod binokularom pri povećanju 2-4 x. Analiza tempa dužinskog i težinskog rastenja urađena je na osnovu izmjerenih dužina i težina jedinki različitih uzrasnih klasa. U analizi su korištene vrijednosti totalne dužine tijela (T.L.) (po Krpo Četković, 2004).

Specifična stopa rasta i konstanta rasta izračunate su po formulama Schmalhausena, (1935).

Specifična stopa rasta računata je po formuli:  $C_1 = \log l_2 - \log l_1 / 0,4343(t_2 - t_1)$ ; gdje je  $l$  srednja dužina ribe po uzrastu,  $t$  uzrast ribe, a 0,4343 konvertujući modul prirodnih u dekadne logaritme. Konstanta rasta predstavlja proizvod specifične stope rasta i jedinice vremena i izarunata je po formuli:  $K_1 = C_1 ((t_2 + t_1) / 2)$ .



Regresiona analiza odnosa totalne dužine i težine tijela urađena je za taksone iz Skadarskog jezera. Model rasta određen je eksponencijalnom funkcijom:  $W = aL^b$ ; gdje je W ukupna težina tijela, L totalna dužina tijela, a konstanta (odsječak na y-osi), i b regresioni koeficijent (faktor alometrije).

Za procjenu kondicionog stanja populacija izračunat je kondicioni faktor po formuli  $K = 100W/L^3$ , gdje je W ukupna težina tijela, a L totalna dužina tijela.

Analiza brojnosti i distribucije urađena je po lokalitetu uzorkovanja. U cilju utvrđivanja diferenciranosti simpatričkih taksona iz Skadarskog jezera po habitatima koje naseljavaju lokaliteti jezera su podijeljeni u dvije grupe i to: rijeke sliva Skadarskog jezera i basen Skadarskog jezera.

### **3.2.3.1. ANALIZA REPRODUKTIVNOG CIKLUSA**

#### **3.2.3.1.1. MAKROSKOPSKA ANALIZA GONADA**

Vizuelna ocjena stepena zrelosti izvršena je na osnovu spoljašnjeg izgleda, boje, veličine i težine gonada, distribucije krvnih sudova i stepena zrelosti jajnih ćelija. Određivanje stepena polne zrelosti riba prema spoljašnjem izgledu gonada izvršeno je primjenom šestostepene skale (Mejnen, 1939):

**I stepen** – ovarijumi su končastog oblika i providni. U ovoj fazi je nemoguće golim okom odrediti pol jedinke. Gonade su pozicionirane bliže donjem dijelu ribljeg mjehura, čvrsto vezane za celomsku membranu.

**II stepen** – ovarijumi su trakastog oblika, blijedo bijele obojenosti i poluprozračni. Ikra je teško vidljiva golim okom ali je uočljiva pod lupom. Na ovom stadijumu moguće je odrediti pol.

**III stepen** – označava stadijum u kojem dolazi do znatnog povećanja dimenzija ovarijuma koji su žute boje. Jaja su uočljiva golim okom ali se ne mogu međusobno separirati.

**IV stepen** – označava stadijum neposredno prije mrijesta. Ovarijum je maksimalnih dimenzija, ispunjava 1/3 do 1/2 trbušne duplje. Ikra je zrela, dostigla je svoje maksimalne dimenzije i jaja se mogu lako međusobno odvajati.

**V stepen** – označava fazu mrijesta. Ovu fazu karakteriše mek, mlohav ovarijum i stomak jedinke. Pri lakom pritisku na trbuh ikra slobodno ističe iz analnog otvora. U ovarijumu se mogu uočiti i zrnca neizbačene ikre.

**VI stepen** – označava fazu nakon mrijesta, fazu obnove. Ovarijum je sive boje što ukazuje na proces resorpcije zrele neizbačene ikre, kao i pojavljivanje sitnih zrna ikre koja se pripremaju za sledeću sezonu mrijesta

### 3.2.3.1.2. MIKROSKOPSKA (HISTOLOŠKA) ANALIZA

Fiksirani isječci gonada su nakon dehidratacije ukalupljeni u parafin. Parafinski blokovi sječeni su serijski na presjeke debljine 5-12  $\mu\text{m}$ . Bojenje preparata je vršeno hematoksilin-eozin procedurom (H&E).

#### A) Hematoksilin-eosin bojenje

Neposredno prije bojenja preparati su deparafinirani provlačenjem kroz dvije promjene ksilola u trajanju od 20 min. Dehidratirani su u seriji etanola i to:

- apsolutni alkohol – 5min
- 96% alkohol – 5 min
- 70% alkohol – 5 min

Nakon završene dehidratacije preparatu su isprani u destilovanoj vodi i to dvije promjene u trajanju od po 5 min.

**Bojenje:** Preparati su najprije bojani 1 minut u hematoksilinu (Merk). Nakon ispiranja u tekućoj vodi i provlačenja kroz 96% alkohol preparatu su bojanani i 30 sekundi u alkoholnom rastvoru eozina. Preparati su potom provlačeni kroz seriju alkohola i to:

- jedna promjena 70%
- jedna promjena 96 % alkohola
- dvije promjene apsolutnog alkohola
- tri promjene ksilola.

Proces se vršio sve dok osnova preparata nije bila potpuno čista. Nakon završenog bojenja preparati su montirani kanada balzamom i pokrivani pokrovnim pločicama.

## B) Analiza histoloških preparata

Montirani preparati su ispitivani korištenjem binokularnog svjetlosnog mikroskopa Zeiss Axio Imager A1 na kome su napravljeni i snimci reprezentativnih preparata. U cilju analize ovarijalnog ciklusa, ispitivane oocite su na osnovu razvojnog stadijuma podijeljene na tri glavne faze (Heidari et al., 2009):

### **I Faza primarnog rasta**

- a) Stadijum primarne oocite
- b) Perinuklearni stadijum

### **II Vitelogenena faza**

- a) Stadijum kortikalnih alveola
- b) Vitelogeni stadijum

### **III Faza zrelosti**

- a) Stadijum rane zrelosti
- b) Stadijum potpune zrelosti
- b) Stadijum finalnog sazrijevanja

## 4. REZULTATI

### 4.1. MORFOLOŠKA ANALIZA

#### 4.1.1. INTERPOPULACIONA DIFERENCIJACIJA

##### 4.1.1.1. DESKRIPTIVNA STATISTIČKA ANALIZA

Ukupni rezultati deskriptivne statistike između četiri *a priori* definisane populacije (Prespa, Ohrid, Skadar\_žuti i Skadar\_bijeli) za sve mjerene varijable (karaktere) prikazani su u **Tabeli 12**. Zbog bolje preglednosti rezultata u istoj tabeli je naveden i nivo statističke značajnosti ( $P$  vrijednost) ispitivanih karaktera izračunat pomoću neparametarskog Kruskal-Wallis-ovog testa.

Od ukupno 28 ispitivanih morfoloških karaktera među četiri ispitivane populacije konstatovane su visoko statistički značajne razlike ( $P < 0,001$ ) za 20 morfoloških karaktera i to: 4 meristička i 16 morfometrijskih karaktera. Osim toga, za tri morfometrijska (predočni prostor, preventralno rastojanje i dužinu ventralnog peraja) kao i jedan meristički karakter (broj branhiospina u spoljašnjem nizu) registrovane su najmanje statistički značajne razlike ( $P < 0,05$ ).

Tri meristička karaktera (broj krljušti u bočnoj liniji, broj granatih žbica u pektoralnom i leđnom peraju) za koje je utvrđen statistički značajan nivo razlika među četiri populacije dalje su podvrgnuti testiranju u parovima uz pomoć Mann-Whitney U testa (**Tabela 10**). Test je pokazao da u najmanje dva karaktera postoji značajna razlika među svim ispitivanim parovima populacija.

Simpatričke populacije iz Skadarskog jezera podvrgnute su dodatnom testiranju pomoću T-testa i Mann-Whitney U testa radi utvrđivanja nivoa statistički značajnih razlika ispitivanih morfometrijskih karaktera (**Tabela 11**). Rezultati Mann-Whitney U testa su pokazali da ove dvije populacije pokazuju visok nivo statistički značajnih razlika ( $P < 0,001$ ) za pet karaktera i to: maksimalnu visinu tijela, preorbitalno rastojanje, dužinu repnog stabla kao i dužinu leđnog i pektoralnog peraja. Isti test je pokazao i statistički značajan nivo razlika ( $P < 0,05$ ) za tri karaktera i to najmanju visinu tijela, preventralno rastojanje i dužinu analnog peraja. Generalno posmatrano za svaki od ispitivanih karaktera populacija Skadar\_žuti se pokazala kao mnogo robusnija u odnosu na populaciju Skadar\_bijeli. T-test je pokazao statistički značajne razlike visokog nivoa ( $P < 0,001$ ) za dva karaktera i to maksimalnu dužinu tijela i dužinu leđnog peraja. Statistički značajan nivo razlika ( $P < 0,05$ ) registrovan je kod pet karaktera i to: najmanja visina tijela, dužina glave, preorbitalno rastojanje, dužina leđnog i dužina pektoralnog peraja.



**Tabela 10.** Prikazani su rezultati neparametarskog Mann-Whitney-U merističkih karaktera broj krljušti u bočnoj liniji/broj žbica u leđnom peraju/broj žbica u pectoralnom peraju. Oznake: \*- statistički značajan nivo; - nema značaja)

Populacija	Skadar_bijeli	Ohrid	Prespa	Skadar_žuti
Skadar_bijeli	-			
Ohrid	*/-/*	-		
Prespa	*/**	*/-/*	-	
Skadar_žuti	*/**	*/-/*	*/-/*	-

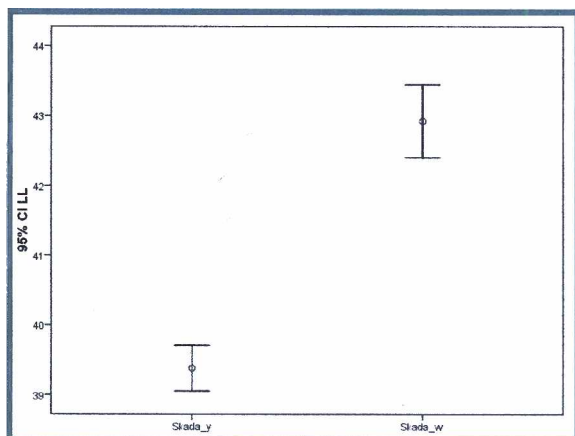
**Tabela 11.** Prikazani su rezultati T-testa i Mann-Whitney-U testa transformisanih morfometrijskih podataka populacija iz Skadarskog jezera (Skadar\_bijeli i Skadar\_žuti). *P* vrijednost označava nivo statističke značajnosti. Boldovane su vrijednosti visoko stitistički značajne (***P*<0,001**) i statistički značajne (***P*<0,05**)

Karakter	T test	<i>P</i> vrijednost	Mann-Whitney-U	<i>P</i> vrijednost
H	6.131	<b><i>P</i>&lt;0.001</b>	10.000	<b><i>P</i>&lt;0.001</b>
h	2.844	<i>P</i> =0.007 ( <b><i>P</i>&lt;0.05</b> )	288.000	<i>P</i> =0.011 ( <b><i>P</i>&lt;0.05</b> )
hc	1.471	<i>P</i> =0.149	354.000	<i>P</i> =0.112
lc	2.127	<i>P</i> =0.040( <b><i>P</i>&lt;0.05</b> )	353.000	<i>P</i> =0.109
Oh	1.262	<i>P</i> =0.214	361.000	<i>P</i> =0.137
iO	0.209	<i>P</i> =0.836	436.000	<i>P</i> =0.686
prO	-0.015	<i>P</i> =0.988	351.000	<i>P</i> =0.103
poO	2.665	<i>P</i> =0.011( <b><i>P</i>&lt;0.05</b> )	184.000	<b><i>P</i>&lt;0.001</b>
pD	1.048	<i>P</i> =0.301	385.000	<i>P</i> =0.254
poD	0.054	<i>P</i> =0.957	363.000	<i>P</i> =0.145
pV	-0.264	<i>P</i> =0.793	293.000	<i>P</i> =0.014 ( <b><i>P</i>&lt;0.05</b> )
lpc	-1.682	<i>P</i> =0.100	181.000	<b><i>P</i>&lt;0.001</b>
ID	4.831	<b><i>P</i>&lt;0.001</b>	55.000	<b><i>P</i>&lt;0.001</b>
hD	-0.581	<i>P</i> =0.564	286.000	<i>P</i> =0,010
IA	-1.904	<i>P</i> =0.064	263.000	<i>P</i> =0.004 ( <b><i>P</i>&lt;0.05</b> )
hA	0.954	<i>P</i> =0.346	351.000	<i>P</i> =0.103
IP	-2.270	<i>P</i> =0.029( <b><i>P</i>&lt;0.05</b> )	103.000	<b><i>P</i>&lt;0.001</b>
IV	2.698	<i>P</i> =0.010( <b><i>P</i>&lt;0.05</b> )	358.000	<i>P</i> =0.126
Imx	1.789	<i>P</i> =0.081	412.000	<i>P</i> =0.453
Imd	-0.426	<i>P</i> =0.671	424.000	<i>P</i> =0.563

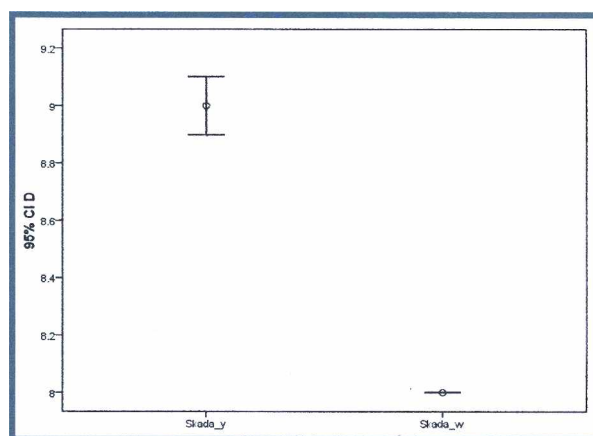
**Tabela 12.** Deskriptivna statistika ispitivanih morfoloških ( $N = 22$ ) i merističkih ( $N = 6$ ) karaktera. Prikazana je aritmetička sredina (Sr.vr.), standardna devijacija (st.dev) kao i minimalne i maksimalne vrijednosti karaktera za netransformisane podatke, dok su transformisani podaci iskorišćeni u cilju testiranja statističke značajnosti karaktera. Prikazane  $P$ - vrijednosti izračunate su neparametarskim Kruskal Wallis-ovim testom. Skraćenice karaktera su date u Tabeli 5.

Karakter	Prespansko jezero			Ohridsko jezero			Skadar_žuti			Skadar_bijeli		
	Sr. vr. (st.dev.)	Min-max		Sr. vr. (st.dev.)	Min-max		Sr.vr (st.dev.)	Min-max		Sr. vr. (st.dev.)	Min-max	P
<i>TI</i>	169.9 (10.6)	157.9-195.3		139.1 (23.1)	100.6-167.34		141.2 (5.9)	130.5-154.1		135.5 (24.4)	112.9-203.7	$P<0.001$
<i>SI</i>	140.8 (7.3)	130.5-161.82		116.3 (20.5)	82.2-137.53		119.8 (5.8)	110.5-129.7		111.2 (20.3)	91.3-169.2	$P<0.001$
<i>H</i>	42.9 (2.9)	38.1-48.1		32.5 (6.7)	22.1-41.6		32.4 (1.8)	29.9-37.8		27.8 (5.8)	22.0-45.0	$P<0.001$
<i>h</i>	14.7 (1.2)	13.2-16.8		11.9 (2.2)	8.1-14.9		12.2 (0.7)	10.7-13.7		11.3 (2.3)	9.3-19.0	$P=0.082$
<i>hc</i>	26.2 (1.7)	22.2-29.6		23.7 (3.9)	16.3-29.2		22.3 (1.3)	20.2-24.5		21.1 (3.9)	17.1-32.1	$P<0.001$
<i>Ic</i>	32.2 (1.8)	29.0-36.0		29.9 (4.4)	23.0-36.0		28.3 (1.5)	26.0-32.0		26.8 (4.5)	22.0-40.0	$P<0.001$
<i>Oh</i>	7.5 (0.6)	6.3-8.8		7.4 (0.7)	6.0-8.9		7.2 (0.6)	6.3-7.9		7.1 (0.6)	6.3-9.3	$P<0.001$
<i>io</i>	11.5 (0.8)	10.0-13.9		10.7 (1.8)	7.5-12.6		10.5 (0.6)	9.4-11.9		10.3 (2.3)	7.6-16.9	$P<0.001$
<i>pro</i>	9.2 (1.1)	7.2-10.9		8.4 (1.3)	6.0-11.2		8.1 (0.8)	6.5-10.0		8.1 (1.7)	6.0-13.1	$P=0.041$
<i>po</i>	16.2 (1.6)	14.2-19.9		13.9 (2.6)	9.2-17.9		13.1 (1.1)	9.4-14.9		11.9 (2.7)	7.9-19.4	$P<0.001$
<i>pD</i>	67.2 (3.7)	60.8-75.0		61.6 (9.1)	42.9-72.2		59.9 (2.9)	55.2-65.6		58.0 (10.1)	49.5-87.1	$P<0.001$
<i>poD</i>	52.5 (3.4)	46.8-60.0		40.8 (6.5)	30.0-48.0		43.2 (2.5)	38.6-49.1		42.2 (7.8)	34.5-64.5	$P<0.001$
<i>pV</i>	68.0 (4.1)	60.6-73.8		58.9 (9.4)	42.3-69.0		57.5 (3.2)	51.3-63.6		56.5 (10.7)	44.7-87.0	$P=0.003$
<i>lpc.</i>	26.4 (1.9)	23.5-30.8		20.5 (3.3)	14.3-25.0		22.3 (1.3)	20.1-25.1		22.8 (3.9)	18.3-33.7	$P<0.001$
<i>ID</i>	19.4 (1.7)	16.7-23.1		16.2 (2.8)	11.4-19.9		17.0 (1.2)	14.4-19.9		14.6 (3.0)	11.5-22.7	$P<0.001$
<i>hD</i>	29.8 (3.5)	24.0-39.8		22.4 (3.2)	17.3-27.8		21.7 (0.9)	20.0-23.7		21.4 (3.8)	12.7-31.7	$P<0.001$
<i>IA</i>	12.2 (1.4)	9.3-15.6		10.7 (1.7)	7.8-13.3		11.2 (0.9)	9.1-12.8		11.7 (2.6)	8.3-19.1	$P<0.001$
<i>hA</i>	20.3 (1.3)	17.6-22.7		16.4 (2.3)	12.3-20.2		16.7 (1.1)	14.5-19.0		16.4 (2.5)	13.8-23.1	$P=0.679$
<i>IP</i>	24.1 (1.5)	22.1-26.8		19.1 (4.5)	12.1-25.7		19.3 (3.6)	11.3-22.36		20.9 (4.2)	16.9-32.8	$P<0.001$
<i>IV</i>	23.3 (1.4)	21.4-26.6		19.2 (2.9)	14.4-23.9		19.0 (1.0)	17.0-21.3		17.7 (3.2)	13.6-25.5	$P=0.044$
<i>Imx</i>	8.2 (0.7)	7.13-9.78		7.8 (1.3)	5.6-9.9		7.3 (0.6)	6.3-8.9		6.7 (1.4)	4.3-11.6	$P<0.001$
<i>Imd</i>	9.9 (1.4)	8.7-11.9		8.9 (1.3)	6.4-10.4		8.4 (0.5)	7.5-9.9		7.9 (1.5)	5.1-12.2	$P=0.051$
<i>II</i>	40.30 (0.9)	39-42		38.1 (0.8)	37-40		39.4 (0.8)	37-41		42.6 (0.9)	41-44	$P<0.001$
<i>D</i>	-	9		8.3 (0.5)	8-9		9.0 (0.3)	8-10		-	8	$P<0.001$
<i>P</i>	14.5 (0.5)	14-15		14.2 (0.6)	13-15		14.0 (0.7)	14-18		15.71 (0.5)	15-16	$P<0.001$
<i>A</i>	-	8		-	8		8.1 (0.2)	8		8.04 (0.2)	8-9	-
<i>gII</i>	9.8 (0.4)	9-10		9.6 (0.5)	9-10		10.0 (0.5)	9-11		9.5 (0.7)	9-11	$P=0.001$
<i>gIO</i>	14.5 (0.6)	13-15		15.1 (0.6)	14-16		14.7 (0.9)	14-18		14.6 (0.6)	13-16	$P=0.031$

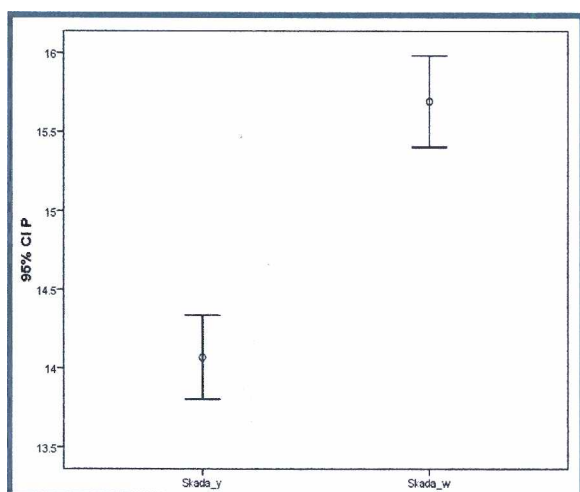
Za merističke karaktere broj krljušti u bočnoj liniji, broj žbica u leđnom i pektoralnom peraju nisu registrovana preklapanja vrijednosti što govori da pokazuju važno dijagnostičko svojstvo između simpatričkih skadarskih populacija (Slika 11, 12 i 13). Nisu konstatovana ni preklapanja vrijednosti za morfometrijski karakter IA (dužina analnog peraja) tako da se i po ovom karakteru populacije Skadar\_žuti i Skadar\_bijeli jasno odvajaju (Slika 14).



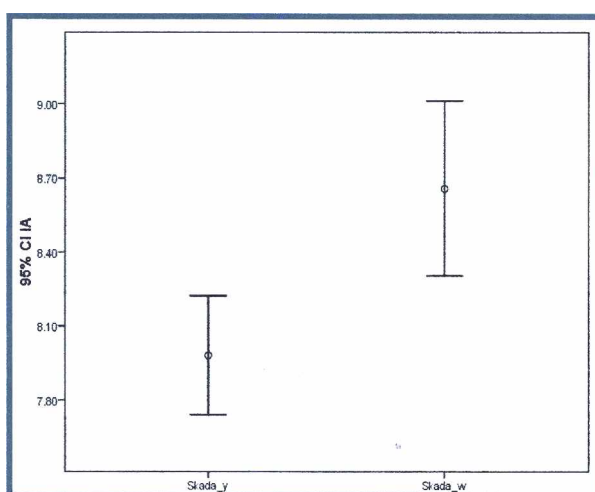
**Slika 11.** Box&Whisker dijagram broja krljušti u bočnoj liniji za populacije Skadar\_bijeli (na slici Skada\_w) i Skadar\_žuti (na slici Skada\_y)



**Slika 12.** Box&Whisker dijagram broja žbica u leđnom peraju za populacije Skadar\_bijeli (na slici Skada\_w) i Skadar\_žuti (na slici Skada\_y)



**Slika 14.** Box&Whisker dužine analnog peraja za populacije Skadar\_bijeli (na slici Skada\_w) i Skadar\_žuti (na slici Skada\_y)



**Slika 13.** Box&Whisker dijagram broja žbica u pektoralnom peraju za populacije Skadar\_bijeli (na slici Skada\_w) i Skadar\_žuti (na slici Skada\_y)

#### 4.1.1.2. MULTIVARIJANTNA STATISTIČKA ANALIZA GLAVNIH KOMPONENTI (PCA)

Kombinovani set originalnih podataka za 22 morfometrijska i 5 merističkih karaktera jedinki sve četiri ispitivane populacije (Ohrid, Prespa, Skadar\_žuti i Skadar\_bijeli) podvrgnut je analizi glavnih komponenti na kovariacionoj matrici karaktera (27 x 27). Ordinacijom kovariacione matrice na osnovu dobijenih eigen vrijednosti, utvrđeno je da prvi eigenvektor, PCI opisuje 79,76% ukupne varijabilnosti sadržane u vrijednostima izmjerenih karaktera. Drugi eigenvektor PCII opisuje 5,78%, a PCIII 3,77% ukupne vrijednosti izmjerenih karaktera (Tabela 13). Iz Tabele 15 se uočava da svi morfometrijski karakteri imaju izuzetno visok udio u definisanju prvog eigenvektora PC, što se objašnjava velikom varijabilnošću uzoraka u pogledu veličine budući da prvi eigenvektor u PCA ima ulogu u određivanju morfološke komponente veličine (eng. *general size*), dok ostali eigenvektori svojom strukturom predstavljaju zapravo morfološku komponentu oblika. U definisanju drugog eigenvektora najveći značaj imaju meristički karakteri i to I.I (broj krljušti u bočnoj liniji) i P (broj žbica u pektoralnom peraju). D (broj žbica u leđnom peraju) je karakter koji ima najveći doprinos definisanju trećeg eigenvektora.

**Tabela 13.** Eigen vrijednosti i % variranja za tri glavne PC komponente kombinovanog seta morfometrijskih i merističkih karaktera populacija Ohrid, Prespa, Skadar\_žuti i Skadar\_bijeli

	Eigen vrijednosti	% variranja
PCI	160.75	79.76
PCII	11.65	5.78
PCII	7.59	3.77

**Tabela 14.** Eigen vrijednosti i % variranja za tri glavne PC komponente (model kovariance) kombinovanog seta transformisanih morfometrijskih i merističkih karaktera populacija Prespa, Ohrid, Skadar\_žuti i Skadar\_bijeli

	Eigen vrijednosti	% variranja
PCI	8,24	24,98
PCII	8,09	24,51
PCII	3,73	11,32





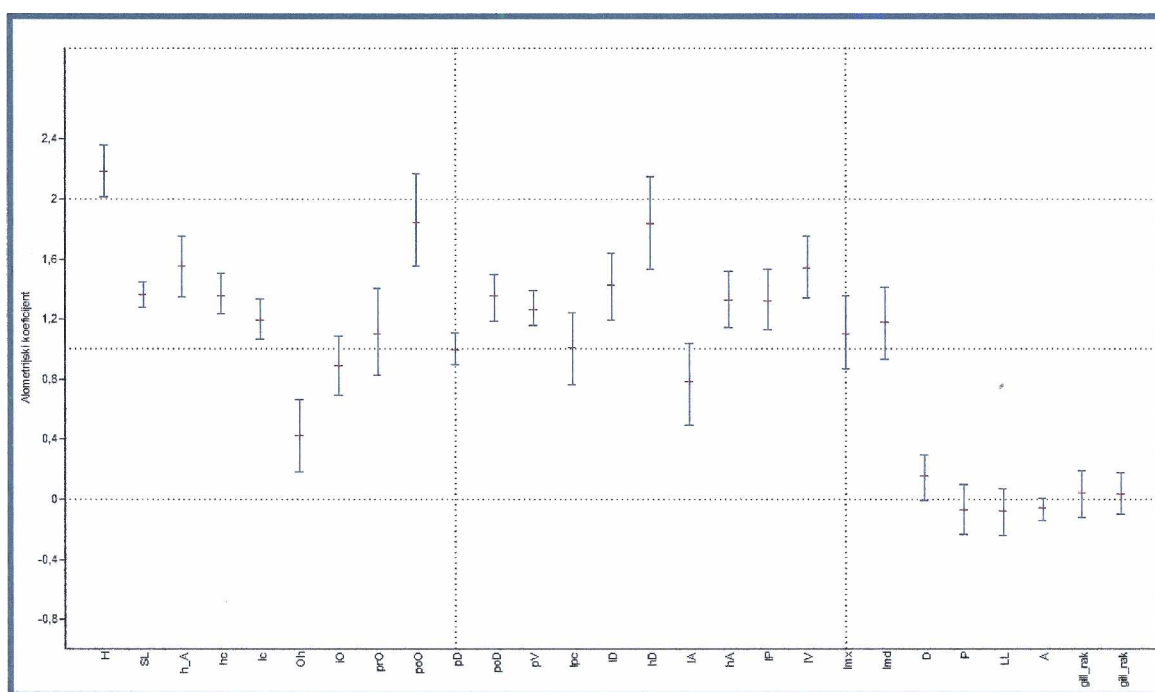
**Tabela 15.** Prve tri glavne komponente (PC) dobijene na osnovu kovariacione matrice za kombinovani set 22 morfometrijska i 5 merističkih karaktera populacija Prespa, Ohrid, Skadar\_žuti i Skadar\_bijeli.

Karakter	PCI	PCII	PCIII
H	<b>0,935</b>	-0,116	0,184
h	<b>0,895</b>	-0,003	0,139
hc	<b>0,925</b>	-0,099	-0,179
lc	<b>0,916</b>	-0,141	-0,231
Oh	<b>0,415</b>	-0,114	-0,174
iO	<b>0,765</b>	-0,018	-0,286
prO	<b>0,684</b>	-0,050	-0,331
poO	<b>0,885</b>	-0,152	-0,033
pD	<b>0,909</b>	-0,047	-0,158
poD	<b>0,889</b>	0,192	0,243
pV	<b>0,948</b>	0,074	-0,119
lpc	<b>0,713</b>	0,378	0,235
ID	<b>0,843</b>	-0,155	0,252
hD	<b>0,842</b>	0,144	0,234
IA	<b>0,581</b>	0,456	-0,043
hA	<b>0,832</b>	0,083	0,261
IP	<b>0,852</b>	0,318	0,085
IV	<b>0,911</b>	-0,053	0,193
Imx	<b>0,766</b>	-0,011	-0,218
Imd	<b>0,718</b>	-0,212	-0,354
I.I	-0,122	<b>0,893</b>	0,078
D	0,165	-0,439	<b>0,718</b>
P	-0,077	<b>0,813</b>	-0,157
A	-0,206	0,078	0,120
gl/O	0,055	-0,140	-0,444

Analiza originalnog seta podataka pokazala je izražen alometrijski efekat kroz čitav set podataka. Rezultati multivarijantne analize (alometrijski koeficijent) transformisanih podataka pokazali su slab (nizak) alometrijski efekat, sa izuzetkom karaktera H (maksimalna visina tijela), što je naročito izraženo kod krupnijih jedinki iz Prespanskog jezera (**Slika 15**). Nakon transformacije

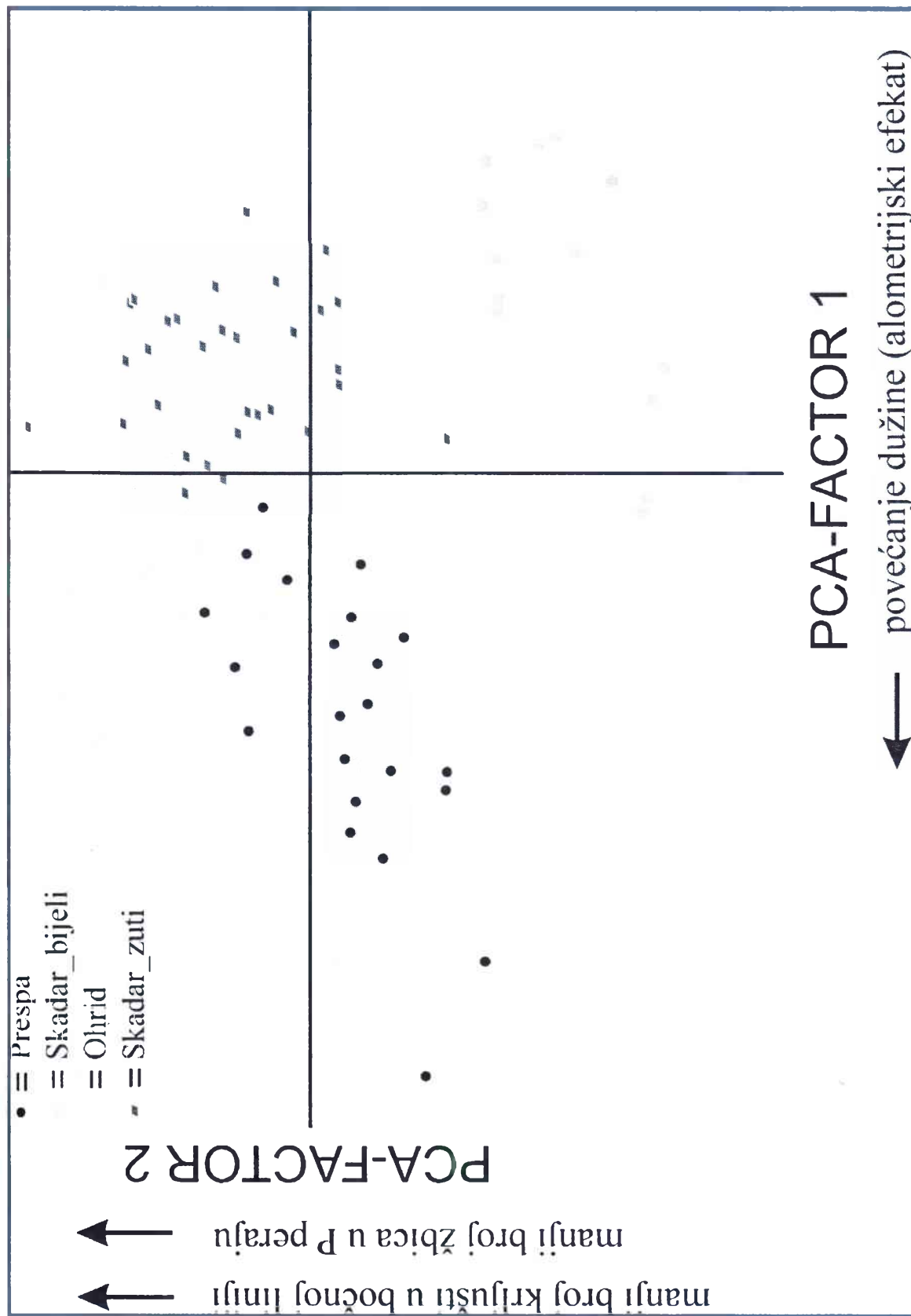
podataka PCI komponenta opisuje svega 24,98% variranja (po modelu kovarijanse) (Tabela 14) ili čak svega 20% primjenom modela korelacije.

PCA analiza transformisanih podataka i originalnog seta podataka dale su slične rezultate. Ni jedna ni druga analiza nisu pokazale značajan doprinos ni jednog morfometrijskog karaktera na glavnim PC osama, dok su obje analize pokazale da značajan doprinos u definisanju PCII imaju meristički karakteri I.I (broj krljušti u bočnoj liniji) i P (broj žbica u pektoralnom peraju).



**Slika 15.** Prikazan je dijagram vrijednosti alometrijskog koeficijenta ispitivanih morfometrijskih i merističkih karaktera

Projekcija jedinki sve četiri *a priori* definisane populacije na prve dvije PC komponente pokazala je da populacija Skadar\_bijeli formira zaseban klaster i pokazuje jasno odvajanje od ostale tri populacije po drugoj glavnoj komponenti, a najznačajniji karakteri koji imaju ulogu u njenom definisanju su I.I (broj krljušti u bočnoj liniji) i P (broj žbica u pektoralnom peraju) (Slika 16). Na osnovu ovoga se zaključuje da se Skadar\_bijeli odlikuje najvećim brojem krljušti u bočnoj liniji (I.I. 41-44) i najvećim brojem žbica u pektoralnom peraju (najčešće 16). Na slici 16 se takođe uočava da alometrijski efekat naročito dolazi do izražaja kod jedinki iz populacije Prespa.



**Slika 16.** Projekcija jedinki ispitivanih populacija na prvu i drugu glavnu komponentu (PCI-PCI) morfoloških karaktera. Oznake populacija date su u okviru slike.

## 4.1.2. DIFERENCIJACIJA TAKSONA IZ SKADARSKOG JEZERA

### 4.1.2.1. MORFOMETRIJSKI KARAKTERI

Set od 20 morfometrijskih podataka simpatričkih taksona (populacija) iz Skadarskog jezera zasebno je podvrgnut analizi glavnih komponenti. Distribuciji objekata duž prve PC-ose u najvećoj mjeri doprinosi H (max visina tijela) i IP (dužina pektoralnog peraja), a nešto manji je udio karaktera ID (dužina dorzalnog peraja). Negativno opterećenje je registrovano za maksimalnu visinu tijela i dužinu dorzalnog peraja dok je pozitivno zabilježeno kod dužine pektoralnog peraja, što ukazuje da povećanje maksimalne visine tijela prati povećavanje dužine dorzalnog peraja dok se dužina pektoralnog peraja smanjuje i obrnuto (opterećenja suprotnog predznaka na PC1 osi). Karakter pD (predorzalno rastojanje) najviše doprinosi distribuciji objekata duž druge PC-ose. Značajan je uticaj i karaktera lmd (dužina mandibude) i lmx (dužina maksile). I na kraju, distribuciji objekata duž treće PC-ose najviše doprinosi karakter Oh (horizontalni dijametar oka) (**Tabela 16**).

Na osnovu dobijenih eigenvrijednosti, utvrđeno je da prvi eigenvektor, PCI opisuje 17,6% ukupne varijabilnosti izmjerenih karaktera. Drugi eigenvektor PCII opisuje 34,3%, PCIII 45,43 itd. (**Tabela 17**). Projekcijom jedinki populacija Skadar\_bijeli i Skadar\_žuti na prve dvije glavne PC komponente dobijeno je njihovo jasno razdvajanje po prvoj komponenti, a najznačajniji karakter koji je opisuju su: H (max visina tijela) i IP (dužina pektoralnog peraja), a nešto manji je udio karaktera ID (dužina dorzalnog peraja) (**Slika 17**).

Budući da se karakter maksimalna visina tijela pokazao kao najproblematičniji karakter u odnosu na alometriju za kompletan set podataka (za sve četiri populacije), ovaj karakter je testiran u odnosu na totalnu dužinu tijela (**Slika 18**). Projekcijom ova dva karaktera je dokazano da ne postoji preklapanje među ispitivanim simpatričkim populacijama i odsustvo povezanosti sa dužinom tijela.



**Tabela 16.** Prve tri glavne komponente (PC) dobijene na osnovu kovariacione matrice morfometrijskih karaktera simpatričkih taksona iz Skadarskog jezera (Skadar\_bijeli i Skadar\_žuti).

Karakter	PCI	PCII	PCIII
H	<b>-0,803</b>	-0,040	0,349
h	-0,253	-0,098	0,611
hc	-0,118	0,376	0,462
lc	-0,470	0,683	0,251
Oh	0,059	-0,018	<b>0,662</b>
iO	0,055	0,167	-0,098
prO	-0,042	0,649	-0,305
poO	-0,550	0,050	-0,008
pD	-0,030	<b>0,721</b>	0,026
poD	0,171	-0,097	0,133
pV	0,298	0,619	0,216
lpc	0,569	0,027	0,183
ID	<b>-0,684</b>	-0,209	0,416
hD	0,571	-0,169	0,289
IA	0,550	0,267	0,271
hA	0,181	-0,135	0,414
IP	<b>0,770</b>	-0,077	0,414
IV	-0,197	-0,355	0,371
Imx	-0,165	<b>0,705</b>	0,019
Imd	0,174	<b>0,749</b>	0,107

**Tabela 17.** Vrijednosti eigenvektora, % ukupne varijabilnosti i odgovarajući kumulativni parametri glavnih komponenti morfometrijskih karaktera simpatričkih taksona iz Skadarskog jezera (Skadar\_bijeli i Skadar\_žuti)

Komponenta	Eigenvektor	%	Kumulativni %
PC I	3,515	17,574	17,574
PC II	3,337	16,686	34,260
PC III	2,234	11,172	45,431
PC IV	1,476	7,378	52,809
PC V	1,403	7,014	59,823

#### 4.1.2.2. MERISTIČKI KARAKTERI

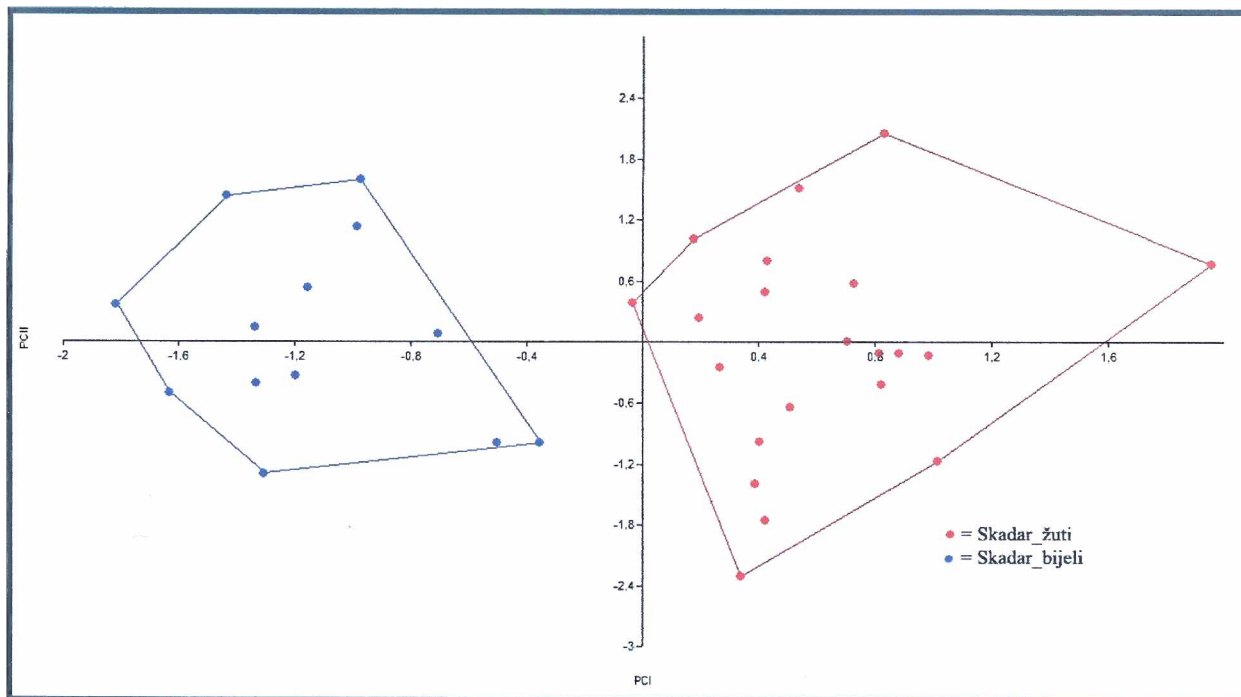
Procenat ukupne varijanse osobina koje opisuju PCI merističkih karaktera iznosi oko 54%, dok kumulativna vrijednost za prve tri komponente ose iznosi 90% (**Tabela 19**). Svi mjereni meristički karakteri izuzev broja branhiospina u spoljašnjem nizu imaju veliki doprinos u definisanju prvog eigenvektora (**Tabela 18**). Karakteri broj branhiospina u spoljašnjem i unutrašnjem nizu su se pokazali kao značajni u definisanju drugog i trećeg eigenvektora pri čemu karakter glO (broj branhiospina u spoljašnjem nizu) predstavlja karakter koji ima najveći doprinos u definisanju drugog eigenvektora, dok karakter glI (broj branhiospina unutrašnjeg niza) predstavlja karakter koji definiše treći eigenvektor.

**Tabela 18.** Opterećenja merističkih karaktera populacija iz Skadarskog jezera na sopstvene vektore glavnih komponenti (PCI-PCIII)

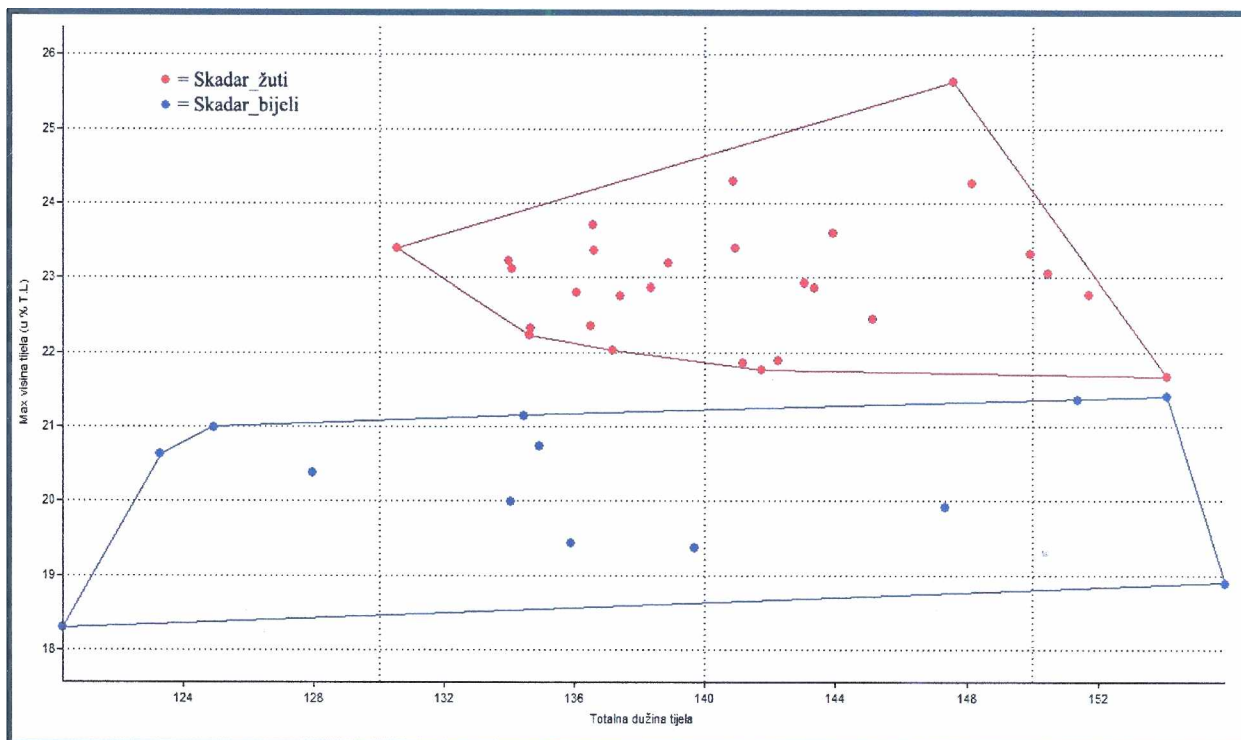
Karakter	PCI	PCII	PCIII
P	<b>0,864</b>	0,125	0,122
D	<b>-0,880</b>	-0,173	-0,138
glI	<b>-0,516</b>	0,625	<b>0,584</b>
glO	-0,140	<b>0,873</b>	-0,466
II	<b>0,935</b>	0,197	0,197

**Tabela 19.** Vrijednosti eigenvektora, % ukupne varijabilnosti i odgovarajući kumulativni parametri glavnih komponenti populacija Skadar\_bijeli i Skadar\_žuti na osnovu merističkih karaktera

Komponenta	Eigenvektor	%	Kumulativni %
PC I	2,681	53,630	53,630
PC II	1,238	24,754	78,384
PC III	0,592	11,837	90,221
PC IV	0,358	7,164	97,384
PC V	0,131	2,616	100,000



**Slika 17.** Projekcija jedinki populacija Skadar\_žuti i Skadar\_bijeli na prvu i drugu glavnu komponentu (PCI-PCII) na osnovu morfometrijskih karaktera.



**Slika 18.** Grafički prikaz odnosa vrijednosti maksimalne visine tijela i ukupne dužine tijela populacija Skadar\_žuti i Skadar\_bijeli.

## 4.2. GENETIČKA ANALIZA

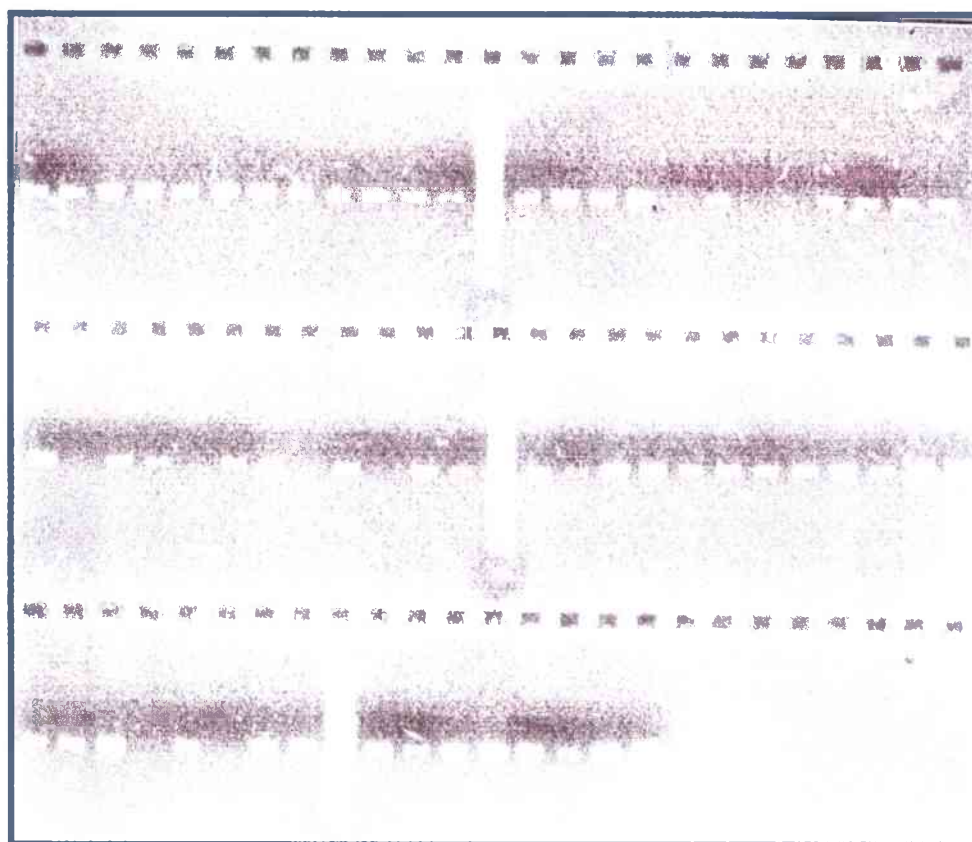
### 4.2.1. ANALIZA MITOHONDRIJALNE DNK

#### 4.2.1.1. DIZAJNIRANJE SETA NOVIH PRAJMERI ZA MTDNK CYT *b* RODA *RUTILUS*

Koristeći prajmere i uslove PCR reakcije iz Ketmaier *et al*, 2004 (po Ketmaier *et al*, 2008) za umnožavanje mtDNK cyt *b* dobijeni su kratki fragmenti dužine 243 bp koji su determinisani kao fragmenti nuklearne DNK (nDNK). Na osnovu njihove sekvence *de novo* je kreiran par oligonukleotidnih početaka (prajmera):

- reverzni: 5'GGTTGTTTGACCCCGTTC3'
- forwardni: 5'TCTTCGCATTCCACTTCCTTC3'.

Najoptimalniji rezultati za umnožavanje mtDNK cyt *b* ispitivanih uzoraka postignuti su korišćenjem *de novo* kreiranog reverznog prajmera i forvardnog prajmera iz Ketmaier *et al*. 2004 (po Ketmaier *et al.*, 2008) (**Slika 19**). Reakcijom lančane polimeraze amplifikovana je sekvenca cyt *b* dužine 560 bp.



**Slika 19.** Elektroforetski prikaz amplifikovanog fragmenta cyt *b*. Kolona (strelicom označena) predstavlja marker od 1 kpb.



## 4.2.1.2. ANALIZA SEKVENCIONIRANJA MTDNK CYT B

Reakcijom sekvencioniranja utvrđen je nukleotidni redosled mtDNK cyt *b* na ukupno 48 jedinki ispitivanih populacija (**Slika 20**).

AAACCCACCC	ACTAATAAAA	ATCGCCAACG	ACGCGCTAGT	CGACCTCCA	50
ACACCATCTA	<sup>2</sup> ATATCTCAGC	AATATGAAAC	TTCGGATCCC	<sup>3</sup> TACTAGGATT	100
<sup>4</sup> ATGTTTAATT	ACCCAAATCC	<sup>5</sup> TACAGGATT	ATTCTTAGCC	ATGCACTACA	150
<sup>6</sup> CCTCTGACAT	CTCAACCGCA	TTTTCATCAG	<sup>7</sup> TACCCACAT	CTGCCGAGAC	200
GTCAATTATG	GCTGACTTAT	TCAAGCCTA	CACGCCAATG	GGGCGTCCTT	250
CTTCTTCATC	TGTCTTTATA	<sup>8</sup> TACATATCGC	ACGGGGCCTA	TACTATGGAT	300
CATACCTTTA	TAAAGAAACC	TGAAACATTG	GTGTAGTCCT	<sup>9</sup> ATTCTCCTA	350
<sup>10</sup> GTTATAATAA	CAGCCTTCGT	CGGCTACGTG	<sup>11</sup> CTGCCATGAG	<sup>12</sup> GACAAATATC	400
ATTCTGGGGC	GCCACCGTAA	TTACGAACCT	CCTCTCAGCA	GTCCCCTACA	450
TAGGTGACAC	CCTTGTTCAA	TGAATCTGGG	GCGGTTTCTC	AGTAGACAAC	500
GCAACCCTTA	CACGATTCTT	CGCATTCCAC	TTCCTTCTCC	<sup>13</sup> CATTGTCTG	550
<sup>14</sup> CGCCGGCGCA	<sup>15</sup>	<sup>16</sup>			560

**Slika 20.** Nukleotidna sekvenca 560 bp dugog fragmenta mtDNK cyt *b* vrsta roda *Rutilus*. Varijabilna mjesta među utvrđenim haplotipovima su obojena crvenom bojom i označena brojem.

Analizom dobijenih rezultata sekvencioniranja identifikovano je ukupno 16 polimorfni mjesta (**Tabela 21**). Na osnovu njih u četiri ispitivane populacije identifikovano je ukupno 17 različitih haplotipova od kojih su 15 opisani po prvi put. Registrovanim haplotipovima su dodijeljena i odgovarajuća imena, a haplotipovi koji su pronađeni po prvi put registrovani su u Genebank (**Tabela 21**). Od identifikovanih haplotipova jedino haplotip PYI nije pokazao ograničenost u prostornoj distribuciji. Prostorni raspored ostalih haplotipova bio je striktno vezan za lokalitet sa koga i potiču jedinke. Budući da u sekvenci haplotipa PYI nisu detektovana

varijabilna mjesta dalja analiza polimorfnih mjesta za preostalih 16 haplotipova urađena je u odnosu na njega.

**Tabela 20.** Prikaz pronađenih haplotipova i njihova frekvencija kroz ispitivane populacije.

<b>Haplotip</b>	<b>Populacija</b>			
	Prespa	Ohrid	Skadar_žuti	Skadar_bijeli
PYI	8	-	5	-
PI	1	-	-	-
PII	2	-	-	-
PIII	1	-	-	-
OI	-	1	-	-
OII	-	5	-	-
OIII	-	1	-	-
YI	-	-	1	-
YII	-	-	5	-
YIII	-	-	1	-
YIV	-	-	2	-
YV	-	-	1	-
YVI	-	-	1	-
WI	-	-	-	1
WII	-	-	-	4
WIII	-	-	-	7
WIV	-	-	-	1

Kod mutacija haplotipova pronađenih među ispitivanim populacijama roda *Rutilus* tranzicije su zabilježene na 13, a transverzije na 3 pozicije (**Tabela 21**).

Osim haplotipa PYI u okviru populacije iz Prespanskog jezera detektovana su još tri haplotipa (PI, PII i PIII). Kod haplotipa PI detektovane su dvije tranzicije i to na pozicijama broj 99 (T→C) i 101 (A→G). Haplotipovi PII i PIII se odlikuju tranzicijom na poziciji broj 47 (C→T). Osim ove mutacije kod haplotipa PIII detektovana je i transverzija (G→C) na poziciji broj 555.

Haplotipovi koji su identifikovani kod populacije iz Ohridskog jezera (OI, OII i OIII) karakterišu se tranzicijom (A→G) na poziciji broj 392. Osim ovog polimornog mjesta OI haplotip posjeduje trasverziju (G→C) na poziciji broj 552, a haplotip OIII na poziciji 360 tranziciju (A→G).

Haplotipovi populacije Skadar\_bijeli (WI, WII, WIII i WIV) karakterišu se tranzicijom (A→G) na poziciji 122. Osim ove mutacije kod haplotipa WI su konstatovane i dvije transverzije i to na pozicijama broj 552 (G→C) i 557 (C→G). Haplotip WIII posjeduje još i tranziciju (G→A) na poziciji 383, a WIV tranziciju (T→C) na 545. mjestu.

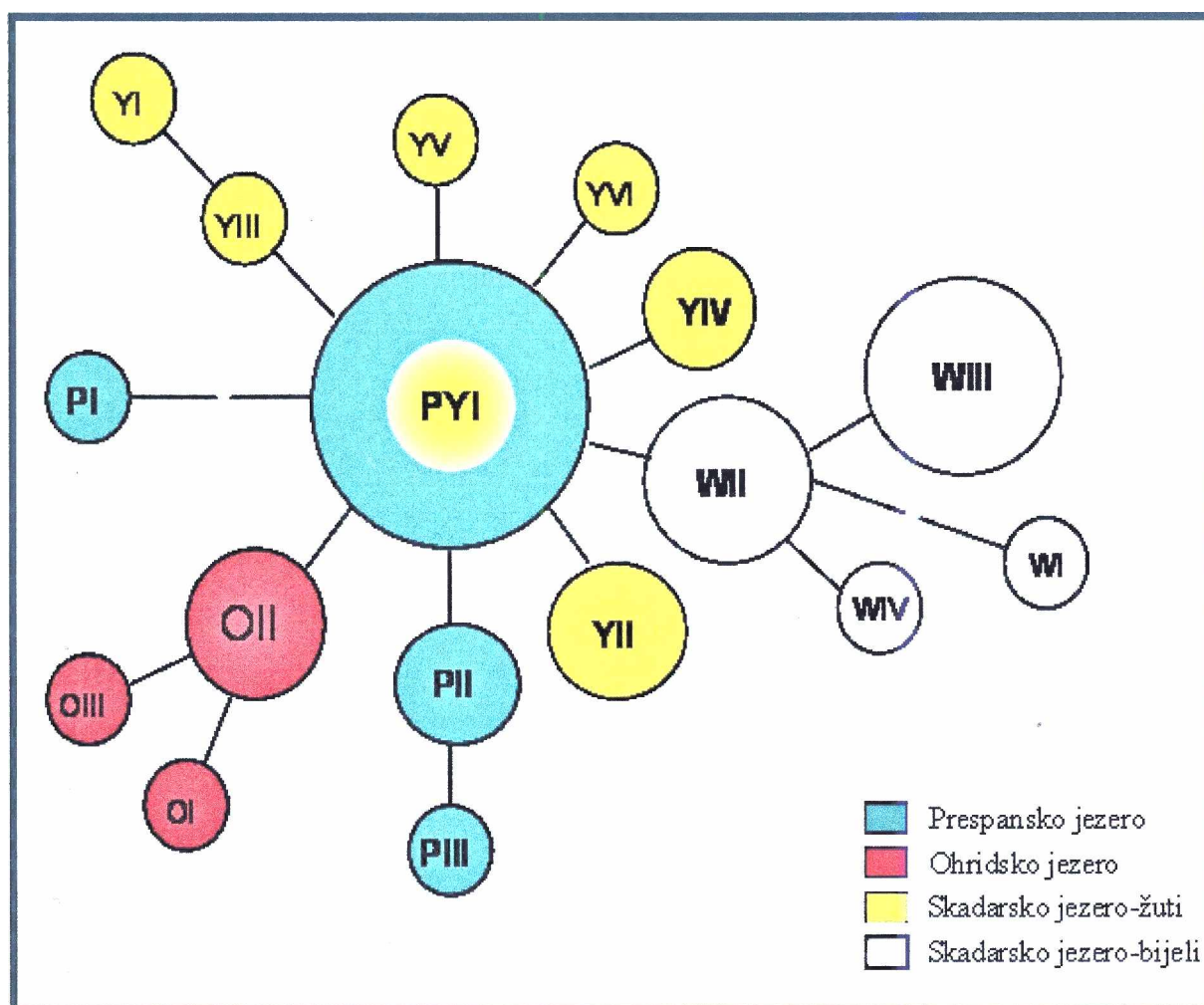
Među jedinkama populacije Skadar\_žuti osim haplotipa PYI koji je i pokazao najveću frekvenciju zastupljenosti identifikovana su još šest haplotipa (YI, YII, YIII, YIV, YV i YVI). YI i YIII haplotipovi se karakterišu se tranzicijom (T→C) na poziciji broj 155. Osim ove mutacije kod

haplotipa YI je konstatovana i transverzija (G→C) na poziciji broj 555. Tranzicija T→C je detektovana kod haplotipova YII na poziciji 275 i YIV na poziciji 65. Na poziciji 182 konstatovana je tranzicija A→G kod haplotipa YVI, a na poziciji broj 344 tranzicija C→T kod YV haplotipa.

Utvrđivanje stepena srodnosti između pronađenih haplotipova četiri ispitivane populacije predstavljeno je kladogramom (mrežom) urađenim na osnovu statističkog 95% "parsimony" kriterijuma (**Slika 21**). Budući da dobijena mreža slikovito prikazuje osnovne filogenetske odnose među analiziranim haplotipovima moguće je utvrditi i genealoške odnose između njih. Pomoću broja algoritamskih mutacionih koraka koji su prikazani spojnim linijama moguće je utvrditi tačan broj mutacija između haplotipova koji pripadaju istoj kladi kao i njihovu udaljenost od centralnog haplotipa.

**Tabela 21.** Polimorfna mjesta mtDNK cyt b za 17 pronađenih haplotipova ispitivanih populacija vrsta iz roda *Rutilus* (Prespa, Ohrid, Skadar, žuti i Skadar\_bijeli). Polimorfna mjesta analiziranih haplotipova su crveno obojena, a predstavljena su u odnosu na haplotip PYI (ancestralni haplotip). Dati su i registracioni brojevi u Genebank haplotipova koji su pronađeni po prvi put. Haplotipovi koji nisu pronađeni po prvi put označeni su sa (\*).

Haplotipovi	Polimorfna mjesta																Genebank br.
	47	65	99	101	122	155	182	275	344	360	383	392	545	552	555	557	
PYI*	C	C	T	A	A	T	A	T	C	A	G	A	T	G	G	C	FJ025062
PI	C	C	C	G	A	T	A	T	C	A	G	A	T	G	G	C	JF730105
PII*	T	C	T	A	A	T	A	T	C	A	G	A	T	G	G	C	AF090771
PIII	T	C	T	A	A	T	A	T	C	A	G	A	T	G	C	C	JF730106
OI	C	C	T	A	A	T	A	T	C	A	G	G	T	C	G	C	JF730107
OII	C	C	T	A	A	T	A	T	C	A	G	G	T	G	G	C	JF730103
OIII	C	C	T	A	A	T	A	T	C	G	G	G	T	G	G	C	JF730104
YI	C	C	T	A	A	C	A	T	C	A	G	A	T	G	C	C	JF730108
YII	C	C	T	A	A	T	A	C	C	A	G	A	T	G	G	C	JF730109
YIII	C	C	T	A	A	C	A	T	C	A	G	A	T	G	G	C	JF730110
YIV	C	C	T	A	A	T	A	T	C	A	G	A	T	G	G	C	JF730111
YV	C	C	T	A	A	T	A	T	C	A	G	A	T	G	G	C	JF730116
YVI	C	C	T	A	A	T	G	T	C	A	G	A	T	G	G	C	JF730117
WI	C	C	T	A	G	T	A	T	C	A	G	A	T	C	G	G	JF730112
WII	C	C	T	A	G	T	A	T	C	A	G	A	T	G	G	C	JF730113
WIII	C	C	T	A	G	T	A	T	C	A	A	A	T	G	G	C	JF730114
WIV	C	C	T	A	G	T	A	T	C	A	G	A	C	G	G	C	JF730115



**Slika 21.** Kladogram haplotipova. Oznake haplotipova su iste kao i u **tabeli 20**. Veličina krugova haplotipova pronađenih u okviru četiri ispitivane populacije odgovara broju jedinki koje dijele isti haplotip. Dvobojnost (PYI) označava da je haplotip pronađen u dvije populacije. Svaka linija koja učestvuje u povezivanju haplotipova predstavlja jedan mutacioni korak po algoritmu programa TCS, a sivi kružići predstavljaju teoretski nedostajuće haplotipove.

Posmatranjem kladograma u cjelini (**Slika 21**) centralnu poziciju zauzima haplotip PYI koji je vjerovatno i ishodišni haplotip za sve četiri *a priori* definisane populacije. Ovaj haplotip pokazuje najveću frekvenciju i odsustvo ograničenosti u prostornoj distribuciji. Naime, nađen je i kod jedinki iz Prespanskog kao i kod jedinki iz Skadarskog jezera i to populacije žutog. Svi ostali haplotipovi su pokazali manju frekvenciju zastupljenosti kao i prostornu odnosno populacionu privatnost. Sa slike se jasno uočava da haplotipovi nađeni u populaciji iz Ohridskog jezera i haplotipovi populacije Skadar\_bijeli formiraju zasebne grupe (klade) dok populacije Skadar\_žuti i populacija iz Prespanskog jezera formiraju zajedničku liniju i ne mogu se međusobno odvojiti.



Divergencija između haplotipova se kreće od jednog do 5 mutacionih koraka. Najudaljeniji haplotip WI se nalazi u okviru klade Skadar\_bijeli koji je udaljen 3 mutaciona koraka od centralnog haplotipa. Unutar klade Skadar\_bijeli centralnu poziciju zauzima haplotip WII koji je jedan mutacioni korak udaljen od ishodišnog haplotipa. Izuzev haplotipa WI koji je dva mutaciona koraka udaljen od centralnog haplotipa klade bijelog ostala dva haplotipa ove klade (WII i WIV) su udaljena po jedan mutacioni korak. Maksimalna detektovana udaljenost haplotipova koji pripadaju dvijema populacijama iz Skadarskog jezera iznosi 5 mutacionih koraka i uočava se između haplotipova YI i WI.

Srodnički odnosi ispitivanih populacija analizirani su i utvrđivanjem njihove genetičke (nukleotidne) divergencije (Tabela 22). Procentualna vrijednost srednje genetičke distance između ispitivanih populacija kreću se od vrijednosti jednake nuli (između populacije Prespa i Skadar\_žuti) do maksimalne zabilježene vrijednosti od 0,4 %. (između populacija Ohrid i Skadar\_bijeli).

**Tabela 22.** Procentualne vrijednosti nukleotidne divergencije (Da) među ispitivanim populacijama

	Prespa	Ohrid	Skadar_žuti	Skadar_bijeli
Prespa	-			
Ohrid	0,2	-		
Skadar_žuti	0,0	0,2	-	
Skadar_bijeli	0,02	0,4	0,03	-

#### 4.2.1.3. UTVRĐIVANJE VREMENA DIVERGENCIJE

Procjena vrijednosti vremenski najbližeg zajedničkog pretka (TMRCA) dobijena primjenom preciznog molekularnog sata za dva simpatrička taksona iz Skadarskog jezera iznosi  $5.648 \times 10^5$  godina što odgovara geološkom periodu Pleistocenu. Vrijednosti 95% HPD (eng. high posteriority density) su u ospegu od  $1.187 \times 10^5$  do  $1.145 \times 10^6$ .

## 4.2.2. ANALIZA SEKVENCIONIRANJA FRAGMENTA NDNK

Reakcijom sekvencioniranja utvrđen je nukleotidni raspored fragmenata nDNK dužine 243 bp kod ukupno 78 jedinki ispitivanih populacija (**Slika 22**).

Analizom dobijenih rezultata detektovana su dva polimorfna mjesta na osnovu kojih je među četiri ispitivane populacije ukupno identifikovano dva haplotipa. Varijabilna mjesta detektovana su na pozicijama broj 117 i 238. Vrijednost divergencije između haplotipova iznosi 0,08%. Jedan haplotip je nađen isključivo kod jedinki populacije Skadar\_bijeli dok drugi nije pokazao ovakvu populacionu fiksiranost, a time ni ograničenost prostorne distribucije već je nađen i kod jedinki Prespanskog, Ohridskog i Skadarskog jezera (populacija Skadar\_žuti).

TATGCTCAGC AGAGTTCAGA GGATTAGAGA GAGTATCTGA	40
GACATTTTGG GTCCTCAGAG TGATCTCATA AAATTCCTA	80
AAACCATAAA ATGTTTCTGA TAGTTTGAAA GAAGCG <sup>117</sup> CAAA	120
GCGTAGCGTC AGTTCTGGCA GGTCACGTTA GTCAAGCTCG	160
CATCAGCTGA CTCTCAGCTG ATCCACGTCT ACCTATAGGA	200
ATACGACGCC TATCACTGTA TACATATGAG CTCCTTC <sup>238</sup> GGT GCT	243

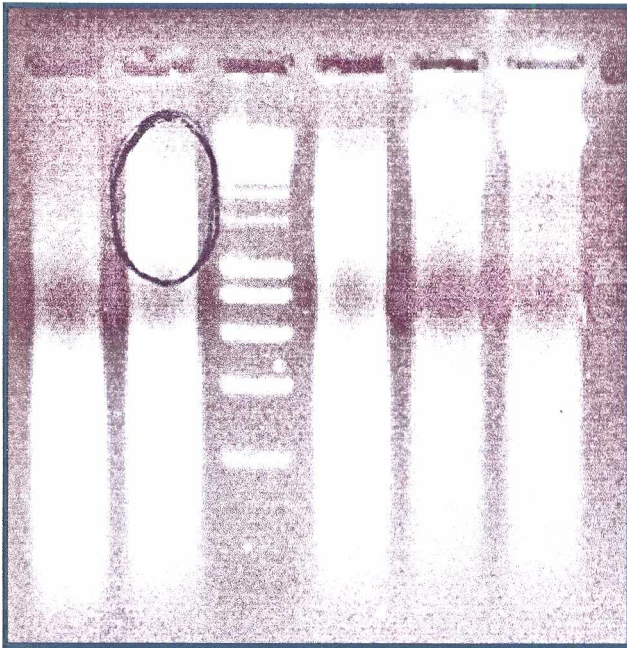
**Slika 22.** Nukleotidna sekvenca 243 bp dugog fragmenta nDNK. Polimorfna mjesta su obojena crvenom bojom i označena brojem.

## 4.2.3. ANALIZA MIKROSATELITNE DNK

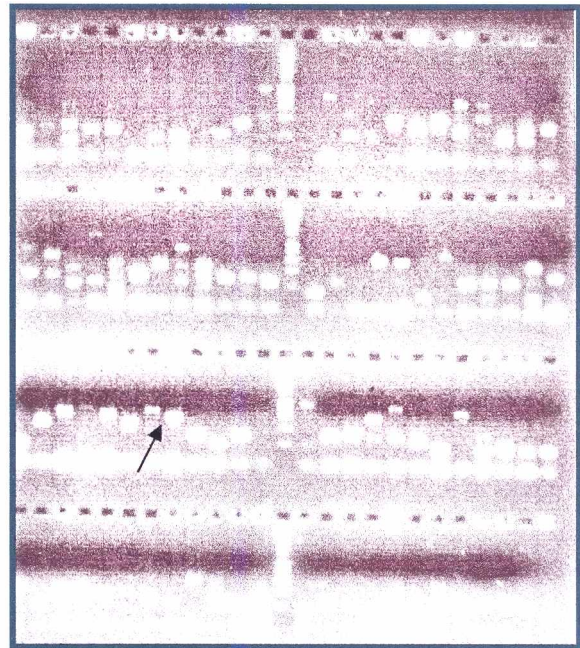
### 4.2.3.1. KLONIRANJE MIKROSATELITNIH LOKUSA ZA ROD *RUTILUS*

Uspješno izolovana genomska DNK (60 ng) upotrijebljena u sprovođenju protokola za kloniranja mikrosatelitnih lokusa roda *Rutilus* dobijena je iz jedinke populacije Skadar\_žuti. Restrikcija genomske DNK enzimom Sau3A1 dala je fragmente veličine od 500-1500 bp i time je omogućeno formiranje genomske biblioteke neophodne za nastavak protokola (**Slika 23**).

Procesom transformacije u hemijski kompetentni soj *E.coli* dobijen je veliki broj klonova koji su sadržali inserte genomske biblioteke roda *Rutilus*. Nakon završene reakcije amplifikacije (PCR reakcije pozitivnih klonova) za reakciju sekvenciniranja odabrani su produkti (inserti DNK) sa rasponom veličina od 400 do 1000 bp za koje se očekivalo da sadrže mikrosatelitne lokuse (**Slika 24**). Za sekvencijsku reakciju odabrano je 112 produkata reakcije amplifikacije pozitivnih kolonija.



**Slika 23.** Genomska biblioteka roda *Rutilus*.



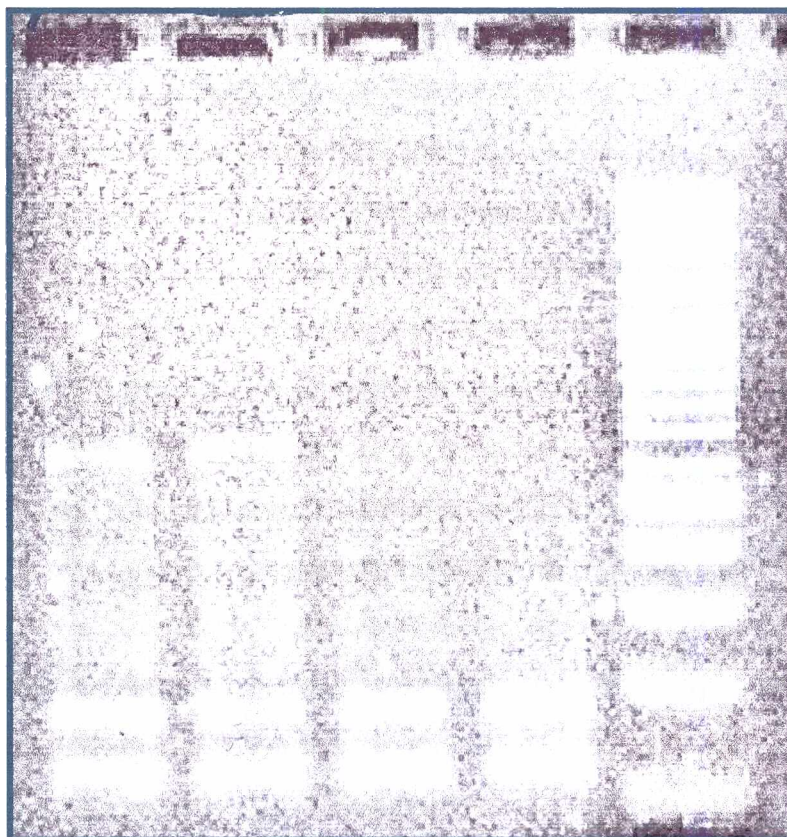
**Slika 24.** Elektroforetski prikaz veličine inserta DNK nakon završene PCR reakcije pozitivnih kolonija. Na slici su uočljivi fragmenti različitih veličina. Strelicom je označen primjer tražene veličine fragmenata za sekvencijsku reakciju

#### 4.2.3.1.1. DIZAJNIRANJE PRAJMERI I OPTIMIZACIJA PCR REAKCIJE

Reakcija sekvencioniranja omogućila je identifikaciju mikrosatelita u većini sekvenci, međutim u svim slučajevima nije bilo moguće dizajniranje seta prajmera. Na osnovu strukture nukleotidne regije koja okružuje mikrosatelite tj. bočnih (eng. "flanking region") mikrosatelitnih regiona kreirano je devetnaest parova prajmera.



Devetnaest kreiranih prajmera podvrgnuti su daljem testiranju i optimizaciji reakcije amplifikacije. Jedanaest lokusa nije pokazalo zadovoljavajuće elektroferograme i oni su eliminisani iz dalje analize. Uspješna optimizacija PCR reakcije ostvarena je za 8 dizajniranih prajmera (**Slika 25**), što su potvrdili i elektroferogrami visokog kvaliteta.



**Slika 25.** Elektroforetski prikaz uspješne optimizacije PCR reakcije kreiranog prajmera za polimorfni lokus. Kolona desno predstavlja marker veličine 1000 bp.

Svih osam lokusa podvrgnuto je tipizaciji na 156 jedinki ispitivanih populacija (Prespa, Ohrid, Skadar\_žuti, Skadar\_bijeli). Na testiranim uzorcima 3 lokusa (*RopsTet 6*, *RopsTet 7* i *RopsTet 8*) su se pokazali kao monomorfni i time bili eliminisani iz dalje analize. Za dalje intra i inter-populacione analize iskorišćeni su preostalih 5 polimorfnih tetranukleotidnih mikrosatelita (*RopsTet 1*, *RopsTet 2*, *RopsTet 3*, *RopsTet 4*, *RopsTet 5*) (**Tabela 23**).

**Tabela 23.** Mikrosatelitni lokusi roda *Rutilus*. Date su sekvence forvardnog (F) i reverznog prajmera (R), ponavljajući motiv, temperature hibridizacije ( $T_a$ ) i registracioni broj u GeneBank. Forvardnim (F) prajmerima je dodata M13 (-21) univerzalna prajmer sekvenca CAGTCGGGCGTCATCA, a reverznim (R) prajmerima GTTCTT rep na 5' kraju.

Naziv lokusa	Nukleotidni raspored početnih oligonukleotida	Ponavljajući motiv	$T_a$ (°C)	GenBank broj
<i>RopsTet 1</i>	F: TACCATAGTGATTCAAAGGTTATGATG R: TTCGTGTTATTATTTGAAGTGTAGGC	(TATC) <sub>15</sub>	50	JF730095
<i>RopsTet 2</i>	F: TCGCAAACAAGAGCAAGTGC R: TTCACCAAAGAACAGCGGAAG	(GATA) <sub>17</sub>	55	JF730096
<i>RopsTet 3</i>	F: CTCTTTGTTTTCTGGCCCC R: GAGGATCCCTTCACGCATG	(TGTC) <sub>8</sub>	55	JF730097
<i>RopsTet 4</i>	F: CAGCAGAAGCTTCACCACTGG R: ACTCCACCGCATGTCAGCA	(TATC) <sub>23</sub>	55	JF730098
<i>RopsTet 5</i>	F: GCATGTGAGTCATTGGCTACTTAT R: GTTCAGATTTGTGTTTGGAATCAG	(GATA) <sub>34</sub>	55	JF730099
<i>RopsTet 6</i>	F: GCGCTGAGTTTCACAAACGA R: TGAGTTAAGCAGGACCGGCT	(GATA) <sub>34</sub>	55	JF730100
<i>RopsTet 7</i>	F: CGTCCACGCAACGAGTCCTTAC R: CAGTCCAGAACCACCTTCAGAGG	(GACA) <sub>7</sub>	55	JF730101
<i>RopsTet 8</i>	F: TTTATGTCTCGGCGGGGC R: GCATGAACCGAGAGGACACAA	(TCTA) <sub>17</sub>	55	JF730102

#### 4.2.3.1.2. REGISTRACIJA MIKROSATELITNIH LOKUSA

*De novo* tipizirani mikrosatelitni lokusi i dizajnirani prajmeri za njihovu amplifikaciju registrovani su u GenBank-u ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Ime lokusa izvedeno je od početnih slova objekta istraživanja (*Rutilus*) i lokaliteta sa kojih potiču uzorci (Ohridsko jezero, Prespansko i Skadarsko jezero). Drugo ime iz naziva lokusa potiče od broja nukleotida osnovnog motiva mikrosatelita.



#### 4.2.3.2. STATISTIČKA ANALIZA MIKROSATELITNIH LOKUSA KOD PROUČAVANIH POPULACIJA

Analiza je obuhvatila podatke o pet polimorfnih mikrosatelitnih lokusa za jedinke iz četiri *a priori* utvrđene populacije. Testovi o potencijalnom prisustvu nultih alela i test za "linkage disequilibrium" su dokazali da dobijeni lokusi nisu povezani i da ne postoje dokazi o potencijalnom prisustvu nula alela.

Svi ispitivani lokusi pokazali su prisustvo velikog broja alela koji se kreće u rasponu od 8-22 alela. Sumarna statistika za sve četiri populacije na 5 analiziranih lokusa data je u **Tabeli 24**.

Na lokusu *RopsTet* 1 broj alela je u rasponu od 14 alela koji su zabilježeni za populaciju Skadar\_bijeli do 16 alela za populacije Prespa i Skadar\_žuti. 15 alela je zabilježeno za Ohridsku populaciju. Na lokusu *RopsTet* 2 zabilježeno je 14 alela za populaciju Skadar\_bijeli, 18 alela za Prespansku i Ohridsku populaciju. Populacija Skadar\_žuti na ovom lokusu ima 21 alel. 8 alela je registrovano kod populacija Prespa, Ohrid i Skadar\_bijeli, a 11 u populaciji Skadar\_žuti na lokusu *RopsTet* 3. 15 alela je registrovano kod populacija Prespa, Ohrid i Skadar\_bijeli, a 22 u populaciji Skadar\_žuti na lokusu *RopsTet* 4. Na lokusu *RopsTet* 5 zabilježeno je 15 alela za Ohridsku populaciju i populaciju Skadar\_žuti, 16 alela Skadar\_bijeli i 20 alela za Prespansku populaciju.

U cilju dobijanja kompletnijeg uvida u nivo interpopulacione diferencijacije ispitivanih populacija izračunat je i broj privatnih alela. Uzimajući u obzir čitav set podataka za sve četiri populacije dobijeno je ukupno deset privatnih alela i to za populaciju Prespa 3 alela; Skadar\_žuti 2 alela; Skadar\_bijeli 5 alela dok kod populacije iz Ohridskog jezera nije konstatovano prisustvo privatnih alela. Populacije iz Skadarskog jezera su zatim i zasebno podvrgnute analizi. Rezultati ove analize su pokazali da skadarske populacije među sobom imaju ukupno 21 privatni alel, od kojih je 12 privatnih alela za populaciju Skadar\_bijeli, a 9 za populaciju Skadar\_žuti.

**Tabela 24.** Zbirna statistika mikrosatelitnih lokusa za svaku populaciju ponaosob. Prikazan je obim uzorka ( $N$ ), broj alela ( $A$ ), bogatstvo alela ( $A_r$ ), opseg veličina alela ( $R$ ), utvrđena ( $H_o$ ) i očekivana heterozigotnost ( $H_E$ ), i  $F_{IS}$  vrijednost. Zvezdica označava statistički značajno odstupanje od Hardy-Vajnergeve ravnoteže prije izvršene korekcije za višestruke testove.

Populacije	N	Naziv lokusa					RopsTet 1	RopsTet 2	RopsTet 3	RopsTet 4	RopsTet 5	Ukupno
		A	Ar	R	$H_o$	$H_E$	$F_{IS}$					
Prespa	42	A	16	15.482	18	16.976	8	7.307	15	14.410	20	77
		Ar	15.482	16.976	221-289	0.9091	0.5758	0.9697	235-295	0.9394	208-308	14.422
		R	165-225	0.9091	0.9155	0.008	0.066	0.8939	-0.068	0.9114	-0.029	-
		$H_o$	0.9031	0.026	0.000	0.000	0.000	0.7284	0.8897	0.9044	-0.036	0.8752
		$H_E$	0.9118	0.8746	-0.045	0.000	0.000	0.7284	0.8897	0.9044	-0.036	0.8619
		$F_{IS}$	0.068	0.068	0.068	0.068	0.068	0.068	0.068	0.068	0.068	-0.003
Ohrid	44	A	15	13.632	18	17.090	8	7.515	15	14.069	15	71
		Ar	13.632	17.090	217-301	0.9412	0.7353	0.9412	227-291	0.9412	250-312	13.3432
		R	185-241	0.9118	0.9144	0.000	0.000	0.7284	0.8897	0.9044	-0.036	-
		$H_o$	0.9118	0.8746	-0.045	0.000	0.000	0.7284	0.8897	0.9044	-0.036	0.8980
		$H_E$	0.9118	0.8746	-0.045	0.000	0.000	0.7284	0.8897	0.9044	-0.036	0.8650
		$F_{IS}$	0.068	0.068	0.068	0.068	0.068	0.068	0.068	0.068	0.068	-0.026
Skadar_žuti	38	A	16	15.308	21	19.974	11	10.765	22	20.640	15	85
		Ar	15.308	19.974	209-301	0.8519	0.9259	0.8519	203-329	0.8519	254-320	16.2814
		R	173-233	0.8519	0.9280	0.080	0.035	0.9239	0.9239	0.9143	0.082	-
		$H_o$	0.8519	0.9129	0.068	0.068	0.068	0.068	0.068	0.068	0.068	0.8644
		$H_E$	0.9129	0.068	0.068	0.068	0.068	0.068	0.068	0.068	0.068	0.9082
		$F_{IS}$	0.068	0.068	0.068	0.068	0.068	0.068	0.068	0.068	0.068	0.062*
Skadar_bijeli	32	A	14	13.860	14	13.863	8	7.875	15	14.837	16	67
		Ar	13.860	165-225	0.8889	0.8889	0.8889	0.8889	223-279	0.8148	222-290	13.287
		R	165-225	0.8889	0.8889	0.8889	0.8889	0.8889	0.8148	0.8148	0.9630	-
		$H_o$	0.8800	0.010	0.068	0.068	0.068	0.8182	0.8532	0.8909	-0.071	0.8798
		$H_E$	0.8800	0.010	0.068	0.068	0.068	0.8182	0.8532	0.8909	-0.071	0.8701
		$F_{IS}$	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.038	0.053	0.053	0.053	0.005

## 4.2.3.2.1. ANALIZA POLIMORFIZMA MIKROSATELITNIH LOKUSA

Uočena heterozigotnost se nalazi u rasponu od 0.576 do 0.970, dok se vrijednosti očekivane heterozigotnosti kreću od 0.611 do 0.924 (Tabela 24). Prije izvršene korekcije za višestruke testove svega jedan lokus je pokazao značajno odstupanje od Hardy-Vajnbergove ravnoteže. U ukupnoj statistici populacija Skadar\_žuti je pokazala značajno odstupanje. Međutim nakon izvršene korekcije nije postojalo značajno odstupanje od Hardy-Vajnbergove ravnoteže i samim tim nije dalje razmatrano.

Najmanja uočena heterozigotnost utvrđena je za populaciju Prespa i to na lokusu *RopsTet3*.

## 4.2.3.3. ANALIZA STEPENA GENETIČKE DIFERENCIJACIJE ISPITIVANIH POPULACIJA

Vrijednosti zabilježenih parametara  $F$  i  $R$  statistike dobijenih u cilju procjene nivoa genetičke diferencijacije ispitivanih populacija prikazane su u Tabeli 25. Konstatovane vrijednosti divergencije ( $F_{ST}$ -vrijednost) između parova četiri ispitivane populacije izračunate na osnovu frekvencije alela kretale su se od veoma niske vrijednosti 0,015 zabilježene između populacije iz Prespanskog jezera i populacije Skadar\_žuti do veoma visoke 0,07 između populacija Prespanskog i Ohridskog jezera. Registrovane  $R_{ST}$ -vrijednosti su se kretale od veoma niskih 0,095 registrovanih između Prespanske i Skadar\_žuti populacije do veoma visokih 0,591 registrovanih između Ohridske i Skadar\_bijeli populacije.

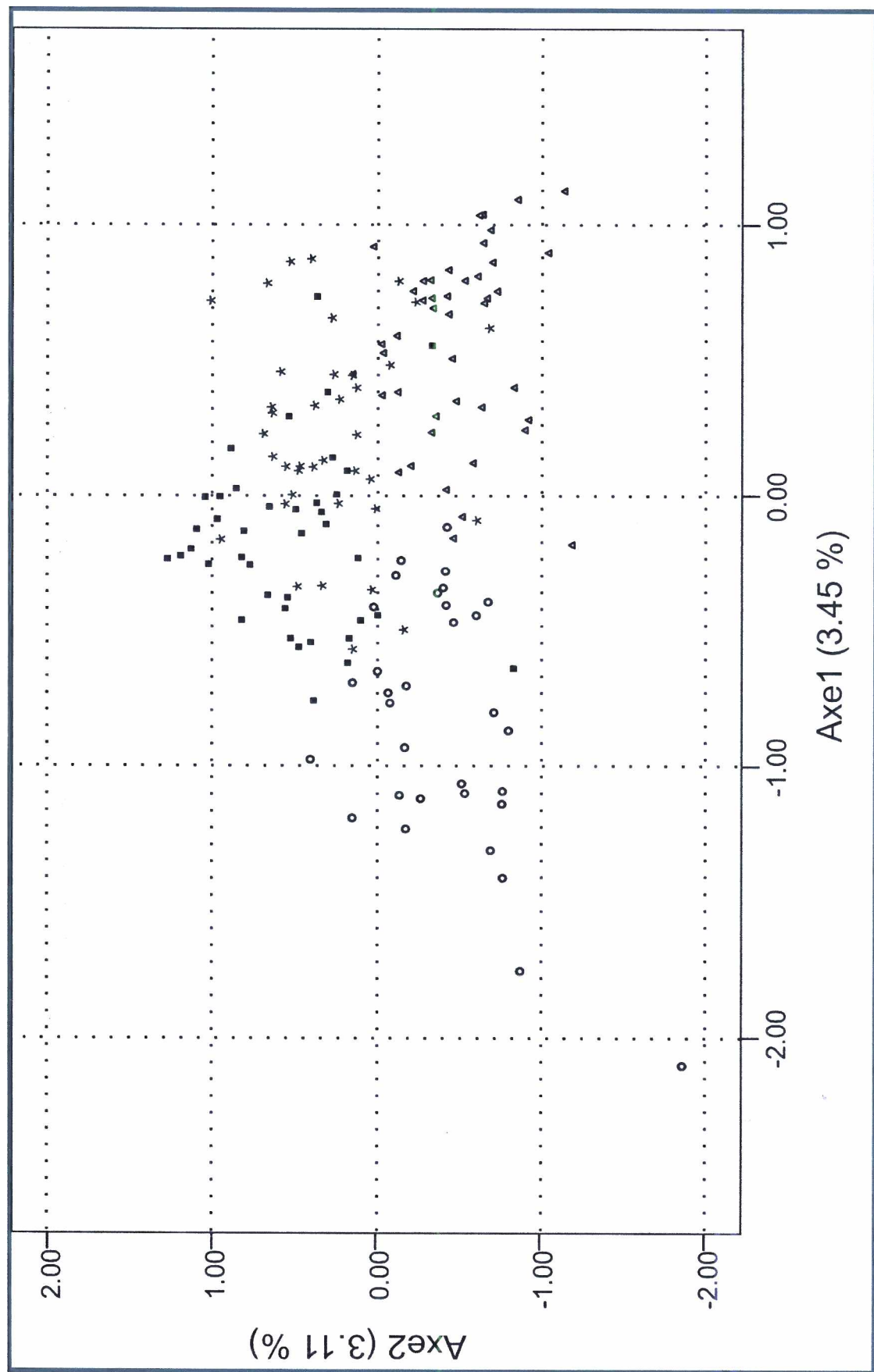
**Tabela 25.** Prikaz vrijednosti  $F_{ST}$  (iznad dijagonale) i  $R_{ST}$  (ispod dijagonale) između parova populacija kao i njihova statistička značajnost nakon izvršene korekcije (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ )

Populacije	Skadar_bijeli	Ohrid	Prespa	Skadar_žuti
Skadar_bijeli	-	0,058**	0,0542**	0,0392**
Ohrid	0,59147***	-	0,0752**	0,0331**
Prespa	0,29352***	0,43053***	-	0,0150**
Skadar_žuti	0,47266***	0,30665***	0,09523***	-

#### 4.2.3.4. IDENTIFIKACIJA BROJA GENETIČKIH GRUPA

Rezultati analize utvrđivanja generalne strukture i stvarnog broja populacija među četiri *a priori* definisane populacije pokazali su postojanje tri genetička klastera (grupe) ( $K=3$ ) što ukazuje na postojanje tri različita taksona među četiri ispitivane populacije. Dobijeni su sledeće grupe (klasteri): Ohridski, Skadar\_bijeli i klaster koji čine jedinke iz Prespanskog jezera i Skadar\_žuti. Rezultati ove analize podudaraju se sa pretpostavkom da među četiri ispitivane populacije zapravo i ne postoje četiri vrste (taksona).

Ukupni prikaz diferencijacije genotipova na individualnom nivou dobijen je na osnovu FCA-grafika koji odražava relativno niske ali statistički značajne  $F_{ST}$  vrijednosti između populacija. FCA grafik prve dvije ose prikazuje **Slika 26**. Prva osa pokazuje jasno izdvajanje klastera genotipova kojeg sačinjavaju jedinke Skadar\_bijeli. Ova populacija pokazuje najviši nivo divergencije i najmanji stepen preklapanja sa jedinkama ostalih populacija, uključujući i jedinke simpatričke populacije iz Skadarskog jezera (Skadar\_žuti). Duž prve ose se može uočiti i najveći stepen divergencije između klastera Ohridske populacije i Skadar\_bijeli.



**Slika 26.** Faktorijalna korespondentna analiza (FCA) individualnih mikrosatelitnih genotipova. ° označava populaciju Skadar\_žuti; ■ populaciju Prespa; ▲ populaciju Skadar\_bijeli i ▲ populaciju Ohrid.



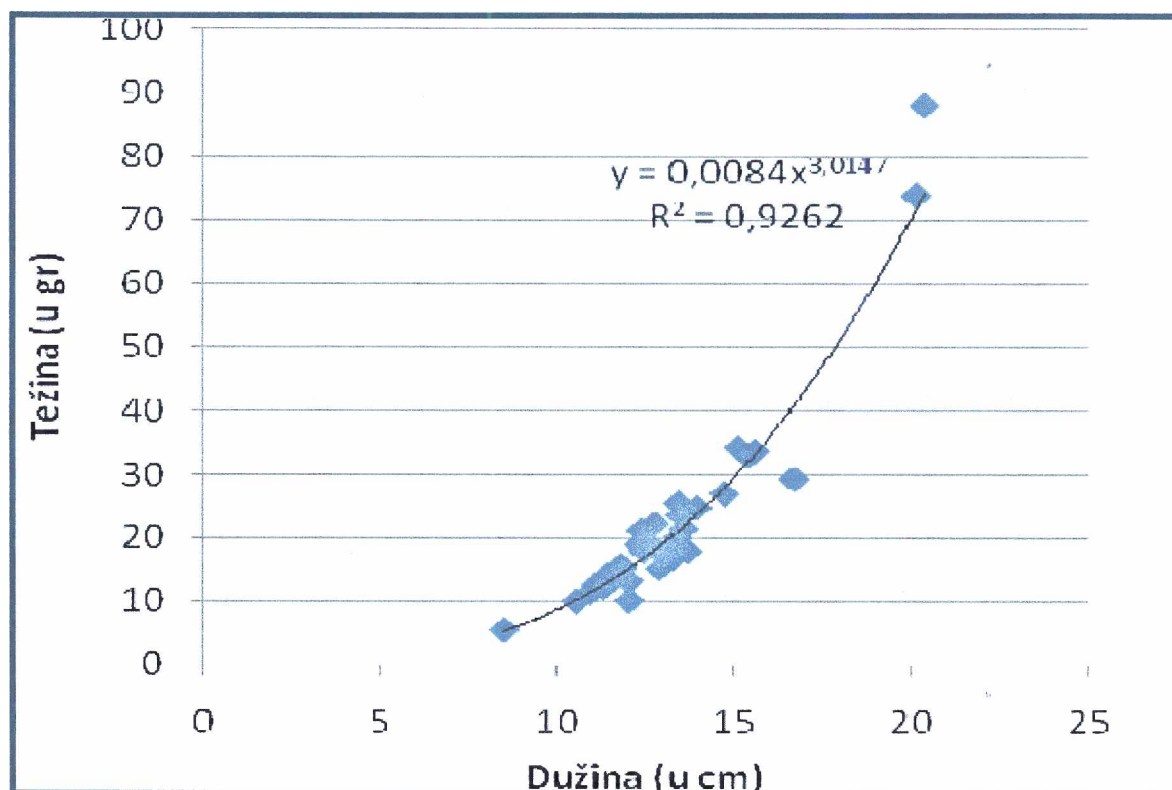
## 4.3. EKOLOŠKA ANALIZA

### 4.3.1. ANALIZA RASTA

#### 4.3.1.1. ANALIZA RASTA POPULACIJE SKADAR\_BIJELI

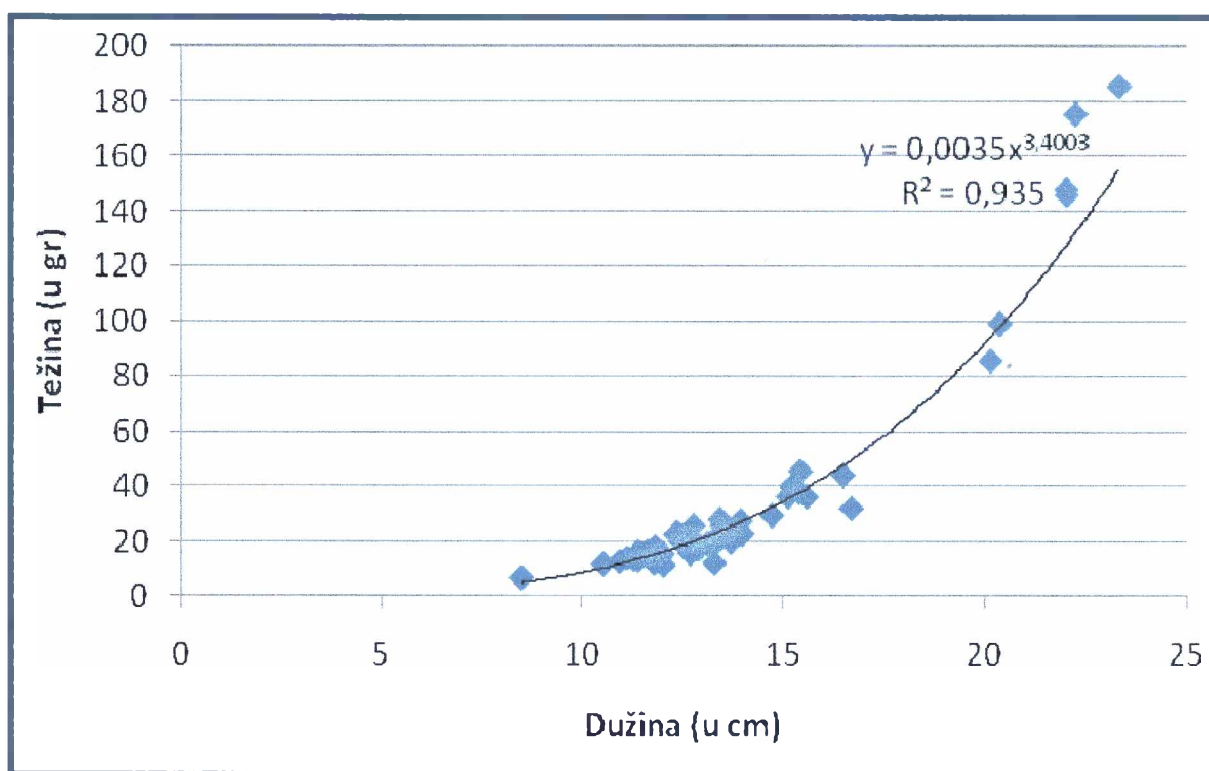
##### 4.3.1.1.1. UTVRĐIVANJE MODELA RASTA

Na osnovu seta originalnih podataka dužinskih i težinskih (bez unutrašnjih organa) mjera populacije Skadar\_bijeli dobijena je jednačina prikazana na **Slici 27**. Dobijena vrijednost regresionog koeficijenta ( $b=3,0147$ ) pokazuje da ovu populaciju karakteriše izometrijski model rasta. Registrovana vrijednost koeficijenta korelacije ( $r=0,93$ ) ukazuje na gotovo savršenu korelaciju između vrijednosti dužina i težina.



**Slika 27.** Dužinsko-težinski odnos populacije Skadar\_bijeli izračunat na osnovu težina bez unutrašnjih organa. Na slici je prikazana jednačina iz koje su dobijene vrijednosti regresionog koeficijenta kao i vrijednosti koeficijenta korelacije.

Rezultati dužinsko-težinskog odnosa izračunatog na osnovu podataka dužina i težina sa unutrašnjim organima (polno zrele jedinke) prikazani su na **Slici 28**. Dobijena vrijednost regresionog koeficijenta ( $b=3,40$ ) ukazuje da nakon sticanja polne zrelosti jedinke ovog taksona karakteriše alometrijski rast. Zabilježena je ista vrijednost koeficijenta korelacije kao i u prethodnom slučaju ( $r=0,93$ ).



**Slika 28.** Dužinsko-težinski odnos populacije Skadar\_bijeli izračunat na osnovu težina sa unutrašnjim organima polno zrelih jedinki. Na slici je prikazana jednačina iz koje su dobijene vrijednosti regresionog koeficijenta kao i vrijednosti koeficijenta korelacije.

#### 4.3.1.1.2. DUŽINSKO RASTENJE

U uzorku jedinki ispitivanih u cilju analize dužinsko rastenja bile zastupljene su uzrasne klase od 1 do 4 godine (**Tabela 26**). Variranje dužina uzrasne klase 1 iznosi od 105, 46 do 124, 54 mm, dok je srednja vrijednost iznosi 88, 94. Kod uzrasne klase 2 variranje dužine je u opsegu od 117, 60 do 135, 9 mm, dok registrovana srednja vrijednost iznosi 126, 43 mm. Granice variranja dužina uzrasne klase 3 su od 134,03 do 171,8 dok srednja vrijednost iznosi 154,02 mm. Srednja

vrijednost uzrasne klase 4 iznosi 217,17 mm dok raspon variranja vrijednosti dužina se kreće od 201,42 do 224,40.

Izračunati parametri koji opisuju tempo rasta prikazani su u **Tabeli 26**. Dobijene vrijednosti apsolutnog prirasta ukazuju na neravnomjeran rast sa porastom starosti.

**Tabela 26.** Pokazatelji dužinskog rasta populacije Skadar\_bijeli na osnovu prosječnih vrijednosti totalnih dužina (T.L.) različitih uzrasnih klasa. U tabeli su prikazane i vrijednosti apsolutnog (u mm) i relativnog (%) prirasta, specifična stopa rasta ( $C_l$ ), konstanta rasta ( $K_l$ ) i karakteristika rasta ( $G_l$ ).

Uzrasna klasa	T.L.	Apsolutni prirast	Relativni Prirast	$C_l$	$K_l$	$G_l$
1	88,94					
2	126,43	37,49	42,15	0,35	0,05	44,46
3	154,02	27,59	21,82	0,19	0,49	30,40
4	217,17	63,15	41,00	0,34	1,20	74,59

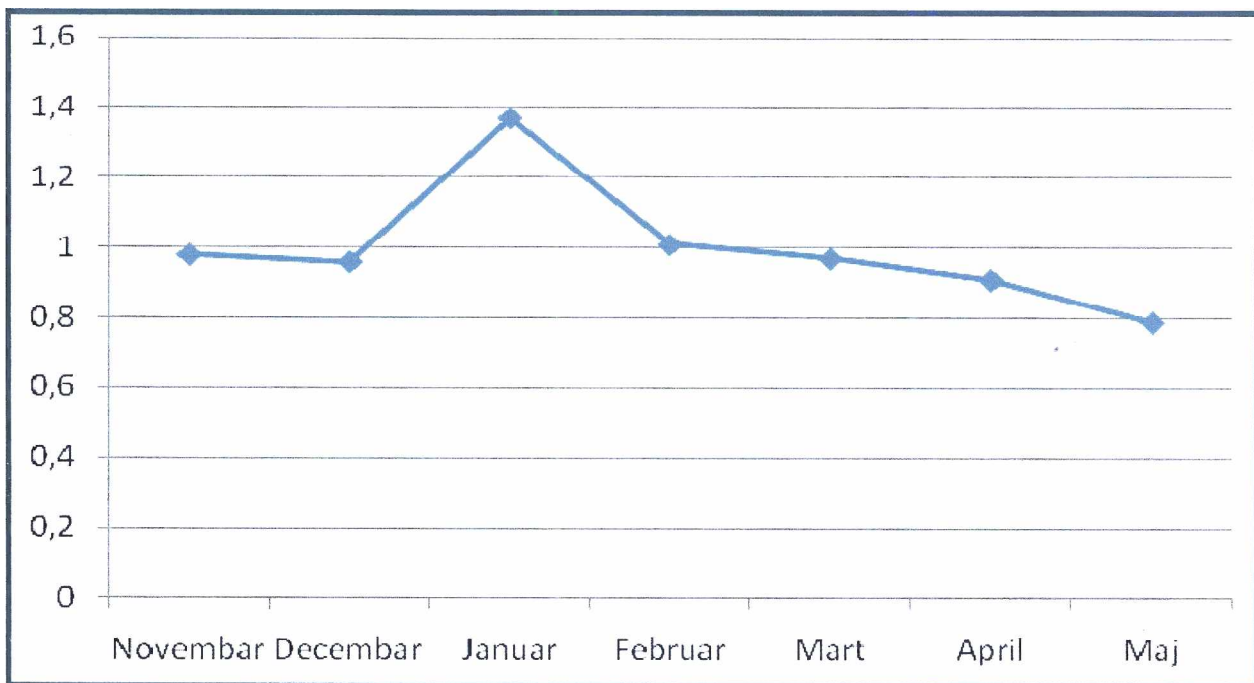
#### 4.3.1.1.3. TEŽINSKO RASTENJE

Težinsko rastenje je analizirano za uzrasne klase 1 do 4 godine (**Tabela 27**). Granice variranja težine u uzrasnoj klasi 1 iznose od 11,7-23,3 gr, dok srednja vrijednost iznosi 15,76 gr. U uzrasnoj klasi 2 opseg variranje je 15,2-25,7, a srednja vrijednost iznosi 21,34 gr.

**Tabela 27.** Pokazatelji težinskog rasta populacije Skadar\_bijeli na osnovu prosječnih vrijednosti totalnih dužina težina različitih uzrasnih klasa. Za svaku uzrasnu klasu izračunat je godišnji prirast u gramima i relativni u %.

Uzrasna klasa	T.L.	Težina	Godišnji prirast u mm
1	88,94	15,76	
2	126,43	21,34	5,58
3	154,02	30,07	8,73
4	217,17	140,02	109,95

Registrovano variranje težina uzrasne klase 3 kreće se u granicama od 20,6 do 37,8 gr dok je srednja vrijednost 30,07 gr. Za uzrasnu klasu 4 srednja vrijednost iznosi 92,35 gr dok je opseg variranja od 85,6-99,1 gr. Grafički prikaz vrijednosti kondicionog faktora po mjesecima prikazuje Najveća vrijednost kondicionog faktora zabilježena je u januaru mjesecu i iznosi 1,37 dok je najniža zabilježena u mjesecu maju i iznosi 0,79.

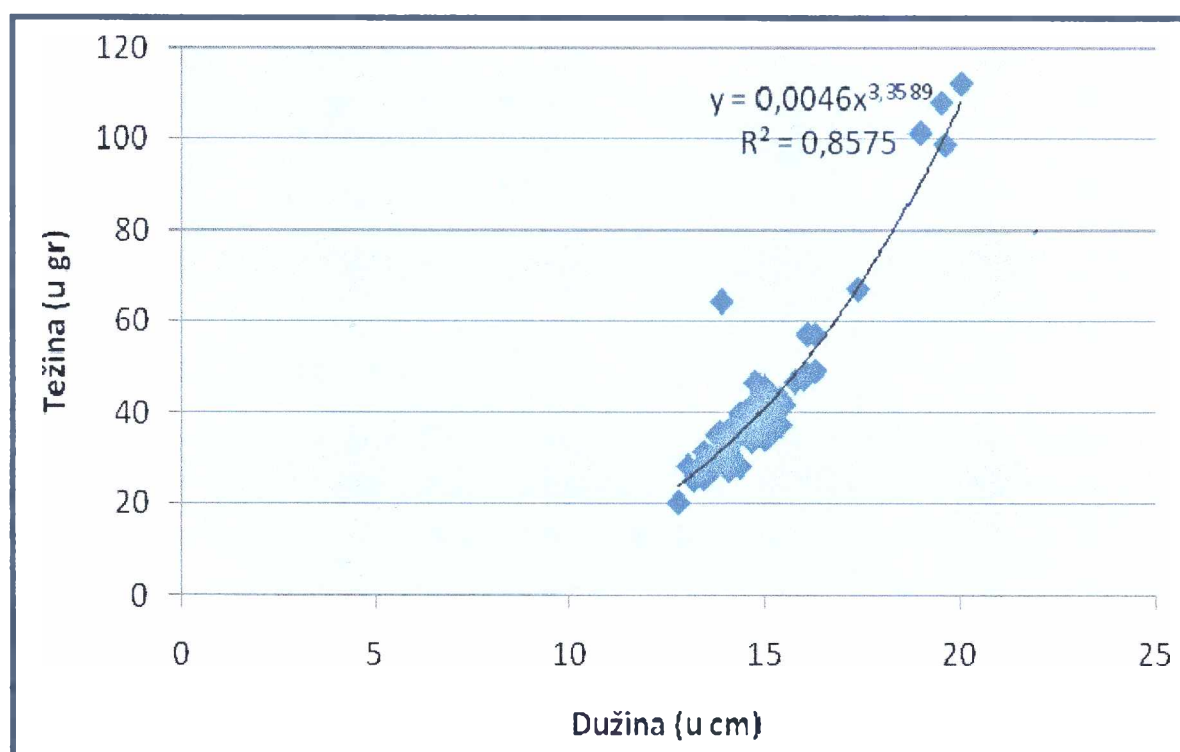


Slika 29. Mjesečne vrijednosti kondicionog faktora populacije Skadar\_bijeli

#### 4.3.1.2. ANALIZA RASTA POPULACIJA SKADAR\_ŽUTI

##### 4.3.1.2.1. UTVRĐIVANJE MODELA RASTA

Izmjerene vrijednosti dužinskih i težinskih mjera jedinki populacije Skadar\_žuti omogućile su dobijanje jednačine iz koje su dobijene vrijednosti za utvrđivanje modela rasta (**Slika 30**). Vrijednost regresionog koeficijenta ( $b=3,3589$ ) ukazuje na alometrijski model rasta i to pozitivnu alometriju. Vrijednost koeficijenta korelacije  $r = 0,92$  ukazuje na visok stepen korelacije mjerenih karaktera (varijabli) dužine i težine.



**Slika 30.** Dužinsko-težinski odnos populacije Skadar\_žuti. Na slici je prikazana jednačina iz koje su dobijene vrijednosti regresionog koeficijenta kao i vrijednosti koeficijenta korelacije.

##### 4.3.1.2.2. DUŽINSKO RASTENJE

Dužinsko rastenje analizirano je na osnovu originalnih podataka totalnih dužina uzrasnih klasa od 1. do 5. godine. Zabilježeni opseg variranja dužina kod jedinki uzrasne klase 1. godina je od 56 do 85,4 mm. Registrovano variranje dužina uzrasne klase 2 iznosi od 111,96 do 149,56 mm,



dok srednja vrijednost iznosi 126,68 mm. Granice variranja dužina u uzrasnoj klasi 3 godine iznose od 136,56 do 176,4 mm, dok srednja vrijednost iznosi 150,47 mm. U uzrasnoj klasi 4. godine zabilježeno je variranje dužina od 170,96 do 198,2 mm dok srednja vrijednost iznosi 195,95 mm. Za uzrasnu klasu 5. godina registrovano je variranje dužina od 190,56 do 205,84 mm dok je zabilježena srednja vrijednost 105,86 mm. Parametri izračunati u cilju opisivanja tempa rasta prikazani su u **Tabeli 28**.

**Tabela 28.** Pokazatelji dužinskog rasta populacije Skadar\_žuti na osnovu prosječnih vrijednosti totalnih dužina različitih uzrasnih klasa. U tabeli su prikazane i vrijednosti apsolutnog (u mm), i relativnog (u %) prirasta, specifična stopa rasta ( $C_i$ ), konstanta rasta ( $K_i$ ) i karakteristika rasta ( $G_i$ ).

Uzrasna klasa	T.L.	Apsolutni prirast (mm)	Relativni prirast %	$C_i$	$K_i$	$G_i$
1	74,35					
2	126,68	52,33	70,38	0,53	0,79	67,14
3	150,47	23,79	18,78	0,17	0,45	25,89
4	185,98	35,51	23,59	0,21	0,74	39,36
5	195,86	9,88	5,31	0,05	0,23	10,16

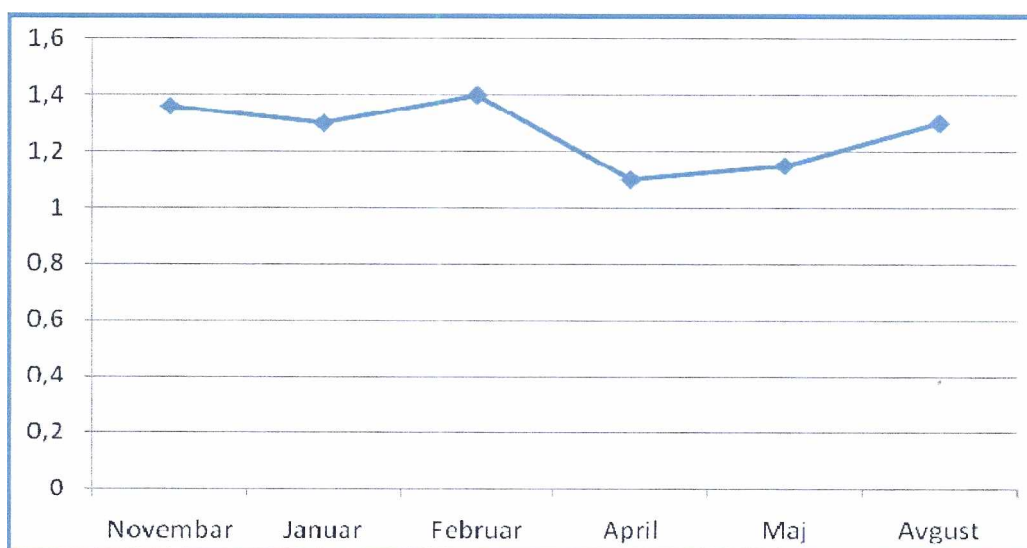
#### 4.3.1.2.3. TEŽINSKO RASTENJE

Uzrasnim klasama od 1. do 5. godine analizirano je težinsko rastenje (**Tabela 29**). Za uzrasnu klasu 1. godina registrovane su težine od 1 do 3,5 gr. U uzrasnoj klasi 2 opseg variranja vrijednosti težine kreće se od 16,5 do 51,0, a srednja vrijednost iznosi 26,51 gr. Registrovano variranje težina uzrasne klase 3 kreće se u granicama od 33,5 do 77,3 gr dok je srednja vrijednost 47,13 gr. Za uzrasnu klasu 4 srednja vrijednost iznosi 89,72 gr dok je opseg variranja od 83,2 do 106,4 gr. U uzrasnoj klasi 5 registrovane su težine od 121,0 do 165,9 gr, dok je zabilježena srednja vrijednost 137,56 gr.

**Tabela 29.** Pokazatelji težinskog rasta populacije Skadar\_žuti na osnovu prosječnih vrijednosti totalnih dužina i težina različitih uzrasnih klasa. Za svaku uzrasnu klasu izračunat je godišnji prirast u gramima i relativni u %.

Uzrasna klasa	T.L.	Težina	Godišnji prirast
1	74,35	2,76	
2	126,28	26,51	23,75
3	150,47	47,13	20,62
4	185,98	89,72	42,59
5	195,86	137,56	47,84

Grafički prikaz vrijednosti kondicionog faktora po mjesecima prikazan je na **Slici 31**. Grafik pokazuje jasan porast vrijednosti kondicionog faktora od januara do februara mjeseca kada je i registrovana najveća vrijednost kondicionog faktora 1,4. Najniža zabilježena vrijednost kondicionog faktora registrovana je u aprilu mjesecu i iznosi 1,10. Porast vrijednosti kondicionog faktora zapaža se i u prolječno-ljetnjem periodu i to od aprila do avgusta mjeseca.



**Slika 31.** Mjesečne vrijednosti kondicionog faktora populacije Skadar\_žuti

#### 4.3.2. ANALIZA ISHRANE

Kvalitativna analiza ishrane u proljećnjem i rano jesenjem periodu pokazala je da je u ishrani populacije Skadar\_žuti kao dominantna zabilježena biljna komponenta. Od registrovanih elemenata biljne komponente dominantni su predstavnici makrofitske vegetacije (*Potamogeton* spp.) i filamentozne alge. Osim njih u crijevnom traktu jedinki ove populacije elementi makrofitske vegetacije detritus. Animalna komponenta je samo sporadačno registrovana i to predstavnici Bivalvia.

U ishrani Skadar\_bijeli dominantni su predstavnici animalne komponente i to bentoske zajednice. Analiza sadržaja digestivnog trakta je pokazala u najvećem broju prisustvo članova Chironomidae i Bivalvia, zatim slijede Mollusca, larve Trichoptera i adultne jedinke Diptera. U najmanjem procentu zabilježeni su predstavnici Ephemeroptera (*Branchies* spp.).

### 4.3.3. DISTRIBUCIJA I BROJNOST

Rezultati terenskih istraživanja ispitivanih taksona iz Skadarskog jezera po lokalitetima slivnog područja Skadarskog jezera prikazani su u **Tabeli 30**. S ciljem utvrđivanja sličnosti/razlika u pogledu distribucije lokaliteti uzorkovanja su podijeljeni u dvije grupe i to: rijeke slivnog područja Skadarskog jezera i basen Skadarskog jezera. Iz tabele se jasno uočava da je populacija Skadar\_bijeli isključivo jezerska forma i nije registrovana u rijekama slivnog područja jezera. Lokalizacije na kojima je registrovana ova populacija karakteriše prisustvo izvora. Populacija Skadar\_žuti je distribuirana kako u basenu tako i u rijekama slivnog područja jezera. Registrovana je u rijeci Zeti od sastavaka sa Moračom do Danilovgrada, u glavnom toku rijeke Morače do ušća Zete i svim većim i manjim pritokama donjeg toka Morače (Ribnica, Trešnjica, Sitnica, Cijevna-donji tok). Od manjih pritoka koje direktno utiču u Skadarsko jezero (Orahovštica, Virštica, Plavnica i Gostiljska rijeka) registrovan je u njihovim donjim tokovima.

U pogledu brojnosti nailazi se na neravnomjeran odnos ove dvije populacije na gotovo svim lokalitetima uzorkovanja. Naime, na lokalitetima Vranjina, Virpazar i u izvorima duž južne obale jezera (Raduš, Vaškaut, Bobovište, Krnjice) na kojima je evidentirano zajedničko prisustvo jedinki oba ispitivana taksona, utvrđeno je njihovo prisustvo u različitim odnosima pri čemu je najčešće zabilježeni odnos iznosio 100-200 jedinki populacije Skadar\_žuti na 1-3 jedinke populacije Skadar\_bijeli. U okviru ovog istraživanja zabilježene su i vrlo rijetke situacije u kojima je ovaj odnos bio znatno drugačiji. Ovakav slučaj evidentiran je samo na jednom lokalitetu i to u Malom blatu (Bobija) gdje je njihova zastupljenost bila približno jednaka.

**Tabela 30.** Prikaz komparativne distribucije simpatričkih taksona iz Skadarskog jezera po glavnim lokalitetima slivnog područja basena Skadarskog jezera.

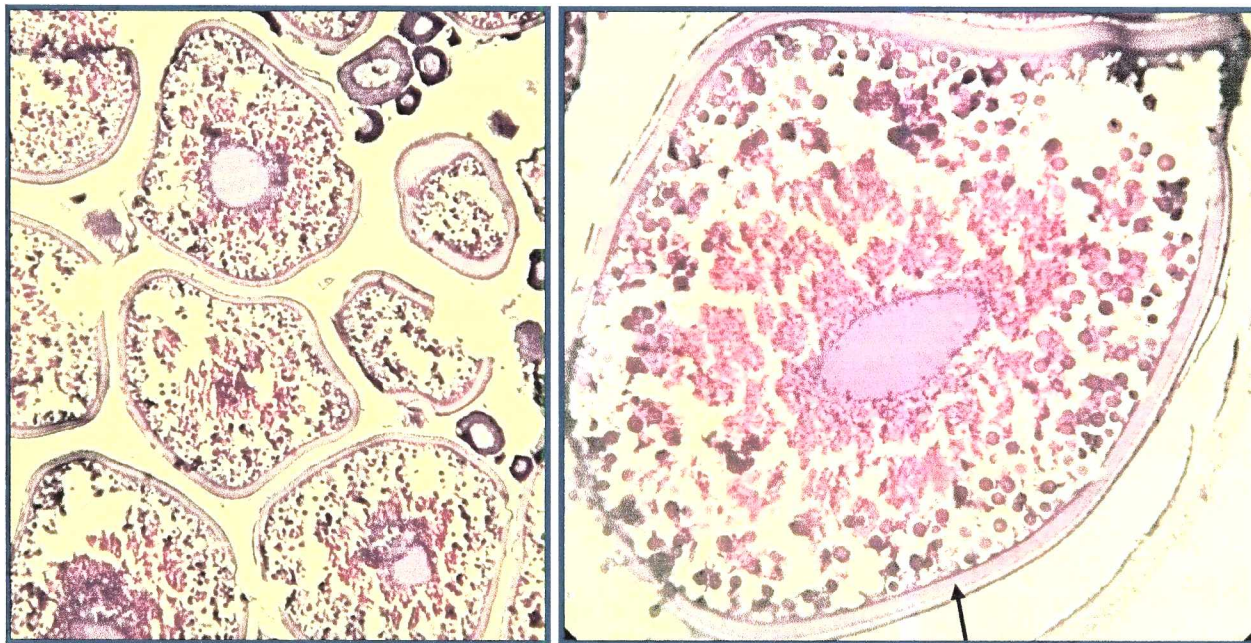
Lokalitet	Skadar_žuti	Skadar_bijeli
<b>Rijeke slivnog područja Skadarskog jezera</b>		
Morača	+	-
Zeta	+	-
Virštica	+	-
<b>Basen Jezera</b>		
Virpazar	+	+
Vranjina	+	+
Plavnica	+	-
Krnjica	+	+
Raduš	+	+
Vaškaut	+	+
Bobovište	+	+
Karučki zaliv	+	-
Malo Blato (Bobija)	+	+
Rijeka Crnojevića	+	-

#### 4.3.4. ANALIZA REPRODUKTIVNOG CIKLUSA

##### 4.3.4.1. ANALIZA REPRODUKTIVNOG CIKLUSA POPULACIJE SKADAR\_BIJELI

Istraživanje je obuhvatilo praćenje cikličnih promjena na gonadama jedinki populacije Skadar\_bijeli. Polni ciklus je jednogodišnji. Ovarijume ove populacije karakteriše grupno sinhroni tip organizacije i sazrijevanja, što se jasno uočava i na histološkim preparatima. Naime, na preparatima svih faza ovarijalnog ciklusa registrovane su najviše dvije generacije oocita i to: dominantna generacija (mrijestit će se u tekućoj godini) predstavljena grupacijom istovjetnih oocita i malobrojnija generacija jajnih ćelija koje se nalaze na nižim razvojnim stadijumima (mrijestit će se naredne godine) i sporadično su raspoređene. Polaganje ikre dešava se po jednovremenom modelu pri niskim temperaturama do 15°C. Vizuelnom opservacijom gonada i histološkom analizom presjeka ovarijuma Skadar\_bijelog dobijeni su sledeći rezultati:

1. Makroskopskim pregledom gonada u jesenjem periodu (novembar mjesec) konstatovano je da se nalaze u III stadijumu zrelosti. Ovarijumi su intenzivno žute boje i ispunjavaju veći dio trbušne duplje. Krvni sudovi su jasno uočljivi. Zrnca ikre su krupna i mogu se međusobno odvajati. Histološka analiza je pokazala da se oocite nalaze u vitelogenom stadijumu (Slika 32 i 33).

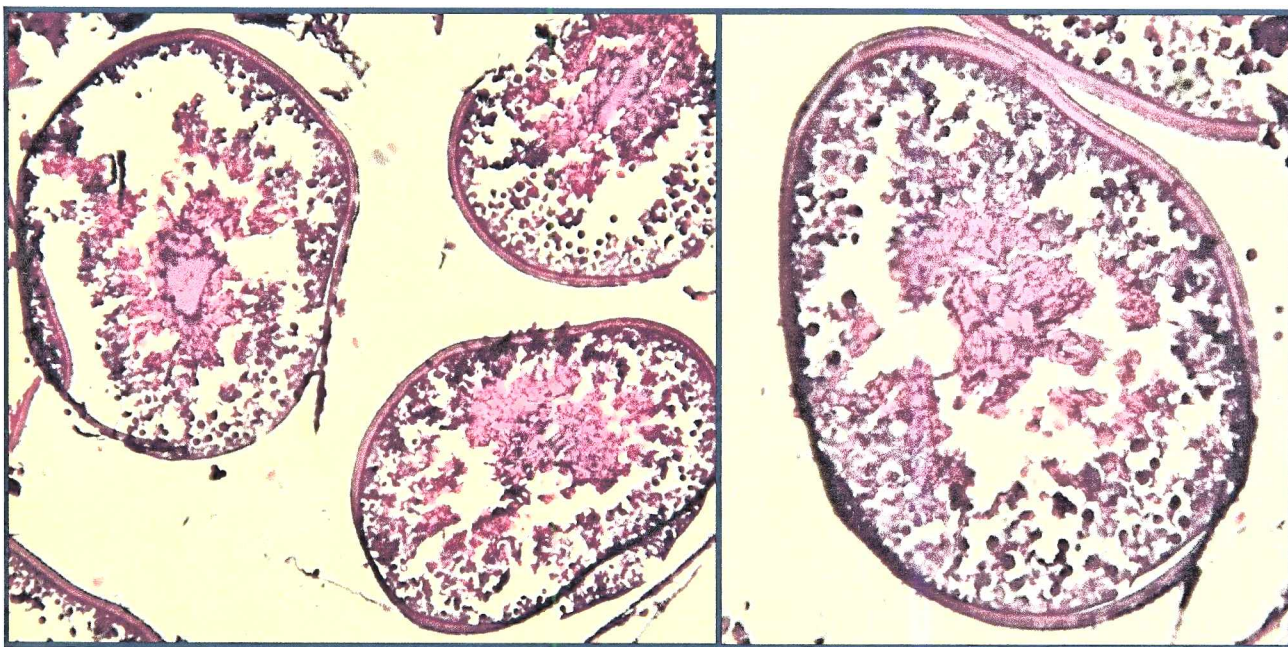


**Slika 32.** (slika lijevo) Poprečni presjek ovarijuma jedinki populacije Skadar\_bijeli. Ovarijum se nalazi u III stadijumu zrelosti sa oocitama u vitelogenom stadijumu. H&E bojenje. **Slika 33.** (slika desno). Oocita u vitelogenom stadijumu. Uočava se nagomilavanje žumančanih granula od centralnog ka perifernom dijelu citoplazme. Jasno je uočljiva i *zona radiata* (strelicom označena). H&E bojenje



Nukleus je centralno postavljen i ovalnog je oblika. Nukleolusi su raspoređeni po obodu nukleusa. Jasno su vidljivi i kortikalni alveoli na periferiji citoplazme. Konstatovano je i nagomilavanje žumančanih granula oko nukleusa. Uporedo sa rastom oocita povećava se broj i veličina ovih granula. U ovoj fazi jasno se uočava i *zona radiata* debljine 15µm između folikularnog omotača i membrane oocite.

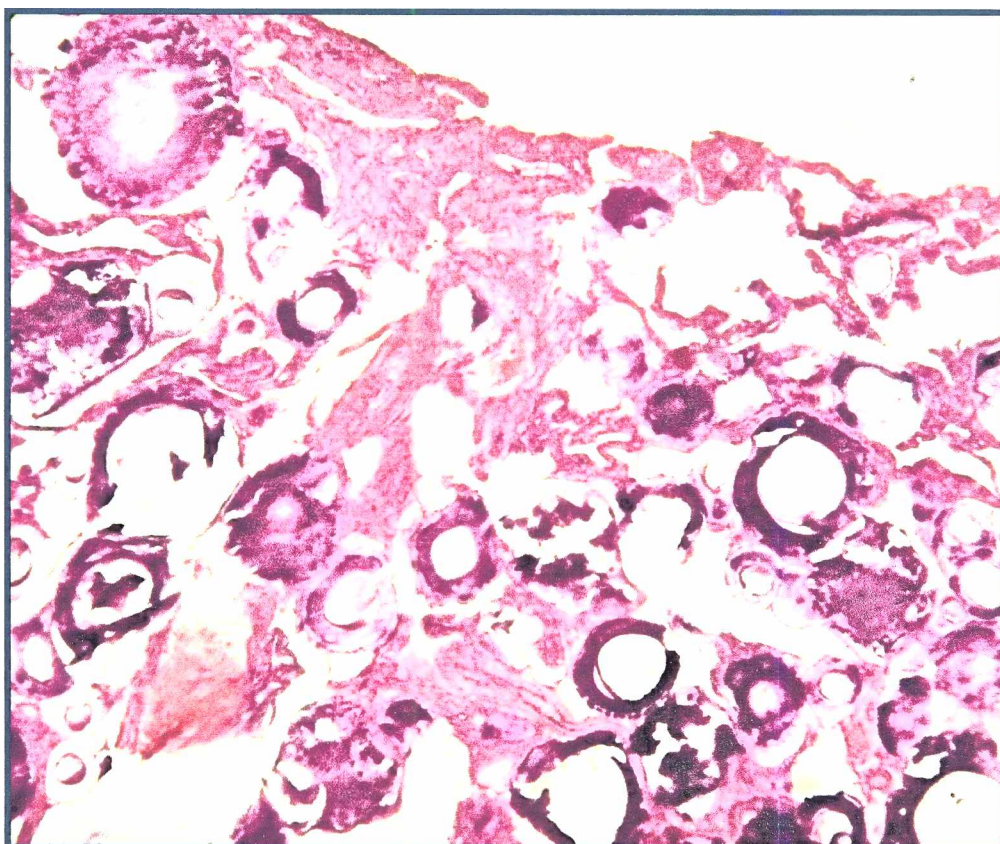
2. U zimskom peridu (januar mjesec) ovarijumi su narandžasto žute boje, maksimalnih razmjera i ispunjavaju najveći dio trbušne duplje. Nalaze se u IV stadijumu zrelosti koji označava period prije mrijesta (**Slika 34**). Zrnca ikre su dostigla svoje maksimalne dimenzije i zrelost, lako se mogu međusobno separirati. Sa ovakvim obilježjima ikra je spremna za polaganje. Mikroskopska analiza je takođe pokazala da su oocite kompletno morfološki izdiferencirane i da su dostigle stadijum potpune zrelosti (**Slika 35**). Unutrašnjost im je ispunjena žumančanim materijalom koji se za vrijeme fiksacije steže što čini pripremu histoloških preparata teškom, a samim tim i vizuelizaciju njihovog unutrašnjeg sadržaja. Dimenzije *zona radiate* sa izraženim mikrovilima kreću se od 20-25 µm.



**Slika 34.** Poprečni presjek ovarijuma jedinke populacije Skadar\_bijeli. Ovarijum se nalazi u IV stadijumu zrelosti sa oocitama u fazi zrelosti. H&E bojenje

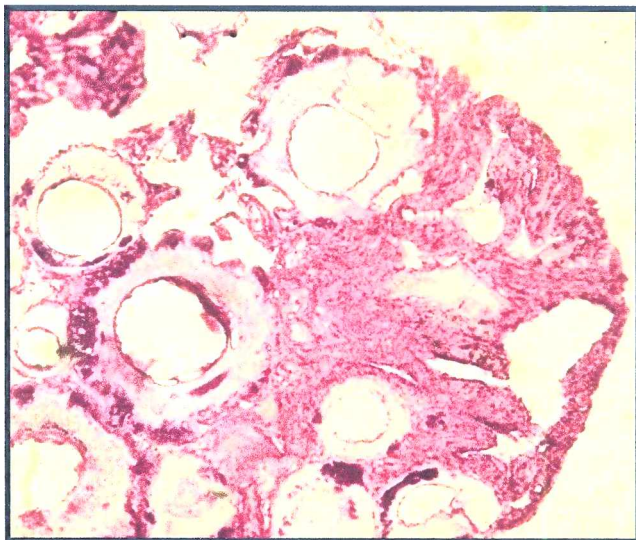
**Slika 35.** (slika desno) Oocita u fazi zrelosti. Unutrašnjost oocite je ispunjena žumančanim granulama. H&E bojenje.

3. Mrijest je konstatovan krajem februara. Gonade se nalaze u V stadijumu zrelosti. Kod jedinki sakupljenim u ovom periodu na osnovu fenotipskog izgleda moguće je razlikovati pol. Naime, na mužjacima je konstatovano prisustvo svadbenog ruha u vidu mrijesnih krvžica koje se nalaze gotovo po čitavom tijelu. Najizraženije krvžice konstatovane su na dorzalnoj strani glavenog i trupnog dijela tijela, kao i po leđnom i analnom peraju. Sjemenicu su ispunjeni velikim brojem spermatozoida, a pri lakom dodiru mužjaka po abdomenu konstatuje se isticanje mliječi. Sakupljenim ženjkama trbuh je bio mek na dodiru, ovarijumi sive boje i mlohavi. Gotova sva ikra je ovulirana, jedino se sporadično mogu uočiti zrnca neizbačene ikre koja su bijele boje. Potvrdu da je mrijest završen daje i analiza histološkog presjeka jajnika (Slika 36). Na preparatima se uočava veliki broj praznih folikula koji ukazuju da je faza mrijesta obavljena. Osim njih uočava se i obnavljanje germinativnog epitela ovarijuma kao i nekoliko atretičnih folikula koji se nalaze u fazi resorpcije i degeneracije (Slika 37 i 38).

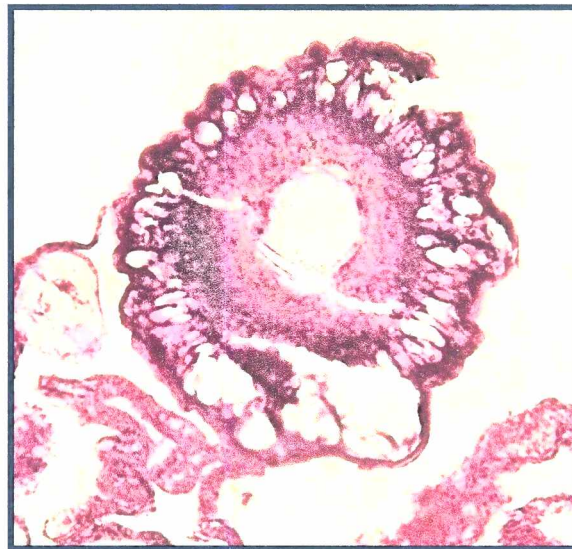


**Slika 36.** Poprečni presjek ovarijuma jedinke Skadar\_bijeli. Slika prikazuje izgled ovarijuma nakon završenog mrijesta. Uočavaju se prazni folikuli i germinativni epitel ovarijuma u fazi obnove. H&E bojenje.





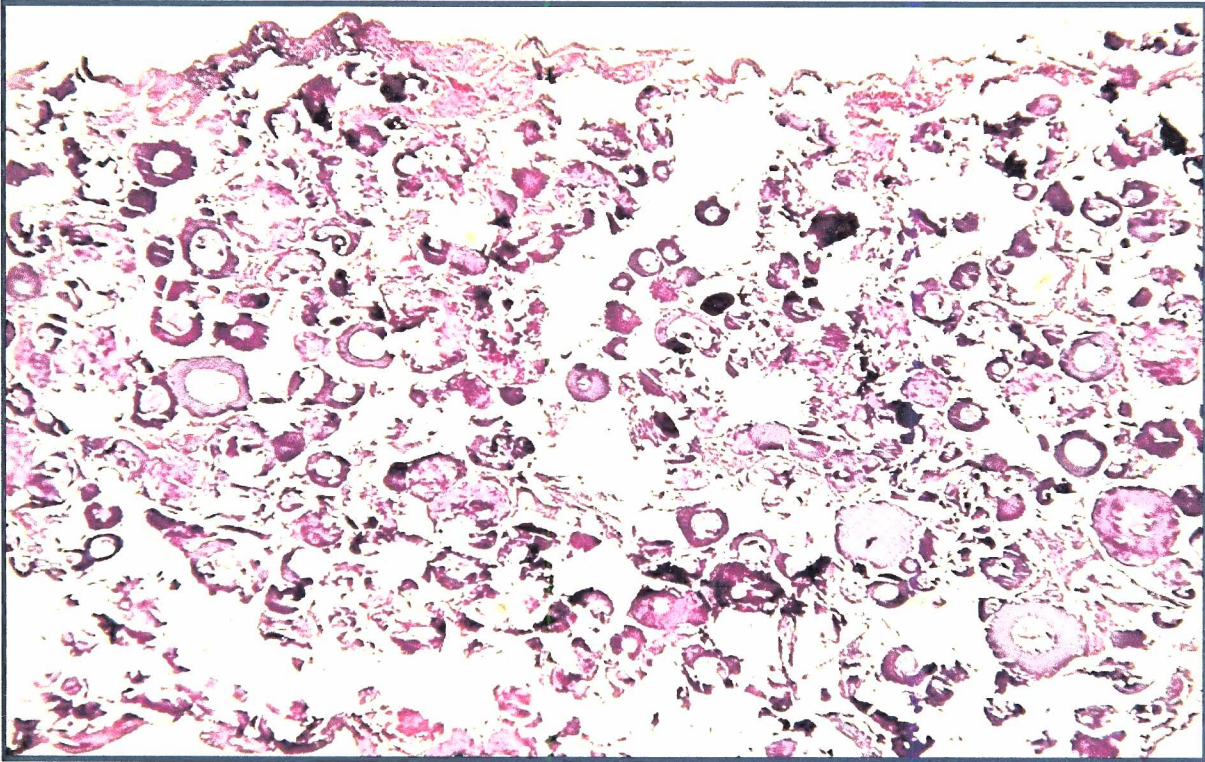
**Slika 37.** Postovulatorni folikuli u ovarijumu jedinke iz populacije Skadar\_bijeli nakon završenog mrijesta. Osim toga jasno se uočava i obnavljanje germinativnog epitela ovarijuma. H&E bojenje.



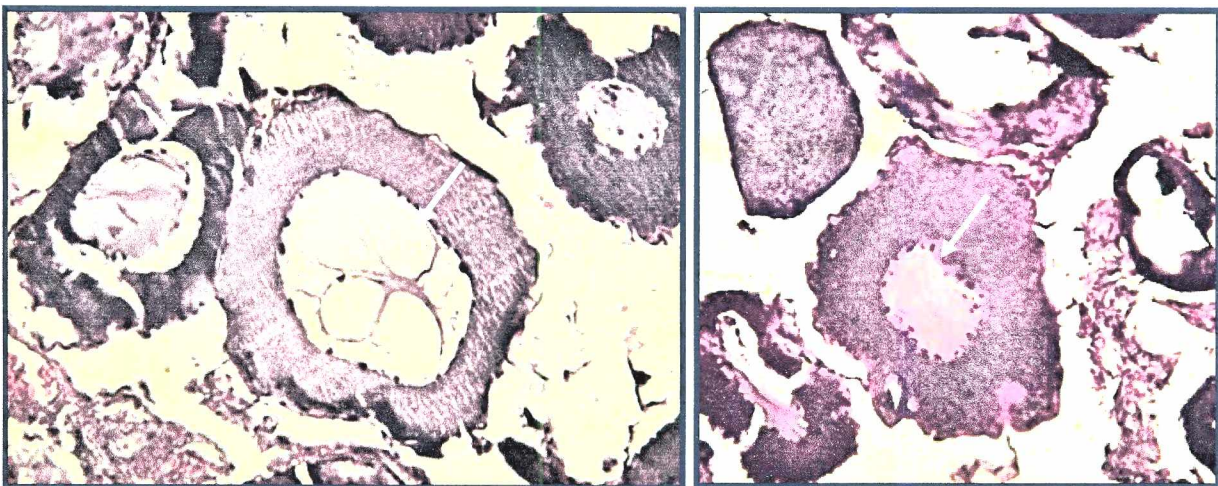
**Slika 38.** Atretični folikul u fazi degeneracije i resorpcije. H&E bojenje.

4. U proljećnjem periodu (april mjesec) makroskopskom analizom je utvrđeno da se gonade nalaze u VI stepenu zrelosti. Konstatovano je da se ovarijum nalazi u fazi obnove nakon završenog mrijesta. Sive je boje, a ponegdje se uočavaju sitne tamne tačkice koje ukazuju na proces resorpcije zrelih neizbačenih oocita. Mikroskopskom analizom uočava se veliki broj postovulatornih folikula (**Slika 39**). Oni predstavljaju folikularne membrane u vidu izobličenih i deformisanih struktura bez ćelija u lumenu. Osim njih konstatovani su i atretični folikuli i pojedinačne oocite u previtelogenoj fazi (perinukleolarni stadijum) koje se pripremaju za mrijest sledeće godine (**Slika 40**). Registrovane perinukleolarne oocite su sferičnog ili višeugaonog oblika okružene tankim folikularnim omotačem. Sadrže centralno postavljeno jedro i oko njega citoplazmu koja se uniformno i tamnije boji. Nukleolusi su raspoređeni po unutrašnjem obodu omotača nukleusa. Prisustvo oocita u previtelogenoj fazi ukazuju na početak sazrijevanja oocita. Ovakvo stanje gonada opisuje se kao prelazak iz stadijuma VI u stadijum II. Poslije završene resorpcije neizbačenih jaja i praznih folikula jajnici prelaze u stadijum II jer stadijum I karakteriše mlade, polno nezrele jedinke.





**Slika 39.** Poprečni presjek ovarijuma jedinke Skadar\_bijeli. Ovarijum je u VI stepenu zrelosti. Na slici su uočljivi postovulatorni folikuli i oocyte koje se pripremaju za mrijest u narednoj godini. H&E bojenje.



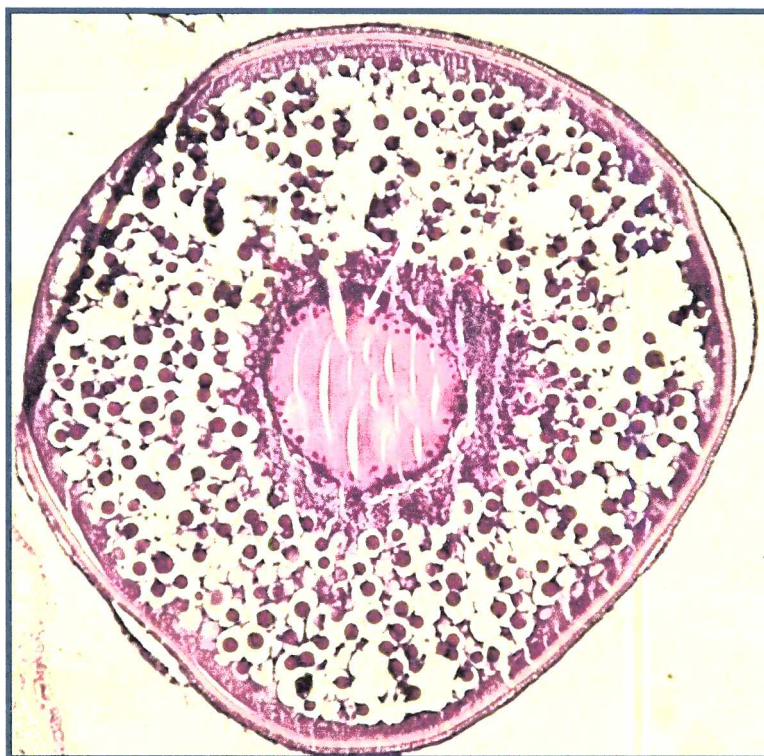
**Slika 40.** Oocyte u perinukleolarnom stadijumu koje se pripremaju za mrijest u narednoj godini. Na slikama se uočava centralno postavljeno jedro čijim su obodom raspoređeni nukleolusi (strelicom označeno) i homogeno obojena citoplazma. H&E bojenje.



#### 4.3.4.2. ANALIZA REPRODUKTIVNOG CIKLUSA POPULACIJE SKADAR\_ŽUTI

Analiza reproduktivnog ciklusa populacije Skadar\_žuti obuhvatila je makroskopsko praćenje cikličkih promjena na gonadama kao i histološku analizu sukcesivnih promjena na oocitama. Polni ciklus je jednogodišnji, a ovarijume ove populacije karakteriše grupno sinhroni tip organizacije i sazrijevanja. Polaganje ikre se dešava jednom u toku godine po jednovremenom modelu. Ovim analizama dobijeni su sledeći rezultati:

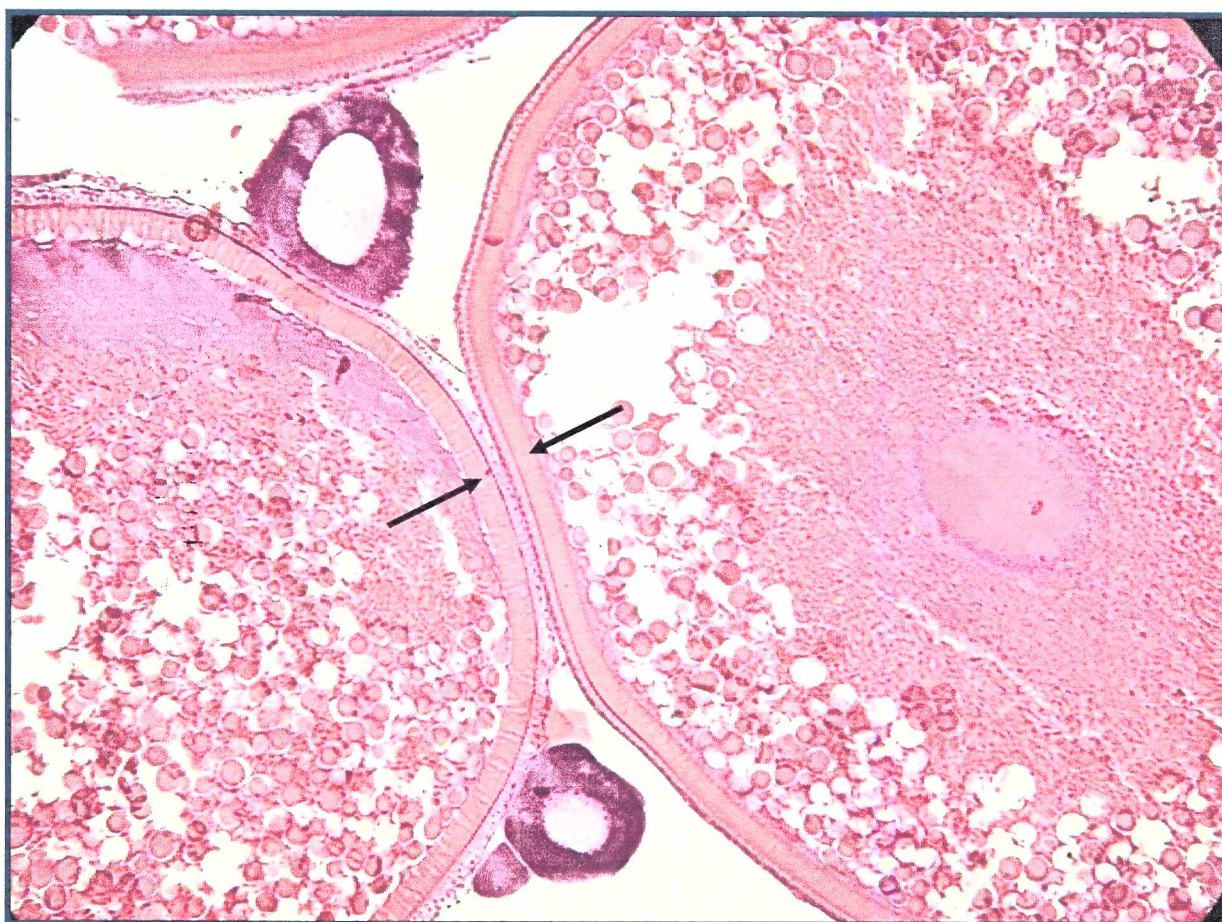
1. Vizuelnom ocjenom gonada u jesenjem periodu (novembar mesec) konstatovano je da se nalaze na početku III stadijumu zrelosti. Ovarijumi su svijetlo žute boje sa jasno uočljivim krvnim sudom. Zrnca ikre su vidljiva i očigledno u fazi sazrijevanja. Histološka analiza je pokazala da se oocite nalaze u vitelogenoj fazi i to u stadijumu kortikalnih alveola (**Slika 41**). U oocitama se uočava nukleus centralno postavljen i veliki broj nukleolusa raspoređenih duž unutrašnjeg oboda membrane nukleusa. Citoplazma je gotovo u potpunosti ispunjena kortikalnim alveolima jedino se uz samu spoljašnju ivicu membrane nukleusa uočavaju početni procesi akumulacije žumančanih granula koji potvrđuju da se oocite pripremaju za vitelogeni stadijum koji slijedi. U ovoj fazi jasno je uočljiv acelularni sloj *zona radiata* dimenzija 7,5  $\mu\text{m}$ .



**Slika 41.** Oocita u stadijumu kortikalnih alveola jedinke populacije Skadar\_žuti. Na slici je jasno uočljiv centralno postavljen nukleus, po obodu raspoređeni nukleolusi (strelicom označeno) i citoplazma ispunjena kortikalnim alveolima. H&E bojenje.



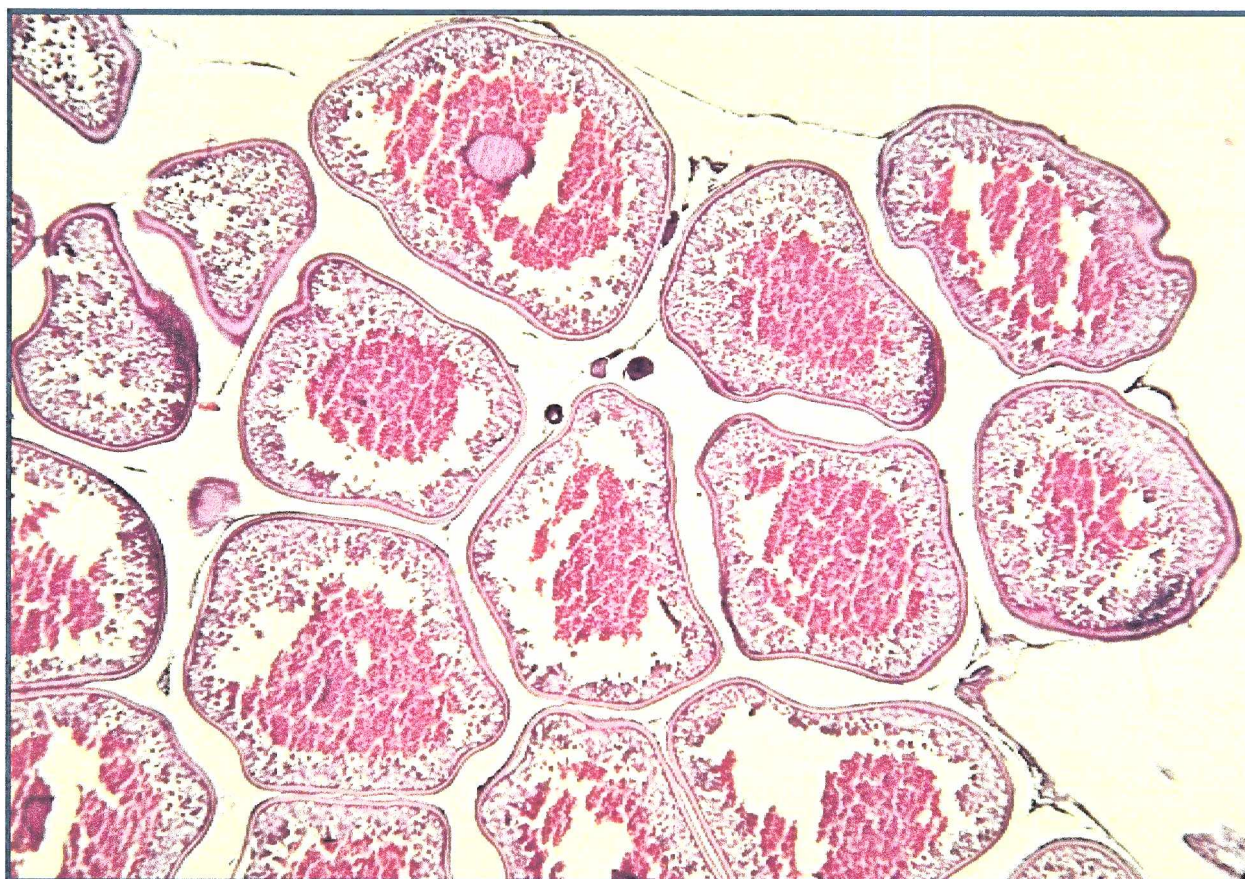
2. U zimskom peridu (kraj decembra i početak januara) makroskopskom analizom utvrđeno je da se gonade nalaze u IV stadijumu zrelosti. Mikroskopska analiza je pokazala da se oocyte nalaze u vitelogenom stadijumu (**Slika 42**). Oko nukleusa se konstatuje intenzivno grupisanje žumančanih granula sa tendencijom širenja ka periferiji. Međutim periferni dio citolazme je i dalje ispunjen kortikalnim alveolima. Sloj *zona radiata* postaje još izraženiji u odnosu na prethodnu fazu sa dimenzijama od 12,5-15  $\mu\text{m}$



**Slika 42.** Oocita u vitelogenom stadijumu jedinke populacije Skadar\_žuti. Na slici se zapaža grupisanje žumančanih granula oko nukleusa kao i jasno uočljivi sloj *zona radiata* (strelicom označen). Konstatuju se i oocite u fazi primarnog rasta. H&E bojenje.



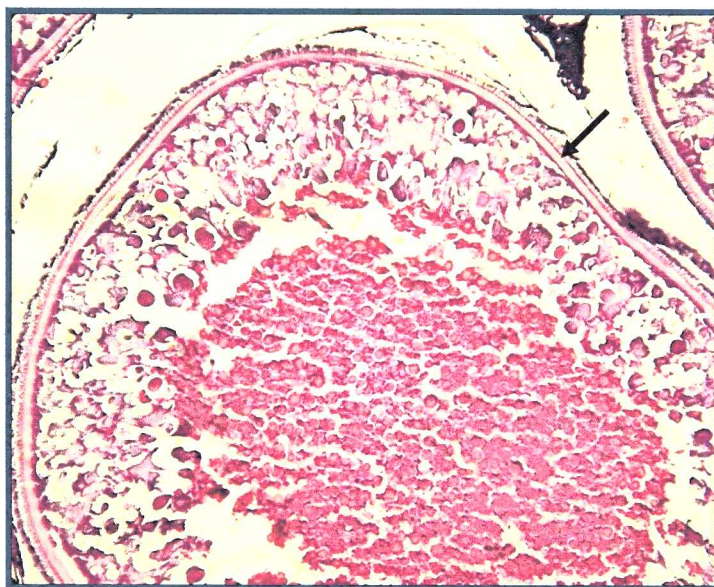
3. Makroskopskim pregledom gonada u februaru mjesecu nađeno je da se ovarijumi nalaze u IV stepenu zrelosti. Zauzimaju veći dio trbušne duplje, intenzivno su žute su boje sa zrcima ikre koja se lako odvajaju. Mikroskopskim pregledom utvrđeno je da su oocyte dostigle fazu zrelosti i nalaze se u stadijumu zrelosti (Slika 43). Zbog kontinuiranog procesa akumulacije žumančanih granula one ispunjavaju najveći dio prostora oko nukleusa. Mali dio citoplazme neposredno ispod ooleme ispunjen je kortikalnim alveolima. Osim *zone radiata* (dimenzija 15-20  $\mu\text{m}$ ) mogu se jasno razlikovati i dva sloja koji čine spoljašnji folikularni omotač: sloj teka ćelije i sloj granulosa ćelija (Slika 44 i 45).



**Slika 43.** Poprečni presjek ovarijuma populacije Skadar\_žuti u IV stadijumu zrelosti. Na slici se uočava da se oocyte nalaze u fazi zrelosti. H&E bojenje.



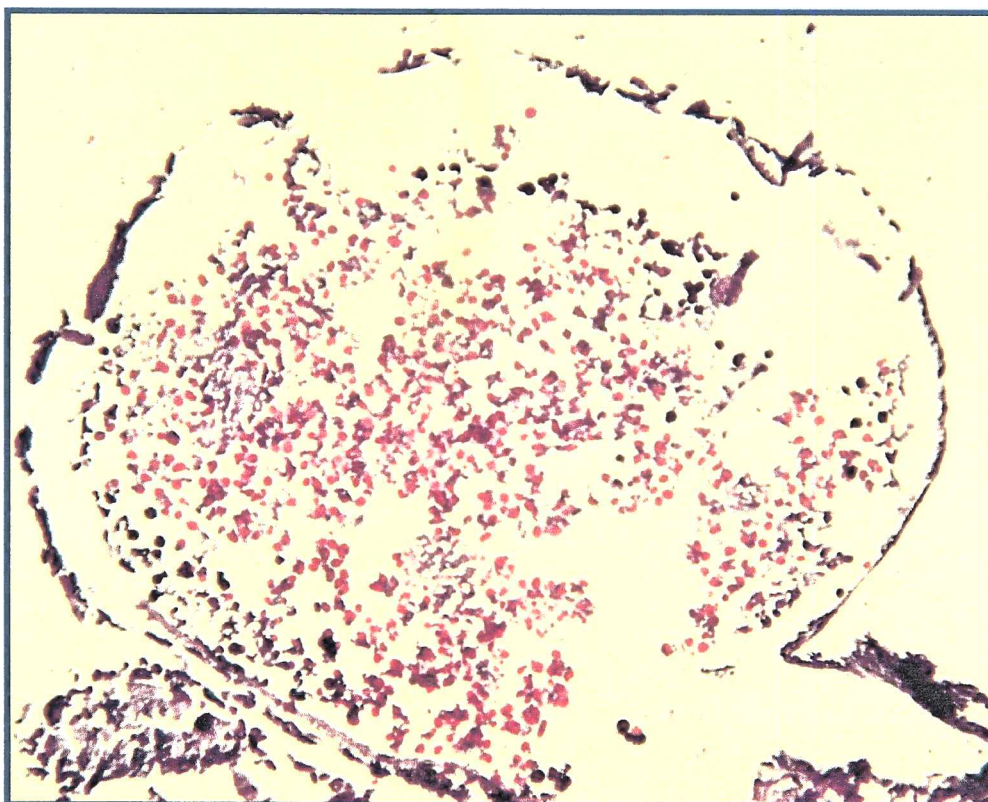
**Slika 44.** Oocita u fazi zrelosti kod populacije Skadar\_žuti. Na slici se uočava da žumančani materijal ispunjava najveći dio oocite. Periferni dio citoplazme ispunjen je kortikalnim alveolima. H&E bojenje.



**Slika 45.** Oocita u fazi zrelosti kod populacije Skadr\_žuti. Na slici se jasno uočava *zona radiata* sa izraženim mikrovilima (strelicom označeno) H&E bojenje



4. Period mrijesta utvrđen je u proljećnom periodu krajem aprila mjeseca i tokom maja mjeseca. Sredinom aprila gonade se nalaze u V stadijumu zrelosti. Na osnovu fenotipskog izgleda jedinki u ovom periodu moguće je razlikovati pol. Na mužjacima se zapaža prisustvo svadbenog ruha u vidu mrijesnih krvžica po skoro čitavom tijelu. Najizraženije krvžice nađene su na operkulumu, dorzalnoj strani trupnog dijela tijela, kao i po leđnom i analnom peraju. Osim krvžica na perajima i operkulumu su jasno uočljive crvene pjegice. Pri lakom dodiru abdomena ženki i mužjaka konstatuje se isticanje polnih ćelija (ikre odnosno mliječi). Mikroskopska analiza je takođe pokazala da su oocite kompletno morfološki izdiferencirane i da su dostigle stadijum potpune zrelosti. Žumančani sadržaj u potpunosti ispunjava unutrašnjost oocite (Slika 46). Nukleus nije uočljiv.



**Slika 46.** Oocita u stadijumu potpune zrelosti kod jedinki populacije Skadar\_žuti. Žumančani materijal u potpunosti ispunjava unutrašnjost oocite. H&E bojenje.



## 5. DISKUSIJA

Rod *Rutilus* Rafinesque, 1820 odlikuje široko Evroazijsko rasprostranjenje i bogat specijski diverzitet. 16 vrsta iz ovog roda naseljavaju područje Evrope (Kottelat & Freyhoff, 2007). Brojni autori (Bianco *et al.*, 2004; Kottelat & Freyhoff, 2007; Marić & Radujković, 2009) su saglasni sa činjenicom da je sistematika i taksonomija evropskih taksona roda *Rutilus* i dalje daleko od rasvjetljavanja, a naročito kada su u pitanju endemični taksoni Balkanskog poluostrva sa posebnim naglaskom na taksonomski problem u tri najveća prirodna jezera na Balkanskom poluostrvu (Prespansko, Ohridsko i Skadarsko jezero).

Predmet ovog rada bili su predstavnici roda *Rutilus* iz Skadarskog jezera. Na osnovu istraživanja novijeg datuma (Glöer & Pešić, 2007) Skadarsko jezero se svrstava u grupu starih Balkanskih jezera zajedno sa Prespanskim i Ohridskim jezerom. Ova jezera istovremeno predstavljaju model starih jezera Evrope, za koje se pretpostavlja da ih karakteriše visok stepen endemizma, naročito Prespansko i Ohridsko jezero. Sistem starih jezera koja u kontinuitetu postoje stotinama, hiljadama ili čak million godina (Elmer *et al.*, 2009) prepoznati su kao centri biodiverziteta i endemizma u kojima je duga izolacija u vremenu uzrokovala alopatrične specijacije i bogat specijski diverzitet. Budući da se Prespansko i Ohridsko jezero geografski nalaze u neposrednoj blizini, dijele zajedničko porijeklo i posjeduju hidrološku povezanost veća je vjerovatnoća da posjeduju zajedničke elemente faune međusobom kao i sa susjednim sistemima nego da imaju u potpunosti različitu endemičnu faunu (Albrecht *et al.*, 2008). S obzirom na pripadnost jezera istoj grupi i hidrografske povezanosti Ohridskog i Skadarskog jezera, a u cilju razrješenja problema koji postoje vezano za taksoni iz roda *Rutilus* nametnula se potreba za komparativnim istraživanjem ovih elemenata biodiverziteta koji naseljavaju tri najznačajnija slatkovodna ekosistema na Balkanu. Glavni problem koji se javljao prilikom ranijih istraživanja starih jezera jeste da je većina istraživača pažnju fokusirala isključivo na pojedinačne sisteme, dok je ekosistemima koji se nalaze u neposrednom okruženju posvećivana mnogo manja pažnja, što je neminovno dovelo i do pogrešne procjene stepena endemizma u starim jezerima (Albrecht & Wilke, 2008). Iz tih razloga komparativno istraživanje bioloških jedinica starih jezera osim u taksonomskim razmatranjima ima posebnu važnost i u utvrđivanju stepena endemizma i određivanju kriterijuma ugroženosti. Poseban značaj podataka o elementima biodiverziteta sa ovih prostora je upravo u tome što se smatra da je Balkansko poluostrvo,

pored Apeninskog i Iberijskog, bio refugijalni centar, a time i centar diverziteta za vrijeme glacijacija (Hewitt, 2004).

Evaluacija postojećih literaturnih podataka ukazuje na taksonomsku kompleksnost, neujednačene načine obrade materijala i prezentacije rezultata što ukazuje na nesistematična i nesveobuhvatna proučavanja vrsta iz roda *Rutilus* na njihovim prirodnim staništima. Nerazriješeno taksonomsko pitanje, konfuzna nomenklatura, nedostatak podataka o biologiji, ekologiji i genetici ovih taksona nameću potrebu da se na samom početku ove diskusije kaže nešto više o istorijskim i trenutno aktuelnim taksonomskim dilemama kao i raspravama o broju vrsta u svakom od ovih vodenih ekosistema. Zato je na samom početku diskusije neophodno ukazati i osvrnuti se na raspoložive literaturne podatke koji su se bavili ovom problematikom i vjerovatno doprinijeli i postojanju dilema. Osim toga neophodno je napraviti i rekapitulaciju nomenklature taksona koji su analizirani kroz ovo istraživanje da bi se ukazalo na već iznešeni problem nomenklaturne nejasnoće i dao odgovor na pitanje zašto su kroz ovaj rad ispitivani taksoni vođeni pod nazivima populacija lokaliteta sa kojih potiču, a ne pod uobičajenim za jedno ovakvo istraživanje latinskim imenima.

Prvi opis taksona koji naseljavaju Prespansko i Ohridsko jezero datira iz 1924. godine. Naime, u knjizi "Pisces Macedonie" Karaman (1924) opisuje dva varijeteta vrste *Leucos aula* i to: *Leucos aula* v. *ohridana* za Ohridsko i *Leucos aula* v. *prespensis* za Prespansko jezero. Bez detaljnije analize pomenutog literaturnog izvora jasno je da su u ovim jezerima prisutne dva varijeteta vrste *Leucos aula*. Međutim, prikazani opisi i dijagnoze po kojima su odvojena ova dva taksona značajno odstupaju od kriterijuma koji su korišteni prilikom opisa ostalih vrsta u pomenutom radu. Kao prvo, po navedenim dijagnostičkim karakteristikama ova dva varijeteta se značajno razlikuju u važnim taksonomskim karakteristikama, a takav nivo razlika kod vrsta iz istog roda (*Chondostoma*) upotrijebljen je za dodjeljivanje sistematskog nivoa višeg od varijeteta (najmanje podvrste), pa se nameće pitanje zašto je ovim taksonima dodijeljen baš nivo varijeteta, a ne nivo vrste ili makar podvrste? Među navedenim karakteristikama naročito treba istaći razlike u važnim merističkim karakteristikama i to broju krljušti u bočnoj liniji, broju granatih zraka u leđnom i analnom peraju kao i broju kičmenih pršljenova. Autorima koji su radili na proučavanjima ovih vrsta kasnije veliki problem je vjerovatno predstavljala i činjenica da Karaman ne navodi srednje vrijednosti proučavanih morfoloških karaktera. Takođe, iznenađujuća je činjenica da Karaman ne navodi nikakva variranja važnih taksonomskih karaktera. Tako na primjer konstatna

vrijednost karaktera broj krljušti u bočnoj liniji (44) navedena je za ohridski varijetet, dok su konstatne vrijednosti karaktera broj kičmenih pršljena navedena za ohridski (42) i za prespanski varijetet (38). Postoje dva moguća zaključka koja se javljaju kao rezultat analize Karamanovog djela, a to su: 1. da je dijagnoza varijeteta iz Ohridskog jezera bila pogrešno napisana ili 2. da Ohridsko jezero naseljava takson sa dijagnostičkim karakteristikama značajno različitih od taksona koji su do sada opisivani iz roda *Rutilus* sa ovog područja. Ovim zaključcima ide u prilog i činjenica da nekoliko godina nakon Karamanovog opisa ohridskog varijeteta Vladykov & Petit (1930) na uzorcima iz albanskog dijela Ohridskog jezera (blizu Pogradeca) opisuju novi natio *R. aula* natio *karamani* kada se i prvi put u nomenklaturi za ohridsku populaciju pojavljuje naziv *karamani*. Opis prikazan u pomenutom radu se značajno razlikuje od Karamanovog opisa ohridske populacije, a istovremeno njihov opis se malo razlikuje od opisa varijeteta iz susjednih voda (na primjer Prespansko jezero). Mora se istaći i to da Vladykov & Petit (1930) prvi uviđaju nepodudarnost između dijagnoze i komentara u samom tekstu Karamanovog djela i ističu da je u dijagnozi napravljena štamparska greška. Iz tog perioda Karaman (1933) za područje Skadarskog jezera navodi postojanje jedne vrste i to *Leucos aula* bez navođenja varijeteta ili podvrsta.

Prvu detaljnu komparativnu analizu uzoraka iz Ohridskog, Skadarskog jezera i Belog Drima daje Šorić (1983). Upoređivanjem sopstvenih istraživanja sa dotadašnjim podacima autora koji su se bavili proučavanjem ovih vrsta iz voda tadašnje Jugoslavije i Italije (Karaman, 1924; Arbocco, 1966; Vuković & Vuković, 1968; Vuković i Ivanović, 1970; Tortonese, 1970; Ivanović, 1973) autor zaključuje da se i pored postojanja razlika u morfometrijskim i merističkim karakteristikama ispitivane populacije u Ohrid-Drim-Skadar sistemu nisu izdiferencirale na intraspecijskom nivou (koeficijent intraspecijske diferencijacije ispod 1.28) i da ovaj sistem naseljava samo jedna vrsta i to *R. rubilio*. Isti autor 1990. godine upoređujući podatke iz literature (Karaman, 1924; Ivanović, 1973) i sopstvene rezultate o populacijama vrste *R. rubilio* iz Ohrid-Drim-Skadar sistema sa populacijama ove vrste u italijanskim vodama zaključuje da Ohrid-Drim-Skadar sistem naseljava podvrsta *R. r. rubilio*. U pomenutom radu autori iznose da varijetet iz Ohridskog jezera opisan od strane Karamana (1924) nije registrovan. Postoji mogućnost da ovaj zaključak ne bi bio donesen da je autor uzeo u razmatranje u međuvremenu objavljene nove podatke. Naime, Marić (1989) upoređujući morfološke karakteristike taksona nađenih u Skadarskom jezeru sa dostupnim literaturnim podacima vrši reviziju vrsta roda *Rutilus* za područje zapadnog Balkanskog poluostrva. U radu su osim dijagnoza i opisa vrsta *R. basak* Heckel i *R. prespensis* (Karaman, 1924) detaljno opisane i po dvije podvrste svake od navedenih vrsta i to: *R.*

*basak basak* (Heckel) za područje Dalmacije i Hercegovine (Imotski region i Neretvu), *R. basak ohridanus* (Karaman, 1924) za Skadarsko i Ohridsko jezero, *R. prespensis prespensis* (Karaman, 1924) za Prespansko jezero i *R. prespensis vukovicii* za Skadarsko i Šasko jezero. Zaključak ove revizije je da Ohridsko i Prespansko jezero naseljava posebna vrsta, dok za Skadarsko jezero autor navodi postojanje dvije vrste. Jedna od njih osim basena Skadarskog naseljava i Ohridsko jezero i dodjeljuje joj status podvrste (*R. basak ohridanus*), dok druga osim Skadarskog naseljava i Prespansko jezero. Autor ističe da se populacija iz Skadarskog jezera znatno razlikuje od populacije iz Prespanskog jezera i opisuje je kao novu podvrstu - *R. prespensis vukovici* ssp. nov.

Eliminacija nivoa podvrste iz nomenklature taksona iz roda *Rutilus* i uvođenje sistema binomijalne nomenklature prvi put je data od strane Kottelat (1997). Za područje Skadarskog i Ohridskog jezera autor navodi postojanje dvije vrste i to *R. ohridanus* (Karaman, 1924) i *R. karamani* Fowler (1977), dok za područje Prespanskog jezera navodi *R. prespensis* (Karaman, 1924). Na ovom mjestu neophodno je osvrnuti se i na objašnjenje koje autor na osnovu literaturnih podataka iznosi o opravdanosti navođenja ovih taksona kao validnih vrsta. Natio opisan od strane Vladykov & Petit (1930) za Ohridsko jezero, Fowler, 1977 podiže na nivo podvrste *R. rubella karamani*, a Kottelat (1977) je proglašava validnom vrstom. Podvrstu *R. prespensis vukovici* opisanu za Skadarsko jezero od strane Marić (1989) stavlja u sinonime vrste *R. karamani* i areal distribucije joj proširuje i na Ohridsko jezero. Vrstu *R. ohridanus* proglašava validnom za Ohridsko i Skadarsko jezero prihvatajući mišljenje Bianco (1986) i Economidis (1991) da je *R. ohridanus* validna vrsta, a ne prihvatajući mišljenje Marića da je takson iz Skadarskog i Ohridskog jezera podvrsta vrste *R. basak*. Treba naglasiti i to da se u sinonimici za *R. ohridanus* navodi samo varijet opisan od strane Karamana (1924) za Ohridsko jezero (*Leucos aula* v. *ohridana*). Upoređujući podatke o broju taksona datih od strane Marić (1989) i Kottelat (1997) primjećuje se neslaganje i o broju taksona prisutnih u Ohridskom jezeru budući da Kottelat (1997) ističe postojanje dva taksona, Marić (1989) samo jednog, dok se podudaraju podaci o prisustvu dva taksona u Skadarskom i jednog taksona u Prespanskom jezeru.

U literaturnim podacima novijeg datuma nastavljen je trend neslaganja o taksonomiji i broju prisutnih taksona u Prespanskom, Ohridskom i Skadarskom jezeru tako da u ovom trenutku postoje dvije aktuelne taksonomske šeme roda *Rutilus* najznačajnijih Balkanskih jezera. Po šemi predloženoj od strane Kottelat & Freyhof (2007) i Bogutskay & Iliadou (2006) Prespansko jezero naseljava jedna vrsta i to *R. prespensis* koja ujedno nosi i status endema,



dok Ohridsko i Skadarsko jezero naseljavaju dvije vrste i to *R. ohridanus* i *R. karamani*. Druga šema po Marić & Radujković (2009) pokazuje da područja Prespanskog, Ohridskog i Skadarskog jezera naseljava jedna vrsta i to *R. ohridanus*. Istovremeno, autori zaključuju da u Skadarskom jezeru egzistira još jedna vrsta koju Marić (2010) opisuje pod imenom *R. albus* kao novu za nauku i dodjeljuje joj status endema.

Sumiranjem dostupnih literaturnih podataka zaključuje se da je jedan od razloga rasprava koje traju približno čitav vijek o vrstama roda *Rutilus* koje naseljavaju najznačajnija Balkanska jezera činjenica da su podaci i rezultati istraživanja o ovim taksonima u prošlosti prezentirani na nejednak način što je njihovu komparaciju činilo teškom tj. gotovo nemogućom. Tako na primjer u starijim radovima autori često ne iznose srednje vrijednosti pojedinih parametara, način brojanja žbica u perajima takođe je neusaglašen o čemu svjedoče i neslaganja u dostupnim literaturnim podacima.

Imajući u vidu sve naprijed iznešene istorijske i trenutno aktuelne literaturne podatke, taksonomske nedoumice i otvoreno pitanje endemizma ovih vrsta kao i činjenice da do sada nije postojalo istraživanje koje bi ih detaljno ispitivalo na njihovim prirodnim staništima sprovedena je ova vrsta sveobuhvatnog istraživanja. U ovom radu predstavljeno istraživanje daje prve komparativne rezultate bazirane na morfološkim i genetičkim analizama vrsta iz roda *Rutilus* koje naseljavaju najveća jezera Balkanskog poluostrva (Prespansko, Ohridsko i Skadarsko jezero) s posebnim akcentom na taksone iz Skadarskog jezera.

Samo rešenje pitanja taksonomsko sistematskog statusa pojedinih populacija i nije od ključnog značaja ako se tom prilikom ne iskristališu i ne utvrde najvažniji sistematski karakteri koji će poslužiti njihovoj diferencijaciji. Postojanje određenih morfoloških razlika među populacijama roda *Rutilus* iz Prespanskog, Ohridskog i Skadarskog jezera je naglašeno od strane Marić & Radujković (2009) ali ne i razdvajanje na nivou vrsta već na nivou podvrsta. Segment istraživanja koji se odnosio na morfološku analizu obezbijedio je set relevantnih podataka za utvrđivanje sličnosti i razlika ispitivanih taksona. Rezultati deskriptivne statistike za 28 ispitivanih morfoloških karaktera među četiri *a priori* definisane populacije (Prespa, Ohrid, Skadar\_bijeli i Skadar\_žuti) pokazali su visoko statistički značajne razlike ( $P < 0,001$ ) za 4 meristička i 16 morfometrijskih karaktera, dok su statistički značajne razlike ( $P < 0,05$ ) registrovane za tri morfometrijska (predočni prostor, preventralno rastojanje i dužinu ventralnog peraja) kao i jedan meristički karakter (broj branchiospina u spoljašnjem nizu). U parovima testirane populacije pokazuju statistički značajne razlike za po minimum

dva od tri testirana meristička karaktera. U karakteru broj krljušti u bočnoj liniji svi parovi pokazali su statistički značajne razlike.

Zbog veoma izražene sličnosti u izgledu spoljašnje morfologije tijela jedinki sve četiri izučavane populacije i sa naizgled očiglednim razlikama u obliku tijela (naročito kod jedinki populacije Prespanskog jezera) urađena je multivarijantna analiza i to analiza glavnih komponenti. Ona služi pojednostavljenju analiziranih podataka, svodeći promjenljive na mali broj glavnih komponenti koji predstavljaju linearne kombinacije tih promjenljivih i na najefikasniji način opisuju "dimenzije" ukupnog variranja analiziranih karakteristika. U pogledu varijabilnosti analiziranog kombinovanog seta morfometrijskih i merističkih karaktera adultnih jedinki četiri *a priori* definisane populacije, populacija Skadar\_bijeli se jasno odvajaju u zasebnu grupu u odnosu na ostale tri populacije čiji predstavnici međusobno pokazuju nizak nivo morfološke diferencijacije. Meristički karakteri I.I (broj krljušti u bočnoj liniji) i P (broj žbica u pektoralnom peraju) imaju najveću diskriminacionu moć i jasno odvajaju populaciju Skadar\_bijeli od ostale tri. Ovi rezultati se poklapaju sa rezultatima rada Marić & Radujković (2009) koji na osnovu morfoloških podataka populacije iz Prespanskog, Ohridskog i Skadarskog jezera svrstavaju u jednu vrstu, dok populaciju koju je u ovom radu navedena kao Skadar\_bijeli svrstavaju u posebnu vrstu. Osim toga, ovi rezultati donekle i objašnjavaju činjenicu zašto Karaman (1924) taksone iz Prespanskog i Ohridskog opisuje na nivou varijeteta, a ne kao zasebne vrste (čak ni podvrste) kao i činjenicu da Marić (1989) takson iz Skadarskog jezera opisuje na nivou podvrste (*R. prespensis vukovicii*).

U analizi morfometrijskih podataka kroz čitav set originalnih podataka utvrđen je jasno izražen alometrijski efekat. Koncept alometrije ima različita značenja i postoje različiti metodološki pristupi njene analize. Međutim svim značenjima je zajedničko da se varijabilnost pojedinačnih karakteristika morfološke cjeline, upoređuje sa promjenama njene opšte veličine. Alometrijske analize uključuju odnose veličine i oblika morfoloških cjelina na različitim nivoima poređenja, što je direktno u vezi sa različitim izvorima varijabilnosti morfometrijskih karaktera i njihove međusobne veze (Cock 1966). Kombinacija genetičkih i faktora sredine određuje procese rasta indukujući variranja morfometrijskih karaktera (Cock, 1966). Za utvrđivanje karaktera koji su presudni u determinisanje oblika tijela neophodno je utvrditi njihovu nezavisnost od dužine. Iz tog razloga predloženi su različiti modeli za uklanjanje efekta veličine prije ili nakon multivarijantne analize. Komponenta veličine je veoma značajna za utvrđivanje diferencijacija među ispitivanim grupama, i nije poželjno

automatski je isključiti iz analize, međutim pravilnije je razmatrati kao nezavisan dio analize. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da se kod populacije Skadar\_žuti, a naročito kod prespanske populacije sa povećanjem veličine tijela mijenja i njegov obik. Ovo naročito dolazi do izražaja u karakteru maksimalna visina tijela. Ova analiza je objasnila potencijalni razlog svrstavanja *Rutilus*-a iz Prespanskog jezera u zasebnu vrstu jer fenotipski posmatrano oblik tijela može ukazati na razlike sa ostalim ispitivanim taksonima. Međutim, budući da je i nakon transformacije podataka karakter maksimalna visina tijela i dalje pokazao značajnu vrijednost alometrijskog koeficijenta zaključeno je da je drugačija geometrija tijela jedinki iz Prespanskog jezera i Skadar\_žuti populacije posledica izraženog alometrijskog rasta. Za jedinke Skadar\_žuti kasnije je to i potvrđeno u segmentu rada koji se odnosio na ekološku analizu.

U cilju preciznije ocjene nivoa diferencijacija između dva simpatrička taksona iz Skadarskog jezera morfometrijski i meristički karakteri su zasebno podvrgnuti multivarijantnoj analizi budući da se ovi karakteri razlikuju statistički i biološki. Uprkos naizgled sličnoj spoljašnjoj morfologiji izuzimajući jasnu razliku u fenotipskoj obojenosti tijela ova dva taksona se ipak razlikuju po važnim karakteristikama koji imaju ulogu u određivanju oblika tijela kao i u merističkim karakteristikama. Utvrđene su statistički visoko značajne ( $P < 0,001$ ) razlike za 5 morfometrijskih (maksimalna visina tijela, postorbitalno rastojanje, dužina pektoralnog peraja, dužina leđnog peraja i dužina repnog stabla) i tri meristička karaktera (broj krljušti u bočnoj liniji, broj žbica u leđnom i pektoralnom peraju). Karakteri I.I (broj krljušti u bočnoj liniji), P (broj žbica u pektoralnom peraju) i D (broj žbica u leđnom peraju) kao i IA (dužina analnog peraja) ne pokazuju preklapanje vrijednosti i time dokazuju važno dijagnostičko svojstvo u diferencijaciji simpatričkih taksona iz Skadarskog jezera. Morfološki karakteri koji pokazuju najveće variranje kod vrsta iz roda *Rutilus* su visina tijela i veličina peraja (Strangenberg, 1947; Köhler, 1992). Kod ispitivanih simpatričkih taksona iz Skadarskog jezera uočena su ova dva "pravila" i na osnovu njih su utvrđene značajne razlike odnosno jasna razdvajanja po ovim karakteristikama. Tako se maksimalna visina tijela pokazala kao karakter u kojem ne pokazuju preklapanje i koji je značajan za određivanje oblika tijela budući da pri istim dužinama tijela jedinke taksona Skadar\_žuti odlikuju se većom visinom i time značajno drugačijim oblikom tijela u odnosu na jedinke taksona Skadar\_bijeli. Dužina pektoralnog i dužina leđnog peraja uz maksimalnu visinu tijela predstavljaju karaktere koji doprinose jasnoj diskriminaciji ove dvije populacije po prvoj PC osi, a ranije je istaknuto da simpatrički taksoni iz Skadarskog jezera ne pokazuju preklapanje ni u karakteru dužina analnog peraja. Osim navedenih karaktera, izgledu tijela

dobrinose i karakteri pD (predorzalno rastojanje), lmx (dužina maksile) i lmd (dužina mandibule) kao i Oh (horizontalni dijametar oka). Jedinke populacije Skadar\_bijeli odlikuju se većim predorzalnim rastojanjem i poludonjim ustima, a takođe i krupnijim okom. Oblik tijela karakterističan za populaciju Skadar\_bijeli po kome se razdvaja od populacije Skadar\_žuti je niže tijelo, veće predorzalno rastojanje, krupnije oko i poludonja usta. Očigledna razlika u morfološkim obilježjima koja opisuju geometrijski oblik tijela ove dvije simpatričke populacije sugerišu i na razlike u habitatima koje naseljavaju. Nisko tijelo i šira peraja su opisana kao karakteristike za habitate koji se odlikuju bržim protokom vode (Köhler, 1992). Na osnovu terenskog istraživanja koje je izvedeno za potrebe ovog rada zaključeno je da populacija Skadar\_bijeli ima svoje mikroh abitare. Naime, rezultati analize diferenciranosti u pogledu distribucije pokazali su da je Skadar\_bijeli isključivo jezerska forma i nije registrovan u rijekama basena Skadarskog jezera. Takođe, primijećeno je da na lokalitetima na kojima je registrovan preferira habitate za čistijom i hladnijom vodom budući da je nađen uglavnom u blizini izvora (na lokalitetima Virpazar i Bobija), kao i u sublakustričnim izvorima (Raduš). Osim toga može se naći i na većim dubinama u odnosu na populaciju Skadar\_žuti. Populacija Skadar\_žuti pokazuje priličnu plastičnost u pogledu habitata. U pogledu distribucije rezultati istraživanja pokazuju da naseljava kako rijeke basena (Morača, Zeta, Virštica) tako i samo jezero. Razlike u obliku tijela utvrđene morfološkom analizom potvrdu nalaze i u različitim modelima rasta dobijenih utvrđivanjem regresionog koeficijenta na osnovu dužinsko težinskih odnosa. Uopšteno je pravilo da vrijednost regresionog koeficijenta  $b=3$  ukazuje na simetrični ili izometrijski rast dok vrijednosti različite od 3 ukazuju na alometrijski rast. U ovom istraživanju registrovana su oba modela rasta. Naime, vrijednost regresionog koeficijenta koja ukazuje na izometrijski rast registrovana je kod Skadar\_bijelog, dok je kod Skadar\_žutog registrovan alometrijski rast. S obzirom da na dužinsko težinske odnose utiču brojni faktori uključujući sezonu, habitat, pol, zrelost gonada, ishrana i ispunjenost crijevnog trakta za utvrđivanje modela rasta upotrijebljena su dva seta podataka. Tako je analiza dužinsko težinskog rasta kada su uzete u obzir težine tijela bez unutrašnjih organa pokazala da Skadar\_bijeli karakteriše izometrijski model rasta dok je dodatna analiza rasta na osnovu težina sa unutrašnjim organima pokazala model alometrijskog rasta. Iz ove dvije analize se može zaključiti da alometrijski efekat kod ovog taksona dolazi do izražaja sa polnom zrelošću. Rezultati analize rasta taksona Skadar\_žuti pokazuju da se on isključivo odlikuje alometrijskim rastom. Budući da je registrovana vrijednost regresionog koeficijenta veća od 3 ukazuje na pozitivnu alometriju što govori da je rast težine veći od porasta dužine. Ovakav alometrijski



rast zabilježen je kod mnogih predstavnika porodice *Cyprinidae* kao npr. *Carassius auratus* (Marić, 1998), *Leuciscus cephalus*, *Rhodeus amarus* (Koutrakis & Tsikliras, 2003), dok je izometrijski registrovan kod *Alburnoides bipunctatus* (Treer *et al.*, 1988).

Rezultati morfološke analize se poklapaju sa rezultatima dobijenim sekvenciranjem fragmenta nDNK. Naime, među četiri ispitivane populacije dobijena su dva haplotipa kod kojih su registrovana dva polimorfna mjesta nastala kao posledica tranzicija. Jedan haplotip je registrovan isključivo kod jedinki populacije Skadar\_bijeli, dok drugi haplotip nije pokazao niti populacionu niti prostornu fiksiranost već je registrovan kod jedinki populacija Prespa, Ohrid i Skadar\_žuti. Haplotip nađen kod populacije Skadar\_bijeli razlikuje se od drugog nađenog haplotipa po dva polimorfna mjesta. Naime ovaj haplotip posjeduje tranziciju (C→T) na 117 mjestu i tranziciju (G→A) na 238 mjestu. Iako se ovi rezultati donekle poklapaju sa rezultatima morfološke analize ne mogu se uzeti kao pouzdan marker za donošenje nikakvih zaključaka bez uzimanja u obzir rezultata relevantnijih i informativnijih genetičkih markera (mtDNK i mikrosatelitnih lokusa).

U okviru ovog istraživanja za cyt *b* mtDNK roda *Rutilus* kreiran je i novi set prajmera. Sekvenciranjem cyt *b* dobijen je pregled haplotipova koji je omogućio detekciju genetičkog diverziteta ispitivanih populacija na područjima sa kojih potiču. Istovremeno treba naglasiti da ovi rezultati predstavljaju prvi komparativni opis genetičkog diverziteta populacija iz roda *Rutilus* najznačajnijih Balkanskih jezera. Unutar sekvence dobijenog cyt *b* dužine 560 bp, pronađeno je 16 je polimorfnih mjesta, što je u prosjeku jedno polimorfno mjesto na svakih 35 nukleotida. Rezultati analize dobijenih sekvenci pokazuju da su u sekvencama cyt *b* registrovane isključivo tačkaste mutacije nastale kao posledica supstitucija. Insercije i delecije nisu registrovane. Do pojave tačkastih mutacija najčešće dolazi usled pogrešnog sparivanja nukleotida prilikom replikacije i koje nastaju najčešće zbog nukleotidne depurinizacije i/ili deaminacije (Alberts *et al.*, 2002). Pogrešno spareni nukleotidi mogu biti uklonjeni pomoću posebnog mehanizma koji vrši popravku na molekulu DNK, na taj način što prepoznaje i reže pogrešno sparene nukleotide prilikom polimerizacije i ligacije novog lanca (Lewin, 2000). Mehanizmi za uklanjanje grešaka su efikasni ali nisu stoprocentno sigurni, tako da se neke mutacije mogu fiksirati i dalje prenositi na potomstvo, što dovodi do genetskih promjena u narednim generacijama (Snoj, 1997). U rezultatima ovog istraživanja među registrovanim supstitucijama nađene su tranzicije i transverzije u odnosu 13:3. Kod većine kičmenjaka na intraspecijskom nivou tranzicije prevlađuju nad transverzijama (10 do 32 puta), kako u kodirajućim tako i u nekodirajućim regionima mtDNA (Moritz *et al.*,

1987). Snoj (1997) ističe, da manji stepen divergencije između dvije nukleotidne sekvence utiče na to da je mogućnost dešavanja više od jedne supstitucije na određenom mjestu gotovo zanemarljiva tako da i broj uočenih supstitucija između te dvije sekvence trebalo bi da koincidira sa stvarnim brojem supstitucija. U suprotnom slučaju, kada postoji velika razlika između sekvenci, uočeni broj razlika je manji od stvarnog, što je posledica višestrukih supstitucija na istom mjestu. Transverzije  $G \leftrightarrow C$  su veoma rijetke među supstitucijama, i zbog toga imaju veoma veliki značaj pri utvrđivanju srodnosti između različitih sekvenci. Zbog težine nastanka takvih supstitucija, najvjerovatnije da je većina takvih zamjena posledica višestrukih supstitucija na istom mjestu (npr.  $G \rightarrow A \rightarrow C$ ). Takav tip supstitucije javlja se u rezultatima ovog rada na 3 polimorfna mjesta (552, 555 i 557 mjesto, transverzija  $G \rightarrow C$ ,  $C \rightarrow G$ ).

Pripadnost haplotipova određenim linijama kao i broj mutacionih koraka između njih određen je nakon konstruisanja mreže haplotipova (Slika 21). Haplotip PYI je zauzeo ancestralan položaj u odnosu na sve ostale haplotipove. Ovaj haplotip nije pokazao populacionu niti prostornu fiksiranost već je pronađen kod jedinki iz Prespanskog i Skadarskog jezera (populacija Skadar\_žuti). Budući da je zauzeo centralnu poziciju u okviru formirane mreže zaključuje se da od njega vode porijeklo i haplotipovi ostalih populacija (Ohrid i Skadar\_bijeli). Posmatranjem kladograma u cjelini zapaža se jasno odvajanje klade populacije iz Ohridskog jezera i populacije Skadar\_bijeli. Haplotipovi koji formiraju kladu Skadar\_bijeli odlikuju se zajedničkom tranzicijom na poziciji 122 i to  $A \rightarrow G$ . U okviru ove klade registrovana su četiri haplotipa i nemaju zajedničkih haplotipova sa ostalim populacijama (izuzev ancestralnog haplotipa). Interesantno je naglasiti da se haplotip WI odlikuje prisustvom i dvije transverzije i to na pozicijama 552 ( $G \rightarrow C$ ) i 557 ( $C \rightarrow G$ ). Za ovaj haplotip je ujedno utvrđena i maksimalna udaljenost kako od centralnog haplotipa (3 mutaciona koraka) tako i od haplotipa (YI) koji pripada jedinkama populacije Skadar\_žuti (5 mutacionih koraka). Tri haplotipa koji formiraju kladu Ohridske populacije mogu se okarakteristati zajedničkom tranzicijom na mjestu 392 ( $A \rightarrow G$ ). Osim nje kod jednog haplotipa je registrovana transverzija na 552 poziciji ( $G \rightarrow C$ ). U okviru ove klade najudaljeniji haplotipovi (OI i OIII) od ancestralnog haplotipa su za po dva mutaciona koraka. Isti broj mutacionih koraka udaljenosti od ancestralnog haplotipa registrovan je kod kod haplotipova populacija Prespa (PIII) i Skadar\_žuti (YI) međutim ove dvije populacije ne formiraju posebnu kladu već se naprotiv grupišu u jednu. Za jedinke populacije Skadar\_žuti registrovana su osim ancestralnog haplotipa još 6 novih haplotipova. Polimorfna mjesta u

okviru ovih haplotipova su nastala kao posledica tranzicija, s izuzetkom haplotipa YI koji posjeduje i transverziju na poziciji 555 (G→C). Ovaj haplotip je i najudaljeniji haplotip nađen u populaciji Skadar\_žuti od ancestralnog haplotipa i to za 2 mutaciona koraka. Težina i značaj transverzija potvrđen je kod ovog haplotipa, kao i kod haplotipa WI, jer je upravo između ova dva haplotipa registrovana i maksimalna udaljenost u broju mutacionih koraka. 2 mutaciona koraka udaljenosti od centralnog haplotipa registrovano je kod haplotipa PIII koji je jedini haplotip među jedinkama iz populacije Prespa koji se odlikuje transverzijom na 555 poziciji (G→C). Ostali haplotipovi (PI i PII) posjeduju jednu do dvije tranzicije. Budući da haplotipovi koji pripadaju kladi Skadar\_bijeli i populacije Ohrid pokazuju i populacionu i geografsku (prostornu) fiksiranost može se zaključiti i da su autohtoni za područja Skadarskog i Ohridskog jezera.

Sumiranjem rezultata analize mtDNK zaključuje se da se među četiri *a priori* definisane populacije (Prespa, Ohrid, Skadar\_bijeli i Skadar\_žuti) mogu izdvojiti tri grupe i to Skadar\_bijeli, Ohrid i zajednička grupa populacija Prespa i Skadar\_žuti. Međutim vrlo je teško dodijeliti taksonomski status nekoj od ispitivanih populacija samo na osnovu ove analize naročito jer se nailazi na neslaganje sa morfološkom analizom već je neophodno ove podatke komparirati sa podacima dobijenim na osnovu analize mikrosatelitnih lokusa. Autori Zhang & Hewitt (2003) ističu da je upotreba isključivo mtDNK kao genetskog markera nosi sa sobom rizik od netačnih zaključaka i nemogućnosti precizne rekonstrukcije filogenije. Kako se mtDNK nasleđuje kao jedan gen treba biti posebno oprezan pri donošenju zaključaka na nivou čitavih populacija, jer se evolucija pojedinačnog gena može razlikovati od evolutivnog prosjeka cijelog genoma. Ono što je izvjesno jeste da su i ovi rezultati nedvosmisleno potvrdili postojanje simpatričkih taksona u Skadarskom jezeru.

U ovom radu predstavljeni su i prvi mikrosatelitni lokusi izolovani iz genomske biblioteke predstavnika roda *Rutilus*. Protokolom kloniranja mikrosatelitnih lokusa iz jedinke žutog *Rutilus*-a iz Skadarskog jezera *de novo* je izolovano 8 tetranukleotidnih mikrosatelita, od kojih su se 5 pokazali visoko polimorfni i upotrijebljeni su za dalje analize. Kod svakog od ispitivanih lokusa konstatovan je veliki broj alela koji se kreće u rasponu od 8-22 alela. Veliki broj alela po lokusu ukazuje na visok potencijal fenotipske plastičnosti ispitivanih taksona i negira mogućnost iznošenja pogrešnih procjena koja bi se mogla nametnuti pitanjem o broju analiziranih lokusa. Fenotipska plastičnost predstavlja stepen variranja genotipova u odnosu na različite promjene spoljašnje sredine (Thompson, 1991). Uzimajući u obzir mišljenje Kalinowski (2002) koji ističe da lokusi sa većim brojem alela daju preciznije procjene

genetičkih distanci naročito kada su pitanju srodni taksoni rezultati dobijeni ovom disertacijom se mogu uzeti kao pouzdani pokazatelji u procjeni genetičkih distanci među analiziranim taksonima.

S ciljem utvrđivanja nivoa genetičke diferenciranosti među ispitivanim populacijama upotrijebljene su vrijednosti parametara  $F_{ST}$  i  $R_{ST}$ . Dobijeni rezultati su pokazali postojanje razlika u vrijednostima ovih parametara. Postojanje značajnih razlika u vrijednostima ovih široko upotrebljivanih parametara u studijama u kojima se koriste mikrosatelitni markeri je uobičajeno i naglašava se da je od posebnog interesa za studiju upotrijebiti oba parametra paralelno i uporediti im vrijednosti (Lugon-Moulin *et al.*, 1999). Ispitivane populacije pokazale su nizak, ali statistički značajan nivo genetičke diferencijiranosti o čemu svjedoče izračunate vrijednosti parametara  $F_{ST}$  i  $R_{ST}$ . Najniža  $F_{ST}$  vrijednost je registrovana između Prespanske populacije i populacije Skadar\_žuti i iznosi 0,015, dok je najveća zabilježena vrijednost 0,07 registrovana između Prespa i Ohrid populacija. Na osnovu skale date od strane Hartl & Clark (1997) za interpretaciju rezultata dobijenih za parametar  $F_{ST}$ , vrijednost dobijena između populacija iz Ohridskog i Prespanskog jezera ukazuje da između njih postoji umjeren nivo genetičke diferencijacije. Isti nivo diferencijacije utvrđen je između populacija Skadar\_bijeli i populacije iz Prespanskog jezera. Rezultati  $R$  statistike takođe pokazuju najnižu  $R_{ST}$  vrijednost između Prespanske populacije i Skadar\_žuti populacije koja iznosi 0,095. Najveća registrovana  $R_{ST}$  vrijednost zabilježena je između populacija Skadar\_bijeli i populacije iz Ohridskog jezera i iznosi 0,591. Ovako visoka vrijednost između ove dvije populacije ukazuje na njihov međusobni najveći stepen izolacije. Potvrda jake divergencije ove dvije populacije dobijena je i rezultatima faktorijalne korespondentne analize na osnovu koje je pokazano da ne postoji preklapanje klastera genotipova populacija Ohrid i Skadar\_bijeli. Ista analiza je pokazala jasno odvajanje populacije Skadar\_bijeli od ostalih populacija. Dok registrovana vrijednost  $F_{ST}$  parametara između simpatričkih taksona iz Skadarskog jezera pokazuje vrijednost umjerenog značaja (0,04), vrijednost  $R_{ST}$  parametra (0,47) pokazuje jaku diferencijaciju između njih i ukazuje na međusobnu izolovanost. Osim toga značajnoj strukturiranosti skadarskih taksona doprinosi i veliki broj privatnih alela među njima ( $N=21$ ). Broj privatnih alela koji je registrovan za sve četiri populacije iznosi 10, pri čemu je od tih deset 5 privatnih za populaciju Skadar\_bijeli, dok populacija iz Ohridskog jezera nema ni jedan registrovani privatni alel. Rezultati utvrđivanja generalne strukture ispitivanih populacija kao i stvarnog broja populacija među četiri *a priori* definisane populacije pokazali su postojanje tri genetička klastera i to: Skadar\_bijeli, Ohrid i zajednički klaster jedinki populacija Skadar\_žuti i Prespa. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima



dobijenim na osnovu kladograma i polaznom pretpostavkom da među ispitivanim populacijama zapravo ne postoje četiri vrste. Prethodno istaknutim rezultatima analiza koji pokazuju jasnu morfološku i genetičku diferenciranost skadarskih taksona odgovaraju i podaci dobijeni na osnovu preciznog molekularnog sata čija je procjena divergencije simpatričkih skadarskih taksona na preko 500,000 godina što ukazuje na vremenski okvir dešavanja specijacije u Pleistocenu. Početkom pleistocena došlo je do formiranja ledenog pokrivača koji se povremeno širio (glacijacija) ili povlačio (interglacijacija). U poslednjih 0,9 miliona godina, glacijacije su se javljale u ciklusima od oko 100 000 godina. Danas je jasno da su ciklusi glacijacije i inerglacijacije u pleistocenu imali glavne evolucione posledice za mnoge savremene vrste koje su u više navrata mijenjale okvire distribucije u alopatrične glacijalne refugijume (Carstens & Knowles, 2007). Postoje i brojne filogeografske studije koje su u saglasnosti sa procesima izolacije i divergencije u refugijumima za vrijeme pleistocenske glacijacije (Hewitt, 2004).

Sumiranjem prethodno iznešenih rezultata morfološke i genetičke analize dolazi se do zaključka da vrste roda *Rutilus* iz starih Balkanskih jezera (Prespansko, Ohridsko i Skadarsko jezero) dijele zajednički ishodišni haplotip kao i kombinaciju morfoloških i genetičkih diferencijacija koje ne odgovaraju dosadašnjoj taksonomiji, a dovode u pitanje i model i stepen njihovog endemizma. Suma rezultata analize mtDNA i nDNA pokazuje veoma nizak nivo divergencije, blisku povezanost i daju nedvosmislene dokaze o protoku gena među ispitivanim populacijama. Evidentan protok gena može takođe biti posledica pleistocenskih dešavanja budući da postoje dokazi da su neke vrste sposobne da između refugijuma uspostave visok nivo protoka gena za vrijeme interglacijacija (Liepelt *et al.*, 2002). Međutim povezanost populacija koje se nalaze u refugijumima može imati značajne evolucione posledice. Visok nivo migracija može usporiti divergenciju i spriječiti specijaciju sa jedne strane, a opet sa druge strane protok gena između populacija može doprinijeti boljoj adaptaciji na klimatske promjene i olakšati održanje vrste. Tako na primjer aleli koji su bolje adaptirani novim uslovima mogu doprinijeti formiranju novih genetičkih kombinacija i time povećati adaptivni potencijal vrste (Liepelt *et al.*, 2002, Davis *et al.*, 2005). Ono što treba naglasiti je naizgled iznenađujući podatak da Prespansko i Skadarsko jezero imaju zajednički takson koji se razlikuje od taksona prisutnog u Ohridskom jezeru. Međutim, ovi rezultati potvrđuju ranije istaknuta mišljenja (Sanda, 2007; Marić *et al.*, 2007, Marková *et al.*, 2010) koja naglašavaju da nijedna ciprinidna vrsta nije endemična samo u Prespanskom ili Ohridskom jezeru već da se većina njih nalazi u Ohrid-Drim-Skadar sistemu. Osim toga razlike u sastavu faune Ohridskog i Prespanskog jezera kao i nizak nivo protoka gena

između ova dva jezera naglašeno je od strane nekih autora. Tako na primjer rezultati istraživanja Albrecht & Wilke (2008) ukazuju da postoji veoma mala čak i beznačajna razmjena komponenti faune između Ohridskog i njemu sestrinskog Prespanskog jezera, uprkos činjenici da najveću količinu vode Ohridsko jezero upravo dobija iz Prespanskog jezera. U ovom trenutku nameću se dva potencijalna modela koja objašnjavaju postojanje zajedničkog taksona za Skadarsko i Prespansko jezero. Zajedničko za oba modela je da je *R. prespensis* sekundarno naselio Skadarsko jezero i da predstavlja alohtonu vrstu. Prvi model se odnosi na to da su pleistocenska dešavanja prouzrokovala današnju distribuciju ovih taksona. Treba imati u vidu činjenicu da je hidrološka istorija starih jezera daleko od razrešavanja (Albrecht & Wilke, 2008), naročito za Prespansko jezero koje je glavni izvor vode Ohridskom jezeru posredstvom podzemnih tokova i koje ne posjeduje direktnu površinsku hidrografsku konekciju sa Ohrid-Drim-Skadar sistemom. U starijem pleistocenu ima velikih odstupanja od današnjeg izgleda obalskih linija. Takođe su velika odstupanja u odnosu na današnje stanje bila za vrijeme glacijacija, uključujući i ona u mlađem pleistocenu (virm), kada je usled povećanja kontinentalnih i planinskih lednika smanjena količina vode u okeanima i snižen nivo mora (Rabrenović *et al.*, 2003). Po Bianco (1990) u Ris i Wirm fazi doslo je do spajanja albanskih rijeka Drim i Vjoša. Na osnovu sadašnjeg izgleda hidrografske karte Albanije može se pretpostaviti da ako je Vjoša bila u kontaktu sa Drimom onda su i Škumbrin i Devol pripadale ovom sistemu budući sa pozicionirane između ove dvije rijeke. U skladu sa tim postoji mogućnost da je Škumbrin u nekom periodu bio otoka Prespanskog jezera. Postoje podaci dati od strane Dhora (2009) da Škumbrin naseljava neka vrsta iz roda *Rutilus*, kao i Vjošu dok ih na primjer nema u Mat rijeci (**Slika 2**). Međutim, s obzirom na problematiku vrsta iz ovog roda nemoguće je osloniti se samo na te podatke i na osnovu njih donositi zaključke o kojim se zapravo vrstama radi bez naknadnog istraživanja i komparacije sa rezultatima ovog rada. Drugi model je zasnovan na činjenici da na Skadarskom jezeru gnijezdi i boravi ugrožena vrsta kudravog pelikana *Pelecanus crispus* koji ima veliku koloniju upravo na Prespanskom jezeru. Podaci (per comm.) govore da je na Skadarskom jezeru registrovan prstenovani pelikan sa Prespanskog jezera. Takođe je poznato da kudravi pelikan u svojoj ishrani koristi ribu, a među kojima i *Rutilus*-e što sugeriše na pretpostavku o mogućoj introdukciji prespanskog taksona posredstvom pelikana kao i evidentirani protok gena među njima.

Postojanje istog taksona u Skadarskom i Prespanskom jezeru upućuje na zaključak da *R. prespensis* nije endemična vrsta Prespanskog jezera. Ovaj podatak je u potpunoj suprotnosti sa literaturnim podacima (Bogutskay & Iliadou, 2006; Kottelat & Freyhof, 2007).

Endemizam taksona iz Ohridskog i Prespanskog jezera je tema kojom se bave i najnovija istraživanja sa ovih prostora kao na primjer radovi Albrecht *et al.* (2008), Marková *et al.* (2010). Nekoliko autora postavili su hipoteze da navedeni visoki nivo endemizma u ovim starim jezerima ne odgovara ciprinidama, za koje je vjerovatnije da su široko rasprostranjene u sistemu Ohrid-Drim-Skadar (Marić *et al.*, 2007; Sanda, 2007; Marková *et al.*, 2010). Jasno je da hidrološka istorija ovih starih jezera nije rasvjetljena (Albrecht & Wilke, 2008), naročito za Prespansko jezero, koje predstavlja glavni izvor vode za Ohridsko jezero preko podzemnih izvora ali ipak nema direktnu površinsku vezu za sistemom Ohrid-Drim-Skadar. Marková *et al.* (2010) na osnovu rezultata nDNA (Actb) i mtDNA (cyt b) dokazuju da vrsta *Barbus prespensis* Karaman 1924 nije endemična za Prespansko jezero već je široko rasprostranjena u albanskim rijekama. Ovim istraživanjem je pokazano da *Rutilus* nosi zajedničke haplotipove između Prespanskog i Skadarskog jezera, dok je srednja vrijednost mtDNA udaljenosti od >4.5% zabilježena između ovih istih sistema za rod *Barbus*. Ovi autori takođe naglašavaju da je moguće da se vrsta *R. prespensis* i dalje razmatra kao endemična vrsta za Prespansko jezero zbog ograničenih podataka. Isti autori ukazuju da je za rešenje ovog problema neophodno detaljnije istraživanje koje bi obuhvatilo i područja iz okruženja što će neminovno dovesti do promjene njegovog statusa endemizma. S obzirom da rezultati ove disertacije daju nedvosmislene dokaze koji idu u prilog pretpostavci vezano za *R. prespensis* iznešenoj od strane Marková *et al.* (2010) mogu se upotrijebiti i za obježbjedivanje odgovora na pitanje endemizma taksona koji naseljavaju Balkanska jezera. U radu Ketmaier *et al.* (2008) istaknuta je velika sličnost između *R. prespensis* i neretvanske *R. basak* što može ukazati da je areal rasprostranjenja ove vrste još i širi. To se naravno u ovom trenutku sa sigurnošću ne može tvrditi ali svakako otvara mogućnost za novo istraživanje. Ovi rezultati takođe dovode u pitanje i zvanični konzervacioni status ove vrste. Naime, po Kottelat & Freyhof (2007) *R. prespensis* ima status ranjive vrste sa ograničenim arealom rasprostranjenja, što rezultati i zaključci ovog istraživanja nedvosmisleno opovrgavaju.

Jasno je da rodovi *Rutilus* i *Barbus* ne dijele zajednički filogeografski obrazac tako bi bilo neophodno prikupiti sveobuhvatnije filogeografske podatke za više vrsta rasprostranjenih u ovim sistemima, kako bi se mogla potvrditi korisnost molekularnih podataka kojima se mogu podržati paleohidrološki scenariji u ovom regionu. Ukoliko ostale vrste, ili grupe vrsta u regionu pokazuju sličan filogeografski obrazac kao *Barbus*, tada bi *Rutilus* predstavljao anomaliju i bilo bi potrebno dati pojašnjenje za savremeniji tok gena između ovih jezerskih sistema.

Uzimajući u obzir rezultate dobijene ovim istraživanjem, prethodno iznesene činjenice i podatke proizilazi zaključak neophodnosti revizije dosadašnje taksonomije, nomenklature kao i broja vrsta iz roda *Rutilus* najznačajnijih Balkanskih jezera. Ovaj rad je pokazao da ne postoje dokazi o postojanju više od jednog taksona za Prespansko i Ohridsko jezero što je u saglasnosti sa mišljenjem Marić & Radujković (2009). Međutim ovi rezultati su u suprotnosti sa mišljenima Kottelat & Freyhof (2007) i Bogutskay & Iliadou, (2006) o postojanju simpatričkih taksona u Ohridskom jezeru. Ranije je istaknuto da su ova mišljenja proistekla kao posledica opisa datog od strane Karamana (1924) i Vladikov & Petit (1930) ili, da Ohridsko jezero naseljava takson koji se razlikuje od svih do sada opisanih vrsta iz roda *Rutilus*. Međutim, navedeni meristički karakteri u dijagnozi taksona iz Ohridskog jezera dati od strane Karamana (1924) nisu potvrđeni ni u jednom do sada objavljenom istraživanju uključujući i ovo. Uzeta je u obzir i činjenica eventualne razlike u lokalitetima uzorkovanja što je nametnulo i pitanje, da li postoji mogućnost da Karamanov varijetet preferira neki drugi habitat koji nije obuhvaćen kasnijim istraživanjima. Međutim i taj faktor je isključen nakon uzimanja u obzir činjenice da Karaman (1924) navodi da su jedinke sakupljane u litoralnom regionu Ohridskog jezera. Osim toga uzorkovanje materijala za potrebe kasnijih istraživanja vršena su takođe u litoralnom regionu Ohridskog jezera bilo sa albanske (lokalitet Podgradec) ili makedonske strane (Marić & Radujković, 2009) kao i za potrebe ovog istraživanja. Takson iz Skadarskog jezera kroz rad vođen kao Skadar\_bijeli odgovara fenotipskoj deskripciji vste *R. ohridanus* iz Kottelat & Freyhof (2007) koja je proistekla iz do tada njima poznatih literaturnih podataka. Podaci o jedinkama analiziranim u ovom istraživanju koje potiču iz Ohridskog jezera ne odgovaraju opisu Kottelat & Freyhof (2007) vrste *R. ohridanus*. Međutim, podaci o populacijama Skadar\_žuti i Prespa odgovaraju fenotipskoj deskripciji koju Kottelat & Freyhof (2007) daju za *R. karamani*. S obzirom da ne postoji dilema o postojanju jedne vrste (*R. prespensis*) u Prespanskom jezeru kao i očiglednosti koja je proistekla iz rezultata ovog rada da su populacije Skadar\_žuti i Prespa genetički identične one treba da nose ime *R. prespensis*. Na taj način ime vrste *R. karamani* u Skadarskom jezeru postaje nevažeće. Istraživanja novijeg datuma (Marić & Radujković, 2009 i Marić, 2010) kao i rezultati ove disertacije pokazuju da Ohridsko jezero naseljava jedna vrsta. Uvažavajući pravila kodeksa zoološke nomenklature populacija iz Ohridskog jezera treba da nosi ime *R. ohridanus*. Po rezultatima dobijenim ovim istraživanjem Skadar\_bijeli je zasebna vrsta i isključivo naseljava Skadarsko jezero što je u skladu sa rezultatima Marić & Radujković (2009) i Marić (2010). Iz toga proizilazi da je ime *R. albus*



dato od strane Marić (2010) validno ime populacije koja je kroz ovo istraživanje vođena kao Skadar\_bijeli. Na taj način ovaj takson istovremeno dobija i status endema Skadarskog jezera. Naprijed iznešena reviziona šema koja je proistekla iz rezultata ove disertacije predstavlja značajan naučni doprinos razrešenju taksonomije evropskih taksona iz roda *Rutilus* i obezbjeđuje dobru osnovu rešavanju nomenklturnih nedoumica u susjednim vodenim ekosistemima.

Na kraju ove analize proizilazi da tri najveća jezera Balkanskog poluostrva (Prespansko, Ohridsko i Skadarsko) naseljavaju 3 vrste iz roda *Rutilus*:

**1. *Rutilus ohridanus* (Karaman, 1924) - naseljava sliv Ohridskog jezera.**

**Sinonimi:** *Leucos aula* v. *ohridana* Karaman, 1924

*Leucos aula* nation *karamani* Vladikov Petit, 1930

*R. rubella* Fowler, 1977

**2. *Rutilus prespensis* (Karaman, 1924) – naseljava Prespansko jezero i sliv Skadarskog jezera**

**Sinonimi:** *Leucos aula* v. *prespensis* Karaman, 1924

*Rutilus prespensis vukovicii* Marić, 1989

**3. *Rutilus albus* Marić, 2010 - naseljava sliv Skadarskog jezera.**

**Sinonimi:** *Rutilus basak ohridanus* Marić, 1989.

*Rutilus basak ohridanus* Marić, 1989 je naveden u sinonimici vrste *R. albus* iz razloga što je ova vrsta po prvi put nađena u Skadarskom jezeru. Ostalim vrstama u sinonimici su navedena samo imena pod kojim su one i opisivane dok je u Tabeli 2 dat hronološki prikaz imena pod kojima su navođene ove vrste kroz dugi vremenski period.

S obzirom na utvrđenu morfološku i genetičku diferencijaciju simpatričkih taksona iz Skadarskog jezera urađena je ekološka analiza u cilju utvrđivanja njihove prilagođenosti života u simpatriji. Osim toga analiza reproduktivnog ciklusa je urađena s ciljem dobijanja i najvažnijeg kriterijuma za dodjeljivanje sistematskog nivoa vrste, a to je reproduktivna izolovanost. Upoznavanje ključnih momenata njihovog životnog ciklusa osim naučnog ima i praktični značaj. Poznavanje uslova razmnožavanja, polne zrelosti, vremena i mjesta mrijesta, kao i trajanja pojedinih faza sazrijevanja omogućava procjenu stanja populacije i

osigurava značajne informacije pri kategorizaciji nivoa ugroženosti vrste. U pogledu reproduktivne biologije ne postoje relevantni literaturni podaci o ovim taksonima. Imajući to u vidu rezultati ovog rada imaju ne samo veliki značaj u pogledu biologije izučavanih taksona već predstavljaju i značajan doprinos reproduktivnim studijama košljoriba i znanjima o procesu oogeneze kod predstavnika familije Cyprinidae. Budući da je za svaku uspješnu reproduktivnu studiju neophodno poznavanje razvojnih faza kroz koje prolaze oocite, strukturne promjene kroz koje prolaze oocite izučavanih taksona analizirane su primjenom histoloških studija. Faze kroz koje oocite prolaze u toku svog razvojnog stadijuma posmatrane su tokom mrijesne sezone, a prikazani rezultati odražavaju makroskopsko i mikroskopsko stanje u gonadama tokom svih razvojnih faza.

Nepostojanje seksualnog dimorfizma kod predstavnika roda *Rutilus* ističu autori ranijih radova (Stangenberg, 1947; Baranyi *et al.*, 1997). Ovo istraživanje je pokazalo da fenotipski posmatrano kod jedinki oba taksona ne postoji diferencijacija među polovima do perioda neposredno pred mrijest. U periodu mrijesta kod jedinki muškog pola na tijelu se pojavljuju mrijesne kvržice. Kod mužjaka taksona Skadar\_bijeli mrijesne kvržice su konstatovane u februaru, a kod mužjaka taksona Skadar\_žuti u aprilu mjesecu. Osim njih kod mužjaka taksona Skadar\_žuti u periodu mrijesta registrovane su i naglašene crvene pjegice po operkulumu i perajima. Postojanje finih mrijesnih kvržica je jedna od karakteristika predstavnika vrsta iz roda *Rutilus* pri čemu Bogutskay & Iliadou (2006) ističu da kod nekih vrsta mogu da odsustvuju ne naglašavajući i kod kojih.

Ispitivani taksoni se razlikuju po vremenu dostizanja polne zrelosti. Naime, polnu zrelost jedinke taksona Skadar\_bijeli dostižu u trećoj godini dok jedinke taksona Skadar\_žuti polnu zrelost dostižu u drugoj godini. Shodno tome i već istaknutoj razlici u modelu rasta ova dva taksona dostižu polnu zrelost i pri različitim dužinama. Tako na primjer pri rasponu dužina od 12,9 do 13,7 cm jedinke taksona Skadar\_bijeli su polno nezrele, dok su jedinke taksona Skadar\_žuti već dostigle polnu zrelost. Rezultati ovog istraživanja (histološka analiza) pokazuju da je godišnji ciklus razvoja skadarskih taksona isti i da im ovarijume karakteriše grupno sinhroni tip organizacije i sazrijevanja ovarijuma. Polni ciklus ženki oba taksona je jednogodišnji, što znači da se cijeli proces oogeneze (sazrijevanje, puna morfološka i fiziološka zrelost, kao i mrijest) odigravaju u toku jedne godine. Po West-u (1990) grupno sinhroni ovarijumi se karakterišu time da je na svakom razvojnem stadijumu u ovarijumu moguće razlikovati dvije generacije oocite (dvije grupe oocita koje se razlikuju po dimenzijama i razvojnoj fazi). U rezultatima ovog rada na histološkim preparatima svih faza

razvića registrovane su po dvije generacije oocita, a nakon završenog mrijesta u ovarijumima se nalaze postovulatorni folikuli i oocite u previtelogenoj fazi. Ovi rezultati predstavljaju histološku potvrdu grupno sinhronog tipa ovarijuma. Takođe ovim taksonima je zajedničko da se mrijeste jednom u toku mrijesne sezone po jednovremenom modelu. Ovi rezultati se podudaraju sa rezultatima istraživanja na drugim vrstama iz ovog roda kao npr *R. frisii* i *R. rutilus* za koje se navodi grupno sinhroni razvoj ovarijuma i mrijest po jednovremenom modelu (Paykan-Heyrati *et al.*, 2007; Heidari *et al.*, 2009). Međutim ovi rezultati su u potpunoj suprotnosti sa jedinim dokumentovanim podacima o rodu *Rutilus* iz Skadarskog jezera. Naime, Knežević & Ivanović (1975) navode asinhroni rast gonada i porciono mriješćenje za vrstu *R. rubilio* iz Skadarskog jezera. Isti autori navode da je period mrijesta ove vrste od marta do juna mjeseca, pri čemu je masovno mriješćenje konstatovano u aprilu i maju. Ova konstatacija o trajanju mrijesta 4 mjeseca je najvjerovatnije posledica toga da su autori pri proučavanju vrste *R. rubilio* na raspolaganju imali jedinke sad već izvjesno dvije skadarske vrste.

Razlike među ispitivanim taksonima se manifestuju u različitom periodu dostizanja pojedinih razvojnih faza i u ključnom momentu, a to je period mrijesta. Naime, u bilo kom vremenskom periodu u toku godine na histološkim preparatima jedinki Skadar\_bijeli može se zaključiti da se oocite nalaze u naprednijoj fazi u odnosu na jedinke Skadar\_žuti i da su najznačajnije razlike među ispitivanim taksonima upravo u periodu mrijesta. Za populaciju Skadar\_bijeli mrijest je konstatovan krajem februara, a za populaciju Skadar\_žuti krajem aprila i u maju mjesecu. Što se vremena mrijesta tiče najvjerovatnije je da su Knežević & Ivanović (1975) imali na raspolaganju uglavnom jedinke populacije Skadar\_žuti jer se njihovi rezultati djelimično poklapaju sa rezultatima dobijenim za ovaj takson. Priprema za mrijest i vrijeme mrijesta mogu se pratiti i posmatranjem mjesečnih variranja kondicionog faktora budući da se posmatranjem tog parametra dobijaju informacije o fiziološkom stanju populacija. Tako je za takson Skadar\_bijeli najveća zabilježena vrijednost kondicionog faktora registrovana u januaru mjesecu što se poklapa sa periodom kada gonade dostižu svoje maksimalne dimenzije. Pad kondicionog faktora je evidentan od februara (kada se dešava-događa mrijest) do maja mjeseca. U poređenju sa taksonom Skadar\_bijeli vrijednost kondicionog faktora za takson Skadar\_žuti raste i tokom februara mjeseca, dok je minimalna vrijednost faktora zabilježena u aprilu i maju mjesecu što odgovara periodu mrijesta ovog taksona. Iz konstatovanog perioda mrijesta zaključuje se da se simpatrički taksoni razlikuju i u pogledu sredinskih faktora prvenstveno temperature koja je jedan od glavnih faktora za mrijest riba. S obzirom da je mrijest populacije Skadar\_bijeli registrovan krajem februara

zaključuje se da je ova vrsta po zahtjevima sredinskih faktora slična skobalju (*Chondrostoma ohridanus*). Naime, za ovu vrstu je utvrđeno da se mrijesti u zimskom periodu (februar-mart) pri temperaturi vode od 8-10°C (Ivanović & Knežević, 1978).

Razvojne faze kroz koje prolaze oocite oba simpatrička taksona slične su procesima koji se susrijeću kod nekih drugih košljoriba kao na primjer *Danio rerio* (Maack & Segner, 2003), *Cyprinus carpio* (Gupta, 1975), *Rutilus frisii* (Heidari *et al.*, 2009). Kod oba ispitivana skadarska taksona registrovano je da *zona radiata* počinje da se formira u kortikalno alveolarnoj fazi, a maksimalne dimenzije dostiže u fazi zrelosti. Početak formiranja *zone radiate* u kortikalno alveolarnoj fazi i njeno odsustvo u perinukleolarnoj fazi navode se i za druge vrste iz roda *Rutilus* (Heidari *et al.*, 2009). Odsustvo *zone radiate*, a prisustvo folikularnog omotača u previtelogenoj fazi registrovano i kod velikog broja košljoriba (Begovac & Wallace, 1988). Budući da u jajnim ćelijama izučavanih taksona nije registrovano prisustvo uljanih kapljica govori da se jaja mogu svrstati u grupu demersalnih jaja. Glavna razlika između bentofilnih riba (koje produkuju demersalna jaja) i pelagofilnih riba (koje produkuju pelagijska jaja) je u prisustvu i odustvu uljanih kapljica čije je prisustvo karakteristično za pelagijska jaja (Heidari *et al.*, 2009). Tome u prilog ide i podatak o registrovanim dimenzijama sloja *zona radiata* kod oba taksona. Za populaciju Skadar\_bijeli registrovana je debljina *zona radiata* 20-25 µm, a populacije Skadar\_žuti 20 µm. Ovi rezultati su u saglasnosti sa dimenzijama *zone radiate* (19,8±1,4µm) registrovanim kod *R. frisii* koja jaja odlaže na vodenim makrofitama ili na šljunkovitom terenu (Heidari *et al.*, 2009). Kod različitih vrsta košljoriba registrovane su razlike u debljini ovog sloja. Tako na primjer dimenzije *zona radiate* se kreću od 5-9 µm kod *Danio rerio* (Çakici&Üçüncü, 2007) i 7-8 µm kod *Carrasius auratus* do 30 µm kod predstavnika Salmonidae *Salmo gairdneri* (Nagahama, 1983). Kao razlog postojanje razlika u dimenzijama ovog acelularnog sloja navode se razlike u ekološkim uslovima, kako je naglašeno od strane Suzuki *et al.* (2000) koji ističu da demersalna jaja generalno razvijaju deblje omotače. Tako na primjer deblja *zona radiata* kod *S. gairdneri* pruža zaštitu protiv abrazije prilikom polaganja jaja na dnu (Nagahama, 1983). Za vrijeme terenskih istraživanja sakupili smo informacije od ribara da populacija Skadar\_bijeli za vrijeme mrijesta zalazi u pritoke i samim tim se nameće zaključak da jaja odlaže na šljukovitom i pjeskovitom terenu. Osim toga i debljina *zona radiate* ukazuje na tu činjenicu, ako se uzmu u obzir podaci da tipična fitofilna vrsta *C. auratus* koja jaja odlaže na livadama obraslim makrofitskom ima debljinu *zona radiate* 7-8 µm, a sa druge strane vrste roda *Salmo* imaju litofilna jaja koja odlažu na šljunkovitim i kamenitim podlogama i imaju debljinu *zona radiate* 30 µm.



Osim razlike u modelu rasta, mikrohabitata koje preferiraju i mrijesnog perioda simpatrički taksoni iz Skadarskog jezera su diferencirani i u pogledu hranidbenih zahtjeva i parametara koji karakterišu dužinsko i težinsko rastenje. U pogledu ishrane takson Skadar\_bijeli favorizuje animalnu bentosku komponentu što se po spoljašnjim morfološkim karakteristikama manifestuje poludonjim položajem usta. Taksonu Skadar\_žuti pak u ishrani dominira biljna komponenta sastavljena od elemenata makrofitske vegetacije, filamentoznih algi i detritusa. Podaci sličnosti/razlika u pogledu ishrane posmatrani su za vrijeme perioda intenzivnog razvoja živog svijeta upravo iz razloga utvrđivanja potencijalne diferenciranosti u pogledu ishrane. U pogledu dužinskog rasta oba taksona ostvaruju najveći prirast u toku prve godine, a zatim se rast sa određenim pravilnostima usporava. Treba istaći i to da međusobnim poređenjem jedinki obje populacije ove uzrasne klase zaključuje se da jedinke populacije Skadar \_bijeli dostižu veće vrijednosti dužine tijela. U narednim godinama dolazi do usporavanja rasta kod obje populacije pri čemu je taj efekat izražajniji kod jedinki populacije Skadar\_žuti što je vjerovatno posledica ranijeg dostizanja polne zrelosti.

Predstavnici roda *Rutilus* u Skadarskom jezeru ne predstavljaju ekonomski važne vrste. Međutim, poznavanje njihove ekologije i biologije osim naučnog ima i veliki praktični značaj budući da je evidentan porast brojnosti taksona Skadar\_žuti za područje čitavog basena jezera. Za poslednjih nekoliko godina ne postoji precizna statistika izlova ovih populacija zato je nemoguće govoriti o njihovoj brojnosti. Marić & Krivokapić (1997) ističu da se brojnost populacije žutog (*R. prespensis*) značajno povećava i da u pogledu brojnosti predstavlja jednu od najbrojnijih vrsta riba u Skadarskom jezeru. Iako se dvije simpatričke vrste razlikuju u pogledu mikrohabitata koje naseljavaju na određenim lokalitetima se nalaze u istim zajednicama koje upravo i predstavljaju dobar pokazatelj razlike u njihovoj brojnosti. Najočigledniji primjer je u zimskom periodu u sublakustričnim izvorima što ističe i Marić (2010). U ovim izvorima brojnost bijelog je značajno manja i najčešće je nalaženo svega nekoliko primjeraka na 200-300 jedinki žutog. Treba naglasiti i to da tokom zime žive u zajednici sa ekonomski značajnim vrstama (npr. ukljevom *Alburnus scoranza*), i da su kao posledica toga i one pod uticajem komercijalnog izlova. Međutim bez obzira na tu činjenicu uočljivo je značajno povećavanje brojnosti žutog, o čemu govore informacije sa terena dobijene od strane ribolovaca. Što se tiče bijelog taksona o njemu ne postoje detaljni podaci o brojnosti ali je kroz ovo istraživanje zapaženo da ova populacija nije brojna niti česta na lokalitetima basena i da svaka vrsta izlova može bitno uticati na stepen ugroženosti ove ionako malobrojne endemične populacije. Stoga na osnovu rezultata ovog rada kojima je dobijena potvrda genetičkog identiteta endemičnog taksona Skadarskog jezera treba mu

dodijeliti konzervacioni status ugrožene vrste budući i to kategoriju na granici ugroženosti NT (eng. *near threatened*) po Kottelat & Freyhof (2007). Osim toga u cilju zaokruživanja priče o distribuciji i porijeklu vrsta iz roda *Rutilus* na području Balkanskog poluostrva u narednom periodu je neophodno uraditi dodatna uzorkovanja i komparativnu analizu sa riječnim tokovima koji postoje između jezera koja su bila predmet ovog rada. Prvenstveno pažnju bi trebalo usmjeriti na riječne tokove sa teritorije Albanije, rijeku Drim i istovremenu komparaciju sa populacijama iz rijeke Neretve, a u cilju dobijanja odgovora da li je i u kojoj mjeri *R. prespensis* srodan sa ostalim taksonima iz Jadranskog basena?

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu sprovedenih komparativnih morfoloških i genetičkih analiza vrsta iz roda *Rutilus* sa područja Prespanskog, Ohridskog i Skadarskog jezera, kao i ekološkom analizom taksona iz Skadarskog jezera mogu se izvesti sledeći zaključci studije:

- ✓ Za donošenje relevantnih zaključaka o taksonomskim dilemama elemenata ihtiofaune jednog vodenog ekosistema neophodno je uzeti u obzir sve aspekte njihove biologije, ekologije i genetike i uraditi komparativnu analizu sa srodnim taksonima iz susjednih ekosistema.
- ✓ U analizama srodnih vrsta, a u cilju rešavanja stepena njihove diferencijacije neophodno je upotrijebiti više genetičkih markera i komparirati ih sa rezultatima morfoloških analiza.
- ✓ Prespansko, Ohridsko i Skadarsko jezero naseljavaju tri vrste iz roda *Rutilus*: *R. prespensis*, *R. ohridanus* i *R. albus*.
- ✓ Prespansko i Ohridsko jezero naseljava po jedna vrsta iz roda *Rutilus* i to: *R. prespensis* naseljava Prespansko, a *R. ohridanus* Ohridsko jezero. Skadarsko jezero naseljavaju dvije vrste i to: *R. prespensis* i *R. albus*.
- ✓ Predložena nova taksonomska šema vrsta iz roda *Rutilus* Prespanskog, Ohridskog i Skadarskog jezera upućuje i na promjenu njihovog dosadašnjeg statusa endemizma. Shodno tome *R. prespensis* gubi dosadašnji status endema Prespanskog jezera; *R. ohridanus* je endem Ohridskog jezera i *R. albus* endem Skadarskog jezera.
- ✓ Morfološki karakteri: broj krljušti u bočnoj liniji, broj granatih žbica u pektoralnom peraju, broj granatih žbica u dorzalnom peraju, dužina analnog peraja i maksimalna visina tijela pokazuju važna dijagnostička svojstva u diferencijaciji vrsta *R. prespensis* i *R. albus*.
- ✓ Analizom mtDNK cyt *b* na osnovu 16 polimorfničkih mjesta identifikovano je 17 različitih haplotipova među jedinkama vrsta iz roda *Rutilus* Prespanskog, Ohridskog i Skadarskog jezera. 15 haplotipova je opisano po prvi put. Haplotip PYI je ancestralan za ove vrste. Haplotipovi koji čine kladu vrsta *R. ohridanus* i *R. albus* pokazuju prostornu i populacionu privatnost.



## Zaključci

- ✓ *R. albus* je autohtona vrsta Skadarskog jezera, a *R. prespensis* alohtona divergencije simpatričkih skadarskih taksona poklapa se sa geološkim Pleistocena.
- ✓ *R. albus* i *R. prespensis* imaju grupno sinhroni ovarijum i mriješćenje po jedno modelu.
- ✓ Razlike simpatričkih taksona u Skadarskom jezeru manifestuju se u vremenu polne zrelosti i periodu mrijesta. *R. albus* se mrijesti u februaru, a *R. prespensis* mjesecu.
- ✓ Simpatrički taksoni iz Skadarskog jezera se razlikuju u pogledu habitata. *R. albus* isključivo jezerska forma, a *R. prespensis* osim basena naseljava i rijeke slivnog područja Skadarskog jezera.
- ✓ S obzirom na evidentno malobrojnu populaciju vrste *R. albus* u Skadarskom jezeru sprečavanja potencijalnih ugrožavajućih aktivnosti neophodno joj je dodijeliti kor status ugrožene vrste.



## 7. LITERATURA

- Albrecht, C. & Wilke, T. (2008). Ancient Lake Ohrid: biodiversity and evolution. *Hydrobiologia* **615**: 103-140.
- Albrecht, C., Wolff, C., Glöer, P. & Wilke, T. (2008). Concurrent evolution of ancient sister lakes and sister species. The freshwater gastropod genus *Radix* in lakes Ohrid and Prespa. *Hydrobiologia* **615**: 157-167.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2002). Molecular biology of the cell. Fourth edition. Garland Science, Taylor Francis Group. 1463 p.
- Arbocco, G. (1966). I pesci d'acqua della Liguria. – Estratto Dagli Annali Del Museo Civico Di Storia Naturale Di Genova **76**: 137-171.
- Awise, J. C. & Vrijenhoek, R. C. (1987). Mode of inheritance and variation of mitochondrial DNA in hybridogenetic fishes of the genus *Poeciliopsis*. *Molecular biology of Evolution* **4**: 514-525.
- Awise, J. C. (1994). Molecular markers. *Natural History and Evolution*. Chapman & Hall.
- Awise, J. C. (2001). Phylogeography. The history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge.
- Balloux, F. & Lugon-Moulin, N. (2002). The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology* **11**: 155-165.
- Baranyi, C., Gollman, G. & Bobin, M. (1997). Genetic and morphological variability in roach *Rutilus rutilus*, from Austria. *Hydrobiologia* **350**: 13-23.
- Begovac, P. C. & Wallace, R.A. (1988). Stages of oocyte development in the pipefish, *Syngnathus scovelli*. *Journal of Morphology* **197**: 353-369.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N. & Bonhomme, F. (1996–2004). GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations, Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Berg, L. S. (1912). Рибѣ, т. 3 (Остариофизи), fasc. 1, p. 1. 1-336, in Fauna Rossii, St. Petersburg, Izd. Akad. Nauk.
- Berg, L. S. (1949). Freshwater fishes of USSR and adjacent countries. 4 th Ed., 2:783-858. Moscow-Leningrad: Izd. Akad. Nauk. SSSR. (In Russian)
- Bianco, P. G. (1986). The zoogeographic units of Italy and western Balkan based on cyprinid Species ranges (Pisces). *Biologia Gallo-hellenica* **12**: 291-299.

- Bianco, P. G. (1990). Potential role of paleohistory of the Mediterranean and Parathetys basins on the early dispersal of Euro-Mediterranean freshwater fishes. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 1: 167-184.
- Bianco, G. P. & Taraborelli, T. (1985). Contribution alla conoscenza del genere *Rutilus* Rafinesque in Italia e nei Balcani occidentali (Pisces, Cyprinidae). *Boll Mus Reg Sci Nat Torino*, 3 (1): 131-172
- Bianco, P. G., Aprea, G., Balleto, E., Capriglione, T., Fulgione, D. & Odierna, G. (2004). The karyology of the cyprinid genera *Scardinius* and *Rutilus* in southern Europe. *Ichthyological Research* 51: 274-278.
- Bogutskaya, N. G. (1998). Morphology and taxonomic relationships of species of the rutiline-chondrostomine group (Leuciscinae, Cyprinidae). In: Current problems of fish systematic: 19-20. St. Petresburg: ZIN RAS (In Russian).
- Bogutskaya, N. G. & Iliadou, K. (2006). *Rutilus panosi*, a new roach from Western Greece (Teleostei: Cyprinidae). *Zoosystema Rossica* 14: 293-298
- Bristol, G. & Anderson, R. D. (1995). A program for the estimation of the binding of Oligonucleotide to DNA. Department of Medicine and Department of Biochemistry, School of Medicine, University of California, Los Angeles, California.
- Brown, W. M., George, M. Jr. & Wilson, A. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 76: 1967-1971.
- Cadrin, X. S. (2000). Advances in morphometric identification of fishery stocks. *Reviews in fish biology and fisheries* 10 (1): 91-112.
- Callejas, C. & Ochando, M.D. (2000). Recent radiation of Iberian barbell fish (Teleostei, Cyprinidae) inferred from cytochrome *b* genes. *The Journal of Heredity* 91 (4): 283-288.
- Çakici, O. & Üçüncü, S.I. (2007). Oocyte development in the zebrafish, *Danio rerio* (Teleostei: Cyprinidae). *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 24: 137-141.
- Carstens, B. C. & Knowles, L.L. (2007). Shifting distributions and speciation: species divergence during rapid climate change. *Molecular Ecology* 16: 619-627.
- Casto, J. A., Picornell, A., Ramon, M. (1998). Mitochondrial DNK: a tool for population genetic studies. *International Microbiology* 1: 327-332.
- Chang, Y., Huang, F. & Lo, T. (1994). The complete nucleotide sequence and gene organization of carp (*Cyprinus carpio*) mitochondrial genome. *Journal of Molecular Evolution* 38: 138-155.
- Clement, M., Posada, D. & Crandall, K. A. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9, 1657–1660.

- Cock, A. G. (1966). Genetical aspect of metrical growth and form in animals. *Quarterly Review of Biology*, 41 (2): 133-190.
- Crivelli, A. J. & Dupont, F. (1987). Biometrical and biological features of *Alburnus alburnus* x *Rutilus rubilio* natural hybrids from Lake Mikri Prespa, northern Greece. *Journal of Fish Biology* 31: 721-733.
- Crooijmans, R. P. M. A., Van der Poel, J. J., Groenen, M. A. M., Bierbooms, V. A. F. & Komen, J. (1997). Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.) *Animal Genetics* 28 (2): 129-134.
- Cvijić, J. (1902). Kriptodepresije u Evropi. *Glas Srpske akademije nauka*. XCIII, Beograd.
- Davis, M.B., Shaw, R. & Etterson, J. R. (2005). Evolutionary responses to changing climate. *Ecology* 86: 1704-1714.
- Dawson, D. A., Burland, T. M., Douglas, A. & Bradshaw, M. (2003). Isolation of microsatellite loci in the freshwater fish, the bitterling *Rhodeus sericeus* (Teleostei: Cyprinidae). *Molecular Ecology Notes* 3(2): 199-202.
- Dhora, D., (2009). Vlerësime ekogjeografike për peshqit e ujërave të ëmbël të Shqipërisë. *Buletin Shkencor, Universiteti i Shkodrës "Luigj Gurakuqi"*. 59: 160-188.
- Drecun, Đ. (1957). Ihtiofauna Skadarskog jezera. *Naša poljoprivreda* 3: 33-39.
- Drecun, Đ. (1962). Rasprostranjenje i popis slatkovodnih riba Crne Gore. *Hydrobiologia montenegrina* 2 (1): 1-8.
- Drecun, Đ. & Miranović, M. (1962). Sublakustrična – vrela oka i njihov značaj u ribolovu Skadarskog jezera. *Hydrobiologia Montenegrina* 2/5/: 1-21.
- Drecun, Đ. & Ristić, M. (1964). Ulov ribe na Skadarskom jezeru 1947-1960. godine. *Hydrobiologia Montenegrina* 1/10/: 1-19.
- Economidis, P. S. & Banareescu, P. M. (1991). The distribution and origins of freshwater fishes in the Balkan peninsula, especially in Greece. *Internationale revue der gesamten hydrobiologie* 76: 257-283.
- Eisen, J. A., (1999). Mechanistic basis for microsatellite instability. In: *Microsatellite: Evolution and Applications* (eds. Goldstein, D. B. & Schlötterer, C.). Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 34-48.
- Elmer, K. R., Reggio, C., Wirth, T., Verheyen, E., Salzburger, W. & Meyer, A. (2009). Pleistocene desiccation in East Africa bottlenecked but did not extirpate the adaptive radiation of Lake Victoria haplochromine cichlid fishes. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 106: 13404-13409.
- Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14 (8): 2611-20.
- Fan, H. & Chu, J-Y. (2007). A brief review of short tandem repeat mutation. *Geno Prot Bioinfo* 5 (1): 7-14.

- Ford-Lloyd, G. (1996). Measuring genetic variation using molecular markers. University of Birmingham, Kevin Painting, IPGRI, Rome.
- Fowler, H. W. (1977). A catalog of World fishes (XXVI). Q. J. Taiwan Mus. (Taipei) v. 30 (nos. 1/2): 1-88 [catalog v. 3, pp. 480-566].
- Georgiev, S. (1998). The Ichthyofauna of the Republic of Macedonia. narodna i univerzitetska biblioteka "Sv. Kliment Ohridski". Skoplje, 177 pp (in Macedonian).
- Giles, R. E., Blanc, H. M., Cann, & Wallace, D. C. (1980). Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proceeding of the National Academy of Sciences* **77**: 6515-6719.
- Glöer, P. & Pešić, V. (2007). The freshwater gastropods of the Skadar Lake with the description of *Valvata montenegrina* n. sp. (Mollusca, Gastropoda, Valvatidae). In: Pavičević, D. & Perreau, M. (Eds.) Advances in the studies of the subterranean and epigean fauna of the Balkan Peninsula. Volume dedicated to the memory of Guido Nonveller. Monograph 22, Institute for Nature Conservation of Serbia, 325-332.
- Goldstein, D. B. & Pollock, D. D. (1997). Launching microsatellites: A review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. *Journal of Heredity* **88**: 335-342.
- Gupta, S (1975). The development of carp gonads in warm water aquaria. *Journal of Fish Biology* **7**: 775-782.
- Hadžiablahović, S. (2001). Komparativna istraživanja biohemijskih i citogenetičkih osobina vrsta *Pachychilon pictum* (Heckel et Kner, 1858) i *Rutilus rubilio* (Bonaparte, 1937) iz Skadarskog jezera. Doktorska disertacija. 153 pp.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T. & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* **4** (1): 9 pp.
- Hartl, D. L. & Clark, A. G. (1997). Principles of population genetics, 3rd edn. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, MA.
- Hancock, J. M. (1999). Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: Microsatellites evolution and Applications (eds Goldstein, D. B., Schlöttere, C), Oxford University Press, New York: 1-9.
- Heckel, J. & Kner, R. (1858). Die Süßwasserfische der Österreichischen Monarchie mit Rücksicht auf der angrenzenden Länder. Engelmann, Leipzig, 388 p.
- Heidari, B. Shabanipour, N. Savari, A, Yavari, V. & Hosseini, N. (2009). The oocyte development of Kutum, *Rutilus frisii kutum*, K. with special emphasis on the *zona radiata* structure. *Animal Reproduction* **6**(3): 465-472.
- Helland, I. P., Vøllestad, L. A., Freyhof, J. & Mehner, T. (2009). Morphological differences between two ecologically similar sympatric fishes. *Journal of Fish Biology* **75**: 2756-2767.



- Hewitt, G. M. (2004). Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **359**: 183-195.
- Hoeh, W. R., Blakley, K. H. & Brown, W. M. (1991). Heteroplasmy suggests limited biparental inheritance of *Mytilus* mitochondrial DNA. *Science* **251**: 1488-1490.
- Holden, M. J. & Raitt, D. F. S. (1974). Manual of fisheries science, 2. Methods of resource investigation and their application. FAO Fish. Tech. Pap. 115 (1). 211 pp.
- Holčík, J. (1989): The Freshwater fishes of Europe. Vol. 1, Part II. General introduction to fishes-Acipenseriformes. Aula, Weisbaden, 469 pp.
- Honj, R. M., Vaz-dos-Santos, A. M. & Rossi-Wongtschowsk, C.L.D.B. (2006). Identification of the stages of ovarian maturation of the Argentine hake *Merluccius hubbsi* Marini, 1933 (Teleostei: Merlucciidae): advantages and disadvantages of use of the macroscopic and microscopic scales. *Neotropical Ichthyology* **4** (3): 246-268.
- Howes, G. J. (1981). Anatomy and phylogeny of the Chinese major carps *Ctenopharyngodon* Steind., 1866 and *Hypophthalmichthys* Blkr., 1860. *Bulletin of the British Museum (Natural History) Zoology* **41**: 1-52.
- Hrvačević, S. (2004). Resursi površinskih voda Crne Gore. Elektroprivreda Crne Gore (Podgorica: HKS Spektar). 331 pp
- Hunter, J. R. & Macewicz, B. J. (1985). Measurement of spawning frequency in multiple spawning fishes. *NOAA Technical Report NMFS*, 79-94.
- Hunter, J. R. & Leong, R. J. H. (1981). The spawning energetics of female northern anchovy, *Engraulis mordax*. *Fishery Bulletin* **79**: 215-230.
- Ihssen, P. E., Booke, H. E., Casselman, J.M., McGlade, J. M., Payne, N. R. & Utter, F. M. (1981). Stock identification: materials and methods. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **38**: 1838-1855.
- Ivanović, B. (1967). Embrionalno razveće žutalja *Rutilus rubilio* (Bonaparte, 1837). Poljoprivreda i šumarstvo XIII **4**: 59-67.
- Ivanović, B. (1967a). Hibridizacija *Pachychilon pictum* x *Rutilus rubilio*. Poljoprivreda i šumarstvo XIII 1-2: 13-18.
- Ivanović, B. (1968). Pokretljivost spermatozoida nekih ciprinida na različitim temperaturama vode. *Ribarstvo Jugoslavije XXIII*, **6**: 137-140.
- Ivanović, M. B. (1973): Ichthyofauna of Skadar Lake. Institute for biological and medical investigation. Titograd. 80-82.
- Ivanović, B. & Knežević, B. (1978). Morfo-ekološke karakteristike ovogeneze *Chondrostoma nasus ohridanus* iz Skadarskog jezera. *Ekologija* **13** (2): 173-179.

- Ivanović, A. & Kalezić, M. (2009). Evolucionarna morfologija – teorijske postavke i geometrijska morfometrija. Biološki fakultet. Univerzitet u Beogradu, Beograd, 216 pp.
- Jarne, P. & Lagoda, P. J. L. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution* **11**: 424-429.
- Johns, G. C. & Avise, J. C. (1998). A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Molecular biology and Evolution* **15**: 1481-1490.
- Jovićević, A. (1909). Skadarsko jezero i ribolov na njemu. Srpski etnografski zbornik, **13**: 157-259.
- Kalinowski, S.T. (2002). How many alleles per locus should be used to estimate genetic distances? *Heredity* **88**: 62-65.
- Kalinowski, S.T. (2005). HP-RARE 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. *Molecular Ecology Notes* **5**, 187-189.
- Karaman, S. (1924). Pisces Macedoniae. Split, pp 1-90.
- Karaman, S. (1928). Prilozi ihtiologiji Jugoslavije. Glasnik Naučnog društva **6**: 148-176.
- Karaman, S. (1933). Prilozi ihtiologiji Crne Gore. Ribarski List, God. VIII. Br. 9 i 10.
- Karaman, G. & Beeton, A. (1981). The Biota and Limnology of the Lake Skadar. Institut za biološka i medicinska istraživanja u SRCG, Biološki zavod, Titograd; Smithsonian institution, Washington, D.C., USA. 468 p.
- Karaman, G. & Nedić, D. (1981). Zoobentos of Skadar lake, in (Karaman G. and A. Beeton, 1981, eds) The Biota and Limnology of the Lake Skadar. Institut za biološka i medicinska istraživanja u SRCG, Biološki zavod, Titograd; Smithsonian institution, Washington, D.C., USA. 468 p.
- Kartavtsev, Y. P. (2005). Molecular evolution and population genetics. Far Eastern State University Press, Vladivostok, 234 p.
- Kavarić, M. (1974). Morfologija krvnih elemenata nekih vrsta ciprinida iz Skadarskog jezera. (Magistarski rad). Sarajevo.
- Ketmaier, V. Bianco, P. G., Cobolli, M., Krivokapić, M., Caniglia, R. & De Mattheis, E. (2004). Molecular phylogeny of two lineages of Leuciscinae cyprinids (*Telestes* and *Scardinius*) from peri-Mediterranean area based on cytochrome *b* data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **32**: 1061-1071.
- Ketmaier, V. Bianco, P. G. & Durand, J.D. (2008). Molecular systematics, phylogeny and biogeography of roaches (*Rutilus*, Teleostei, Cyprinidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **49**: 362-367.

- Kim, I-C., Kweon, H-S., Kim, Y., I., Kim, C-B., Gye, M. C., Lee, W-O., Lee, Y-S. & Lee, J-S. (2004). The complete mitochondrial genome of the javeline goby *Acanthogobius hasta* (Perciformes, Gobiidae) and phylogenetic consideration. *Gene* **336**: 147-153.
- Klingenberg, C. P. (1996). Multivariate allometry. In: Marcus LF, Corti M, Loy A, Slice D, Naylor G, eds. *Advances in morphometrics*. New York: Plenum Press, 23–49.
- Knapik, E. W., Goodman, A. & Ekker, M. (1998). A microsatellite genetic linkage map for zebrafish (*Danio rerio*). *Nature Genetics* **18**: 338-343.
- Knežević, B. (1976). Dužinsko i težinsko rastenje žutalja – *Rutilus rubilio rubilio* (Bonaparte, 1837) iz Skadarskog jezera. *Poljoprivreda i šumarstvo*, 21 (3): 43-63.
- Knežević, B. (1977). Fecundity of *Rutilus rubilio rubilio* (Bonaparte, 1837). Glasnik republičkog zavoda za zaštitu prirode Prirodnjačkog muzeja, 10: 69-74.
- Knežević, B. & Ivanović, B. (1975). Sezonski razvoj gonada *Rutilus rubilio* (Bonaparte, 1837). *Ichthyologia* **7(1)**: 17-24.
- Kocher, T. D., Thomas, W. K. & Meyer, A. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **86**: 6196-6200.
- Koutrakis, E. T. & Tsikliras, A. C. (2003). Length-weight relationships of fishes from three northern Aegean estuarine systems (Greece). *Journal of Applied Ichthyology* **19**: 258-260.
- Köhler, C. (1992). Morphologische Untersuchungen zur intraspezifischen Variabilität des rotauges, *Rutilus rutilus* (L.), aus dem Rhein. *Fischökologie* **6**: 43-67.
- Kogelnik, A. M., Lott, M. T., Brown, M. D., Navathe, S. B. & Wallace, D. C. (2005). MITOMAP: a human mitochondrial genome data-base-1998 update. *Nucleic Acids Research* **26**: 112-115.
- Kornberg, A. (1964). Enzymatic syntezis of deoxyribonucleic acid. XVI. Oligonucleotides as templates and the mechanism of their replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **51**: 315-323.
- Kotlík, P., Marková, S., Choleva, L., Bokutskaya, N. G. Guler Ekmekcis, F. & Ivanova, P. (2008). Divergence with gene flow between Ponto-Caspian refugia in an anadromous cyprinid *Rutilus frisii* revealed by multiple gene phylogeography. *Molecular Ecology* **17**: 1076-1088.
- Kottelat, M. (1997). European freshwater fishes. An heuristic check list of the freshwater of fishes of Europe (exclusive of former USSR) with an introduction for non-systematics and comments on nomenclature and conservation. Biologia, Bratislava, Section Zoology 52 (Supp. 5): 1-271.
- Kottelat, M. & Freyhof, J. (2007). Handbook of European Freshwater Fishes. Kottelat, Cornol, Switzerland and Freyhof, Berlin, Germany.

- Krpo-Četković, J. (2004). Rastenje, ishrana i raspodela resursa simpatričkih piscivornih riba u Dunavu kod Beograda. Doktorska disertacija, Beograd. 279 pp
- Lakušić, R. & Pavlović, D. (1981). Associations of Lake Skadar aquatic vegetation. The Biota and Limnology of Lake Skadar, 125-132.
- Lakušić, R. (1983). Die oekosysteme von Skutari see und seinen umgebung. Scientific meeting - Lake Skutari. The Montenegrin academy of sciences and art. Proceedings, 101-112.
- Lee, J-S., Miya, M., lee, Y-S., Kim, C-G., Park, E-H., Aoki, Y. & Nishida, M. (2001). The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of the self-fertilizing fish *Rivulus marmoratus* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) and the first description of duplication of control region in fish. *Gene* **280**: 1-7.
- Lewin, B. (2000). Genus VII. Oxford University Press, University of Oxford, Oxford, United Kindom. 990 p.
- Liepelt, S., Bialozyt, R. & Ziegenhagen, B. (2002). Wind-dispersed pollen mediates postglacial gene flow among refugia. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **99**: 14590-14594.
- Lugon-Moulin, N., Brünner, H., Wyttenbach, A., Hausser, J. & Goudet, J. (1999). Hierarchical analysis of genetic differentiation in a hybrid zone of *Sorex araneus* (Insectivora, Soricidae). *Molecular ecology* **8**: 419-431.
- Maack, G. & Segner, H. (2003). Morphological development of the gonads in zebrafish. *Journal of Fish Biology* **62**: 895-906.
- Marić, D. (1989). The species revision of genus *Rutilus* Rafinesque, 1820 (Pisces) from western part of Balcan peninsula. Glasnik Republičkog Zavoda za Zaštitu Prirode i Prirodnjačkog Muzeja u Titogradu., 21 (1988 [1989]): 55-79.
- Marić, D. (1989). Adaptacija introdukovanog srebrnog karaša (*Carassius auratus* gibelio Bloch, 1783) u Skadarskom jezeru. Doktorska disertacija. Kragujevac. 252 p.
- Marić, D. (2010). *Rutilus albus* sp. n. (Cyprinidae, Pisces) from Lake Skadar. *Periodicum biologorum*, **112** (2): 153-158.
- Marić, D. & Kažić, D. (1990). Kvalitativno-kvantitativni sastav ihtiofaune sublakustričnih izvora Skadarskog jezera u zimskom period 1976-1987. Glasnik Republičkog Zavoda za Zaštitu Prirode i Prirodnjačkog Muzeja u Titogradu., 23: 85-96.
- Marić, D. & Krivokapić, M. (1997). Stanje faune riba u slivu Skadarskog jezera. CANU, Zbornik radova-prirodne vrijednosti i zaštita Skadarskog jezera **44**: 215-223.
- Marić, D. & Milošević, D. (2011). Katalog slatkovodnih riba (Osteichthyes) Crne Gore. Crnogorska akademija nauka i umjetnosti – odjeljenje prirodnih nauka. Katalozi 5. Knjiga 4. Podgorica. pp 114.



- Marić, D. & Radujković, B. (2009). *Rutilus ohridanus* (Karaman, 1924) (Teleostei, Cyprinidae) from Ohrid, Prespa and Skadar Lakes. *Natura Montenegrina* **8(3)**: 137-150.
- Marić, D., Radujković, B. & Šundić, D. (2007). Endemism of cyprinid fauna from Prespa-Ohrid-Skadar lakes system. 1st Symposium for Protection of Natural Lakes in Republic of Macedonia. Ohrid: 28.
- Marić, S. (2005). Evolucijska istorija kompleksa potočne pastrmke *Salmo trutta* L. 1758 na području Republike Srbije i značaj za ribarstvo. Doktorska disertacija. Biološki fakultet. Beograd.
- Marková, S., Šanda, R., Crivelli, A., Shumka, S., Wilson, I. F., Vukić, J., Berrebi, P. & Kotlík, P. (2010). Nuclear and mitochondrial DNA sequence data reveal the evolutionary history of *Barbus* (Cyprinidae) in the ancient lake systems of the Balkans. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **55**: 488-500.
- McMillan, B. D (2007). Fish Histology. Female Reproductive Systems. Springer. Western Science. Netherlands. pp 598.
- Мейер, В. А. (1939). К вопросу о годовом цикле изменений яичников костных рыб. Сер. Биол. **3**: 386-417. Moskva – Leningrad.
- Moritz, C., Dowling, T. E., & Brown, W. M. (1987). Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematic. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* **18**: 269-292.
- Murua, H. & Saborido-Rey, F. (2003). Female reproductive strategies of marine fish species of North Atlantic. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science* **33**: 22-31
- Nagahama, Y. (1983). The functional morphology of teleostes gonads. In: Hoar WS, Randal DJ, Donaldson EM (Ed.). *Fish Physiology*. New York, NY: Academic Press. 223-275.
- Nedeljković, R. (1959). Skadarsko jezero. Studija organske produkcije u jednom karstnom jezeru. Biološki institute NR Srbije, Posebno izdanje, 4, Beograd.
- Nelson, J. S. (2006). Fishes of the world. 4<sup>th</sup> ed. John Wiley and Sons, New York. 601 pp.
- Nielsen, J. L., Gan, C. A. Wright, J. M., Morris, D. B. & Thomas, W. K. (1994). Biogeographic distributions of mitochondrial and nuclear markers for southern steelhead. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **3**: 281-293.
- O'Connel, M. & Wright, J. M. (1997). Microsatellite DNA in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **7**: 331-363.
- Oppen-Berntsen, D. O., Helvil, J. V. & Walther, B. T. (1990). The major structural protein of cod (*Gadus morhua*) eggshells and protein cross linking during teleost egg hardening. *Developmental Biology* **137**: 258-265.

- Paykan-Heyrati, F., Mostafi, H., Toloei, H. & Dorafshan, S. (2007). Induced spawning of kutum, *Rutilus frisii kutum* using (C-Ala6, Pro9-NET) GnRHa combined with domperidone. *Aquaculture* **265**:288-293.
- Poljakov, D. G., Filipi, Nd., Basho, K. & Hysenaj, A. (1958). Peshit e Shqiperise, Tirana.
- Posada, D. & Crandall, K. (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution, *Bioinformatics* **14**, 817-818
- Pritchard, J.K., Stephens, M. & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155** (2): 945-959.
- Rabrenović, D., Knežević, S. & Rundić, Lj. (2003). Istorijaska geologija. Rudarsko – Geološki fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd.
- Radulović, V. (1989). Hidrogeologija sliva Skadarskog jezera. zavod za geološka istraživanja SR Crne Gore-Titograd.
- Rakočević, J. (2006). Ekološka i taksonomska studija fitoplanktona Skadarskog jezera. Doktorska disertacija, Beograd, 155 p.
- Ricklefs, R.E., & Miles, D. B. (1994). Ecological and evolutionary inferences from morphology: an ecological perspective. In: Wainwright PC, Reilly SM, eds. *Ecological morphology: integral organismal biology*. Chicago: University of Chicago Press, 13–41.
- Ristić, J. & Vizi, O. (1981). Synoptic survey of the dominant macrophytes in Lake Skadar. In: The biota and limnology of Lake Skadar. Institution for Biolog. and Medical Research in Montenegro. Titograd, 117-125.
- Robalo, J. I., Almada, V. C., Levy, A. Doadrio, I. (2007). Re-examination and phylogeny of the genus *Chondrostoma* based on mitochondrial and nuclear data and the definition of 5 new genera. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **42** (2): 362-372.
- Rousset, F. (2008). Genepop'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* **8**, 103–106.
- Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. & Arnheim, N. (1988). Enzymatic amplification of  $\beta$  – globin genomic sequences and restriction site analyses for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **4**: 1350-1354.
- Sanda, R. (2007). Endemism of cypriniform fishes of Lakes Ohrid and Prespa: A review. 1<sup>st</sup> Symposium for Protection of Natural Lakes in Republic of Macedonia, Ohrid: 40.
- Schneider, S., Roesli, D. & Excoffier, L. (2000). Arlequin ver.2.000: A Software for Population Genetics Analysis. Genetics and Biometry, Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Schuelke, M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* **18**(2): 233–234.
- Schlötterer, C. (2000). Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* **109**: 365-371.

- Schuler, G. D., Boguski, M. S. & Stewart, E. A. (1996). A gene map of the human genome. *Science* **274**: 540-546.
- Selman, K. & Wallace, R. A. (1989). Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. *Zoological Science* **6**: 211-231.
- Seratlić-Savić, D. & Vuković, T. (1971). Broj kičmenih pršljenova kod nekih vrsta Ciprinida iz voda Bosne i Hercegovine. *Ribarstvo Jugoslavije* **26** (3): 45-49.
- Sket, B. (1967). Ključci za določevanje živali. Ljubljana.
- Snoj, A. (1997). Molekularno biološka karakterizacija soške postrvi (*Salmo marmoratus*, Cuvier 1817). Doktorska disertacija, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani.
- Stalling, R. L., Ford, A. F., Nelson, D., Torney, D. C., Hildebrand, C. E. & Moyzis, R. K. (1991). Evolution and distribution of (GT)<sub>n</sub> repetitive sequences in Mammalian genomes. *Genomics* **10**: 807-815.
- Stangenberg, K. (1947). The variability of quantitative features in roach. *Zool Polon*, 4: 107-145.
- Stanković, S. (1926). O tercijernim reliktima u fauni Triklada Skadarskog jezera. Glas geografskog društva, 12, Beograd.
- Steindachner, F. (1883). Ichthyologische Birtage XII. Sitz-Ber. Math. Naturwiss. Cl. Acad. Wiss. Wien, Abt,1. 86: 61-82.
- Suzuki, H.I. Agostinho, A.A. Winemiller, K.O. (2000). Relationship between oocyte morphology and reproductive strategy in loricariid catfishes of the Paraná River, Brazil. *Journal of Fish Biology* **6**: 287-318
- Taler, Z. (1953). Rasprostranjenje i popis slatkovodnih riba Jugoslavije. Glasnik prirodnjačkog muzeja Srpske zemlje Srbije. B 5-6: 425-455.
- Talevska, M., Petrović, D, Milošević, D., Talevski, T., Marić, D. & Talevska, A. (2009): Biodiversity of macrophyte vegetation from Lake Prespa, Lake Ohrid and Lake Skadar, *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **23** (2): 931-935.
- Tamura, K. Dudley, J. Nei. M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 1596-1599.
- Tartonese, E. (1970). Osteichthyes (Pisci ossegi). In Fauna d'Italia, 10 Bologna: 1-565.
- Templeton, A. R., Crandall, K. A. & Sing, C. F. (1992). A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* **132**, 619-633.
- Thompson, J. D. (1991). Phenotypic plasticity as a component of evolutionary change. *Trends in Ecology and Evolution* **6** (8): 246-249.

- Tortonese, E. (1970). Fauna d'Italia. Osteichthyes. Pesci ossei, 10. Bologna.
- Treer, T., Piria, M., Aničić, I., Safner, R. & Tomljanović, T. (2006). Diet and growth of spirin *Alburnoides bipunctatus* in the barbell zone of the Sava River. *Folia Zoologica* **55**(1): 97-106.
- Tyler, C.R. & Sumpter, J.P. (1996). Oocyte growth and development in teleosts. *Reviews of Fish Biology and Fisheries* **6**: 287-318.
- Šerban, N. (2001). Čelija – strukture i oblici. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva Beograd. 387 p.
- Šorić, M.V. (1983). *Rutilus rubilio* (Cyprinidea, Pisces) u Ohrid-Drim-Skadar sistemu. *Biosistematika* **9** (1): 61-70.
- Šorić, M.V. (1990). Ichthyofauna of the Ohrid-Drim-Skadar system. *Ichthyologia* **22** (1): 31-43.
- Van Oosterhout, C, Hutchinson, WF, Wills, DPM, Shipley P 2004, 'Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data', *Molecular Ecology* **4** (3): 535-38.
- Vladikov, V. & Petit, E. (1930). Sur quelques poisons d' eau douce d'Albania. – *Bulliten de la Societé Zoologique de France* **55**: 383-409.
- Vuković, T. (1977). Ribe Bosne i Hercegovine. Sarajevo
- Vuković, T. (1982). Sistematika riba. Slatkovodno ribarstvo Jugoslavije. Med. Nakl. Posl. Zajednica slatkovodnih riba Jugoslavije.
- Vuković, T. & Ivanović, B. (1970). Taksonomske karakteristike *Rutilus rubilio* (Bonaparte) iz Skadarskog jezera i sliva Neretve. *Ribarstvo Jugoslavije* **1**: 18-20.
- Vuković, T., Knežević, B. & Ivanović, B. (1972). Dužina crijevnog trakta nekih ciprinidnih vrsta iz Skadarskog jezera. *Ichthyologia* **3** (1): 97-105.
- Vuković, T. & Seratlić Savić, D. (1967). Broj branhiospina na škržnim lucima ukljeve – *Alburnus alburnus* Filipi i masnice *Rutilus rubilio* Bonaparte iz Skadarskog jezera i rijeke Bune. *Glasnik zemaljskog muzeja u Sarajevu, Prirodne nauke* **6**: 211-214.
- Vuković, T. & Vuković, N. (1968). Neke taksonomske karakteristike vrste *Rutilus rubilio* (Bonaparte). (Pisces, Cyprinidae) iz voda Jugoslavije i sjeverne Italije. *Godišnjak Biološkog Instituta* **21**: 129-135.
- Vuković, N., Vuković, T. & Sekulović, T. (1970). Težina srca i mozga nekih vrsta ciprinida iz Skadarskog jezera i rijeke Bune. *Ichthyologia* **2** (1): 143-154.



- Vyskočilová, M., Šimková, A. & Martin, J. F. (2007). Isolation and characterization of microsatellites in *Leuciscus cephalus* (Cypriniformes, Cyprinidae) and cross-species amplification within the family Cyprinidae. *Molecular Ecology Notes* 7 (6): 1150-1154.
- Wallace, D. C. (1992). Diseases of the mitochondrial DNA. *Annual Review of Biochemistry* 61: 1175-1212.
- Wallace, R. A. & Selman, K. (1981). Cellular and Dynamic Aspects of Oocyte Growth in Teleosts. *American Zoologist* 21: 325-343
- West, G. (1990). Methods of assessing ovarian development in fishes: A Review. *Australia Journal of Marine Freshwater Research* 41: 199-222.
- Wiens, J. J. (2004). The role of morphological data in phylogeny reconstruction. *Systematic Biology* 53(4): 653-611.
- Winkler, K. A. & Weiss, S. (2008). Eighteen new tetranucleotide microsatellite DNA markers for *Coregonus lavaretus* cloned from an alpine lake population. *Molecular Ecology Resources* 762, 1055–1058.
- Winkler, K.A. & Weiss, S (2009). Nine new tetranucleotide microsatellite DNA markers for the European mudminnow *Umbra krameri*. *Conservation Genetics* 10, 1155-1157.
- Wood, A. B. & Jordan, D. R. (2006). Fertility of roach × bream hybrids, *Rutilus rutilus* (L.) × *Abramis brama* (L.), and their identification. *Journal of Fish Biology* 30 (3): 249-261.
- Zhang, D.-X., & Hewitt, G. M. (2003). Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology* 12: 563-584.
- Zane, L., Bargelloni, L. & Patarnello, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation; a review. *Molecular Ecology* 11: 1-16.
- Zardoya, R. & Doadrio, I. (1999). Molecular evidence on the evolutionary and biogeographical patterns of European cyprinids. *Molecular Ecology and Phylogenetics* 49 (2): 227-237.
- Zardoya, R., Economidis, P. S. & Doadrio, I. (1999). Phylogenetic relationships of Greek cyprinid fauna. *Molecular Ecology and Phylogenetics* 13: 122-131.
- Zelditch, M. L., Swiderski, D. L., Sheets, H. D. & Fink, W. L. (2004). Geometric morfometric for biologists – a primer. Elsevier Academic press, New York, USA. 429 pp.

**ELEKTRONSKE REFERENCE:**

- Cables, L. (2001). Mitochondria. Horsepower. <http://homepages.ihug.co.nz/~lcables/mitochondria.htm>
- Drummond, A. J. & Rambaut, A. (2009). Beast version 1.5.1. [http://beast.bio.ed.ac.uk/Main\\_Page](http://beast.bio.ed.ac.uk/Main_Page).
- Goudet, J. M. (2001). FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3), <http://www.unil.ch/izea/softwares/fstat.html>; updated from Goudet 1995



## PODACI POTREBNI ZA DIGITALIZACIJU DOKTORSKE DISERTACIJE

Ime i prezime autora: Dragana Milošević

Godina rođenja: 1978

E-mail: dragana.mi@ucg.ac.me

Organizaciona jedinica Univerziteta Crne Gore: Prirodno-matematički fakultet

### Naslov doktorske disertacije:

Morfološka, ekološka i genetička diferencijacija vrsta roda *Rutilus* Raphinesque, 1820 (Teleostei, Cyprinidae) iz Skadarskog jezera

### Prevod naslova na engleski jezik:

Morphological, ecological and genetic differentiation species from genus *Rutilus* Raphinesque, 1820 (Teleostei, Cyprinidae) from Lake Skadar

Datum odbrane: 16.01.2012.

Signatura u Univerzitetskoj biblioteci<sup>1</sup>

Naslov, sažeci, ključne riječi (priložiti dokument sa podacima potrebnim za unos doktorske disertacije u Digitalni arhiv Univerziteta Crne Gore)

Izjava o korišćenju (priložiti potpisanu izjavu)

Napomena

---

<sup>1</sup> Podatak o signaturi (lokaciji) može ispuniti biblioteka organizacione jedinice/Univerzitetska biblioteka

# PODACI POTREBNI ZA UNOS DOKTORSKE DISERTACIJE U DIGITALNI ARHIV UNIVERZITETA CRNE GORE

## Prevod naslova disertacije na engleski jezik

Morphological, ecological and genetic differentiation species from genus *Rutilus* Rafinesque, 1820 (Teleostei, Cyprinidae) from Lake Skadar

## Mentor i članovi komisija (za ocjenu i odbranu)

Dr Drago Marić, red. prof. PMF-a, Univerzitet Crne Gore - mentor  
Dr Vladimir Pešić, red. prof. PMF-a, Univerzitet Crne Gore - član  
Dr Predrag Simonović, red. prof. Biološki fakultet Beograd - član  
Dr Sreten Mandić, naučni savjetnik IBM, Univerzitet Crne Gore - član  
Dr Aleksandar Joksimović, naučni saradnik IBM, Univerzitet Crne Gore - član

## Sažetak\*

Utvrdjivanje nivoa diferenciranosti taksona iz roda *Rutilus* Rafinesque, 1820 koji naseljavaju Skadarsko jezero sprovedeno je analizom sinergistički povezanih obilježja koji imaju ulogu u njihovoj determinaciji i istovremenoj separaciji na nivou osnovne sistematske kategorije. Za rasvjetljavanje taksonomskog problema i pitanja diverziteta vrsta iz roda *Rutilus* koji generalno postoji za vrste prisutne na Balkanskom poluostrvu ispitivani taksoni iz Skadarskog jezera su podvrgnuti komparativnoj analizi sa taksonima iz Ohridskog i Prespanskog jezera. Ovaj rad sadrži rezultate prve sveobuhvatne analize, morfološke i genetičke, vrsta roda *Rutilus* iz tri najveća Balkanska jezera. U radu su predstavljeni de novo klonirani mikrosatelitni lokusi (5 polimorfni i 3 monomorfni) ispitivanog roda, kao i novi set prajmera za amplifikaciju mtDNK cyt b. Sekvenciniranjem cyt b dobijeno je 17 haplotipova, od kojih je za jedan utvrđeno da je ancestralan za ispitivane taksoni. 15 haplotipova je pronađeno po prvi put. Podaci dobijeni analizom seta morfoloških karaktera, gena mitohondijalne DNK (cyt b), fragmenta nuklearne DNK i mikrosatelitnih lokusa dali su snažnu potvrdu modelu simpatrije u Skadarskom jezeru, dok je za Ohridsko i Prespansko jezero utvrđeno prisustvo jednog taksona. Ekološka analiza je potvrdila snažnu diferencijaciju simpatrijskih taksona iz Skadarskog jezera budući da je obezbijedila rezultate koji ukazuju na njihovu diferenciranost u pogledu vremena mrijesta i time dokazala njihovu reproduktivnu izolovanost kao i diferencijaciju u pogledu modela rasta, načina ishrane i habitata koje naseljavaju. Rezultati dobijeni ovim istraživanjem nisu u saglasnosti sa nijednom do sada predloženom taksonomskom šemom za taksoni iz roda *Rutilus* koji naseljavaju Skadarsko jezero i kao posledica toga predložena je revizija vrsta koje naseljavaju stara jezera Balkanskog poluostrva. U pogledu diverziteta vrsta na istraživanim područjima rezultati su u saglasnosti sa jednim od postojećih mišljenja. Reviziona šema taksonomskog rešenja je da: 1) *R. prespensis* naseljava Prespansko i Skadarsko jezero i time gubi dosadašnji status endema Prespanskog jezera, 2) *R. ohridanus* naseljava Ohridsko jezero i dobija status endema, i 3) *R. albus* endemičan za Skadarsko jezero i u simpatriji je sa *R. prespensis*.

## Sažetak na engleskom (njemačkom ili francuskom) jeziku

Establishing the level of differentiation of taxa within genus *Rutilus* Rafinesque, 1820 that inhabit Skadar Lake, has been conducted by the analysis of synergistically connected characteristics that are of importance both for their determination and simultaneous separation on the level of basic systematic category. For clarifying taxonomic problem and diversity issue of *Rutilus* species, that is generally related to all species of Balkan Peninsula, investigated taxa from Skadar lake were subjected to comparative analysis with taxa from Ohrid and Prespa lake. This paper contains results of the first comprehensive morphological and genetic analysis of the *Rutilus* species from the three largest lakes of Balkan Peninsula. In the paper, de novo cloned microsatellite loci (5 polymorphic and 3 monomorphic) of investigated genera have been presented and also new set of primers for amplification of mtDNA cyt b. By cyt b sequencing, 17 haplotypes have been obtained and for one of those has been determined to be ancestral for examined taxa. 15 haplotypes have been found for the first time. Data that has been obtained by the analysis of set of morphological characters, genes of mitochondrial DNA (cyt b), fragments of nuclear DNA and microsatellite loci strongly confirmed sympatric model in Skadar lake, while for Ohrid and Prespa lakes presence of one taxon has been confirmed. Ecological analysis confirmed strong differentiation of sympatric taxa from Skadar lake by providing results that indicate their differentiation regarding spawning time and thus proved their reproductive isolation and differentiation in terms of growth model, nutrition and habitats. The results obtained within this study are not in compliance with any so far proposed taxonomic scheme for taxa of genus *Rutilus* that inhabit Skadar lake and consequently a revision of species that inhabit old lakes of Balkan Peninsula has been proposed. Regarding diversity of species in the investigated area, results are in accordance with one of existing opinions. Revision scheme of taxonomic status is as following: 1) *R. prespensis* inhabits Prespa and Skadar lake and thus loses former status as endemic species of Prespa lake; 2) *R. ohridanus* inhabits Ohrid lake and thus gets status as endemic species and 3) *R. albus* is endemic for Skadar lake and is in sympatry with *R. prespensis*.



Ključne riječi: Balkan, citohrom b, mikrosateliti, morfološki karakteri, simpatričke vrste

Ključne riječi na engleskom jeziku: Balkan, cytochrome b, microsatellites, morphological characters, sympatric species

Naučna oblast/uža naučna oblast: Ihtiologija

Naučna oblast/uža naučna oblast na engleskom jeziku: Ichthyology

Ostali podaci

\* Ukoliko je predviđeni prostor za polja Sažetak, Sažetak na engleskom jeziku, Ključne riječi i Ključne riječi na engleskom jeziku nedovoljan, priložiti ih u posebnom prilogu.

## IZJAVA O KORIŠĆENJU

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku da u Digitalni arhiv Univerziteta Crne Gore unese doktorsku disertaciju pod naslovom:

**Morfološka, ekološka i genetička diferencijacija vrsta roda *Rutilus* Raphinesque, 1820 (Teleostei, Cyprinidae) iz Skadarskog jezera**

koja je moj autorski rad.

Doktorska disertacija, pohranjena u Digitalni arhiv Univerziteta Crne Gore, može se koristiti pod uslovima definisanim licencom Kreativne zajednice (Creative Commons), za koju sam se odlučio/la<sup>1</sup>.

Autorstvo

Autorstvo – bez prerada

Autorstvo – dijeliti pod istim uslovima

Autorstvo – nekomercijalno

Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada

Autorstvo – nekomercijalno – dijeliti pod istim uslovima

Potpis doktoranda



U Podgorici,

10.01.2015

---

<sup>1</sup> Odabrati (čekanati) jednu od šest ponuđenih licenci (kratak opis licenci dat je na poleđini ovog priloga)

**Autorstvo**

Licenca sa najširim obimom prava korišćenja. Dozvoljavaju se prerade, umnožavanje, distribucija i javno saopštavanje djela, pod uslovom da se navede ime izvornog autora (onako kako je izvorni autor ili davalac licence odredio).

Djelo se može koristiti i u komercijalne svrhe.

**Autorstvo – bez prerada**

Dozvoljava se umnožavanje, distribucija i javno saopštavanje djela, pod uslovom da se navede ime izvornog autora (onako kako je izvorni autor ili davalac licence odredio). Djelo se ne može mijenjati, preoblikovati ili koristiti u drugom djelu.

Licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu djela.

**Autorstvo – dijeliti pod istim uslovima**

Dozvoljava se umnožavanje, distribucija i javno saopštavanje djela, pod uslovom da se navede ime izvornog autora (onako kako je izvorni autor ili davalac licence odredio). Ukoliko se djelo mijenja, preoblikuje ili koristi u drugom djelu, prerade se moraju distribuirati pod istom ili sličnom licencom.

Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu djela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.

**Autorstvo – nekomercijalno**

Dozvoljavaju se prerade, umnožavanje, distribucija i javno saopštavanje djela, pod uslovom da se navede ime izvornog autora (onako kako je izvorni autor ili davalac licence odredio).

Komercijalna upotreba djela nije dozvoljena.

**Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada**

Licenca kojom se u najvećoj mjeri ograničavaju prava korišćenja djela. Dozvoljava se umnožavanje, distribucija i javno saopštavanje djela, pod uslovom da se navede ime izvornog autora (onako kako je izvorni autor ili davalac licence odredio). Djelo se ne može mijenjati, preoblikovati ili koristiti u drugom djelu.

Komercijalna upotreba djela nije dozvoljena.

**Autorstvo – nekomercijalno – dijeliti pod istim uslovima**

Dozvoljava se umnožavanje, distribucija, javno saopštavanje i prerada djela, pod uslovom da se navede ime izvornog autora (onako kako je izvorni autor ili davalac licence odredio). Ukoliko se djelo mijenja, preoblikuje ili koristi u drugom djelu, prerada se mora distribuirati pod istom ili sličnom licencom.

Djelo i prerade se ne mogu koristiti u komercijalne svrhe.