

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Ana D. Tošić

**FILOGEOGRAFSKI STATUS I GENETIČKA
STRUKTURA POPULACIJA POTOČNE PASTRMKE
(*Salmo cf. trutta*) ĐERDAPA I TIMOČKE KRAJINE**

doktorska disertacija

Beograd, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Ana D. Tošić

**PHYLOGEOGRAPHIC STATUS AND GENETIC
STRUCTURE OF BROWN TROUT POPULATIONS
(*Salmo cf. trutta*) IN ĐERDAP AND TIMOČKA
KRAJINA REGIONS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016.

MENTOR:

dr Predrag Simonović, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

ČLANOVI KOMISIJE ZA PREGLED, OCENU I ODBRANU:

dr Dušanka Savić Pavićević, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr Tea Tomljanović, docent

Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet

dr Danilo Mrdak, docent

Univerzitet Crne Gore, Prirodno-matematički fakultet

Datum odbrane: _____

ZAHVALNICA

Posebnu zahvalnost dugujem mentoru, prof. dr Predragu Simonoviću najpre na pruženoj prilici za saradnju na projektu, a potom i na ukazanom poverenju tokom istraživačkog rada, na neizmernoj podršci, neophodnim smernicama i svim savetima koje mi je davao tokom izrade doktorske disertacije. Verujem da će mi znanje koje sam od njega stekla biti korisno tokom čitave naučno-istraživačke karijere.

Analiza rezultata ne bi bila moguća bez vrlo posvećene i otvorene prof. dr Dušanke Savić Pavićević i zbog toga joj se od srca zahvaljujem. Rad sa njom bio je čast i ogromno zadovoljstvo.

Takođe se zahvaljujem doc. dr Danilu Mrdaku na konstruktivnim predlozima i korekcijama vezanim za izradu ove teze, kao i doc. dr Tei Tomljanović na izdvojenom vremenu za korisne sugestije.

Hvala Milošu Brkušaninu na neizmernom strpljenju prilikom objašnjavanja laboratorijskih metoda i vremenu koje je žrtvovao tokom laboratorijskih istraživanja.

Zahvaljujem se i prof. dr Saši Mariću na korisnim uputstvima u vezi korišćenja programa za analizu rezultata.

Pored prof. dr Predraga Simonovića, nezaobilazni tim na terenu činile su i prof. dr Vera Nikolić i Dubravka Škraba Jurlina kojima se takođe toplo zahvaljujem na svim vidovima pomoći kako tokom terenskog rada tako i rada u Centru za genotipizaciju ribolovnih resursa. Velika pomoć na terenu stigla je i od Gorana Žikića, zaposlenog u NP Đerdap kako zbog odličnog poznavanja terena tako i zbog neverovatnog znanja i energije.

Naravno, veliku zahvalnost dugujem svojoj porodici. Moja majka, Ljubinka Tošić, koja se i sama bavila naučno-istraživačkim radom iz oblasti medicine učinila je biologiju meni i mojoj sestri interesantnom i bliskom još od malih nogu što je sigurno uticalo na naša dalja usmerenja. Zahvalila bih se svojoj sestri, Vesni Tošić na podršci i pomoći tokom izrade radova u vidu korisnih sugestija, kao i ocu, Dušanu Tošiću od skora profesoru u penziji kome nije bilo teško da pregleda još jednu tezu, ali ovog puta, pored sestrine, sigurno najdražu! Ljilji i Ivanu neizmerno hvala na brizi, razumevanju i strpljenju.

Filogeografski status i genetička struktura populacija potočne pastrmke (*Salmo cf. trutta*) Đerdapa i Timočke krajine

REZIME

Kontrolna regija mitohondrijske DNK pokazala se kao odličan filogeografski marker kad je kompleks potočne pastrmke (*Salmo cf. trutta*) u pitanju. Krajem 20. veka ustanovljeno je pet osnovnih filogeografskih linija (haplogrupa) potočne pastrmke: dunavska, atlanska, mediteranska, jadranska i *marmoratus* koje uglavnom korespondiraju sa odgovarajućim slivovima. Analizirane jedinke na području Srbije nosile su haplotipove dunavske, atlanske i jadranske haplogrupe. Najdominantniji haplotip u slivu Crnog Timoka i rekama desne obale Dunava u Đerdapskom regionu pripadao je dunavskoj liniji i opisan je pod imenom Da23c (ACCN KC630984). Obzirom da je ovaj haplotip zasada otkriven samo u ovoj oblasti i to sa velikom učestalošću smatra se autohtonim za ovu regiju. U okviru Đerdapskog regiona uočen je i haplotip Da1, ali samo u Rečkoj reci u njenom desnom delu iznad nepremostive prepreke, vodopada visine 10 m. Kao pleziomorfni u odnosu na haplotip Da23c i široko rasprostranjen na ovom delu Balkanskog poluostrva postoji velika verovatnoća da je i on autohton za ovo područje, međutim nije isključena ni mogućnost da je unesen poribljavanjem. U okviru sliva Crnog Timoka osim autohtonog haplotipa Da23c otkriven je i Da2, koji je najverovatnije alohton. U prilog tome govore činjenice o rasprostranjenju haplotipova na zapadnom Balkanu, kao i podaci o korišćenju jedinki ovog haplotipa za poribljavanje i gajenje u Austrougarskoj, a kasnije u celoj Evropi i Srbiji. Osim dunavske u okviru šireg područja Đerdapa otkriveno je i prisustvo atlanske linije u rekama Brnjica, Dobrinjska, Porečka i Vratna, a samo u poslednjoj jedinke atlanskog haplotipa koegzistiraju sa pastrmkama koje nose autohtoni haplotip, Da23c. Atlanski haplotip ne smatra se autohtonim za Balkansko poluostrvo, pa je najverovatnije u reku Vratnu dospelo poribljavanjem, a analize jedarnog gena, laktat dehidrogenaze, pokazale su da se ove jedinke međusobno ukrštaju. Programske analize podataka osam mikrosatelitskih lokusa ukazale su na postojanje pet izdvojenih populacija u regionu severoistočne Srbije: sliv Crnog Timoka, reka Kožica, reka Rečka, reke Vratna i Zamna zajedno i reke Mala Boljetinska i Zlatica zajedno, što ukazuje na verovatnu komunikaciju i protok gena između

ovih populacija. Mere upravljanja ovim ribolovnim područjima isključuju poribljavanje, jer trenutno ne postoji veštački mrest gde se koristi genetički materijal autohton za ovu oblast. Postojanje autohtonog haplotipa za ovu oblast može biti od velikog konzervacionog značaja, takođe prisustvo atlanskog haplotipa u pojedinim rekama predstavlja ozbiljnu pretnju autohtonom genofondu, pa je hitnost u preduzimanju odgovarajućih konzervacionih koraka utoliko veća. Dalje praćenje strukture populacija koji čine ovaj deo genofonada predstavlja samo jedan od njih.

Ključne reči: kontrolna regija, mikrosateliti, Đerdap, Timočka krajina, brown trout, conservation

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Morfologija, sistematika i filogenija

UDK broj: [57.088.7:591.93]:597.552.512(497.11)(043.3)

Phylogeographic status and genetic structure of brown trout populations (*Salmo cf. trutta*) in Đerdap and Timočka krajina regions

ABSTRACT

Control Region of mitochondrial DNA is a good phylogeographic marker for brown trout species complex (*Salmo cf. trutta*). Five main brown trout phylogeographic lineages (haplogroups) that mostly correspond to the particular basins have been established at the end of 20th century: Danubian, Atlantic, Mediterranean, Adriatic and *marmoratus*. Individuals from Serbia held haplotypes of Danubian, Adriatic and Atlantic haplogroups. Prevailing haplotype in the River Crni Timok drainage area and in the right tributaries of the River Danube from Đerdap region is Da23c (ACCN KC630984) of Danubian haplogroup. This haplotype is considered indigenous there since it has been found only in this area and with a great frequency. Another haplotype also detected in the Đerdap region is Da1, but only in the River Rečka, in its right fork above the 10 m high waterfall, which is an impassable obstacle for upstream dispersal of brown trout from downstream section. Considering its plesiomorphic character compared to haplotype Da23c and its wide distribution in this part of Balkan Peninsula, there is a high probability that it is indigenous for this region, as well. However, the possibility that it has been imported by stocking activities cannot be excluded. In addition to the indigenous haplotype Da23c, the haplotype Da2 was also detected in the Crni Timok drainage area, probably as an allochthonous one. This was supported by haplotype distribution in Western Balkans, as well as by history of stocking and breeding with the Da2 haplotype in Austria-Hungary and later, both in middle and southeastern Europe, including Serbia. Individuals of the Atlantic haplogroup were detected in rivers Brnjica, Dobrinjska, Porečka and Vratna of the broader Đerdap area. Only in the last river these individuals coexist in sympatry with brown trout of indigenous Da23c haplotype. Since Atlantic haplotype was not considered indigenous for Balkan Peninsula, it has been probably introduced there by stocking. Analysis of nuclear gene lactate dehydrogenase showed that individuals of two lineages occurring in sympatry interbreed. Data software analyzes of eight microsatellite loci revealed the existence of five separated populations in Eastern Serbia: (1) Crni Timok drainage area, (2) River Kožica,

(3) River Rečka, (4) Rivers Vratna and Zamna, and (5) River Mala Boljetinska and River Zlatica, indicating a potential communication and gene flow between these populations. Management of fisheries in these areas must not include stocking activities, since no indigenous stocking material for them is available. The existence of indigenous haplotype in this area could be of a great conservational importance. The urgency in taking conservational steps is even greater considering that presence of Atlantic haplotype in some rivers poses a serious threat to indigenous gene pools. Further monitoring of genetic structure is one of those steps.

Key words: Control region, microsatellites, Đerdap, Timočka krajina, potočna pastrmka, konzervacija

Scientific field: Biology

Specific scientific field: Morphology, systematics and phylogeny

UDC number: [57.088.7:591.93]:597.552.512(497.11)(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. BIOLOGIJA I EKOLOGIJA VRSTE <i>SALMO TRUTTA</i> L.	1
1.1.1. Morfoanatomske karakteristike	1
1.1.2. Stanište i rasprostranjenost.....	2
1.1.3. Životni ciklus i ishrana.....	3
1.1.4. Sistematika i taksonomija.....	4
1.1.5. Genetika	10
1.1.6. Populaciona ekologija i parcijalna migratornost	15
1.1.7. Ugroženost i konzervacija vrste	17
1.2. GENETIČKI MARKERI	23
1.2.1. Mitohondrijska DNK.....	23
1.2.2. Mikrosatelitska DNK.....	30
1.3. MATEMATIČKA ANALIZA GENETIČKE VARIJABILNOSTI.....	34
1.4. ANALIZIRANA PODRUČJA.....	35
1.4.1. Područje Nacionalnog parka Đerdap	35
1.4.2. Područje Timočke krajine	42
1.5. CILJEVI RADA	43
2. MATERIJALI I METODE	44
2.1. PRIKUPLJANJE MATERIJALA	44
2.2. LABORATORIJSKE ANALIZE	48
2.2.1. Ekstrakcija DNK.....	48
2.2.2. Agarozna gel elektroforeza.....	49
2.2.3. Amplifikacija lančanom reakcijom polimeraze.....	51
2.2.4. RFLP analiza	54
2.2.5. Sekvenciranje kontrolnog regiona mitohondrijske DNK	54
2.2.6. Fragment analiza mikrosatelitskih lokusa	55
2.3. SOFTVERSKIE ANALIZE.....	55
2.3.1. Programska analiza kontrolne regije mitohondrijske DNK	56
2.3.2. Programska analiza mikrosatelitskih lokusa	57
3. REZULTATI	59
3.1. ANALIZA MITOHONDRIJSKE DNK	59
3.2. ANALIZA <i>LDH*^C</i> LOKUSA.....	63
3.3. ANALIZA MIKROSATELITSKIH LOKUSA.....	64
4. DISKUSIJA	79
5. ZAKLJUČAK	87
6. LITERATURA	89
7. PRILOZI	116

1. Uvod

1.1. Biologija i ekologija vrste *Salmo trutta* L.

1.1.1. Morfoanatomske karakteristike

Potočna pastrmka (*Salmo trutta*) je reofilna vrsta srednje veličine, obično oko 400 mm dužine i vretenastog oblika tela (Slika 1). Sa dorzalne i lateralne strane tela, kao i na operkulumima, postoje crne i crvene pege, a kod juvenilnih jedinki i nekoliko tamnijih poprečnih pruga (eng. *parr marks*). Fenotipska plastičnost je vrlo izražena, tako da osnovna boja tela dosta varira u zavisnosti od staništa. Takve promene u morfologiji se smatraju adaptivnim i povećavaju potencijal preživljavanja u datim sredinskim uslovima (Kinnison i Hendry, 2004). Raspored i broj ovih pega često je korišćen kao taksonomski karakter iako to pojedini naučnici tretiraju kao “neobično shvatanje morfologije” (Kottelat i Freyhof, 2007). Iza leđnog peraja nalazi se još jedno, adipozno ili masno peraje koje u sebi ne nosi žbice i prepoznatljiva je karakteristika čitave grupe. Pretpostavlja se da je njegova funkcija u smanjivanju turbulencije vode, slično zapercima tuna i skuša (Simonović, 2010). Repno peraje je ravno kod jedinki većih od 200 mm, a konkavno kod manjih predstavnika. Sitne krljušti, koje su gotovo kružnog oblika, prekrivaju celo telo osim glave. Bočna linija postoji i u sebi nosi od 112-132 krljušti. Zadnji kraj gornje vilice prelazi zadnju ivicu oka. Kosti gornje i donje vilice su nazubljene. Na vomeru, u gornjoj vilici, nalazi se 2-6 nizova zuba u prednjem delu, dok je u zadnjem samo jedan niz (Simonović, 2001). Ovo je važan taksonomski karakter za identifikaciju pastrmskih vrsta, kao i broj branhiospina koji kod potočne pastrmke iznosi od 14-16 kratkih nastavaka. Riblji mehur postoji i dobro je razvijen. Broj piloričnih cekuma se kreće od 40-100, a sam želudac je snažno mišićav što predstavlja adaptaciju na karnivorni tip ishrane.

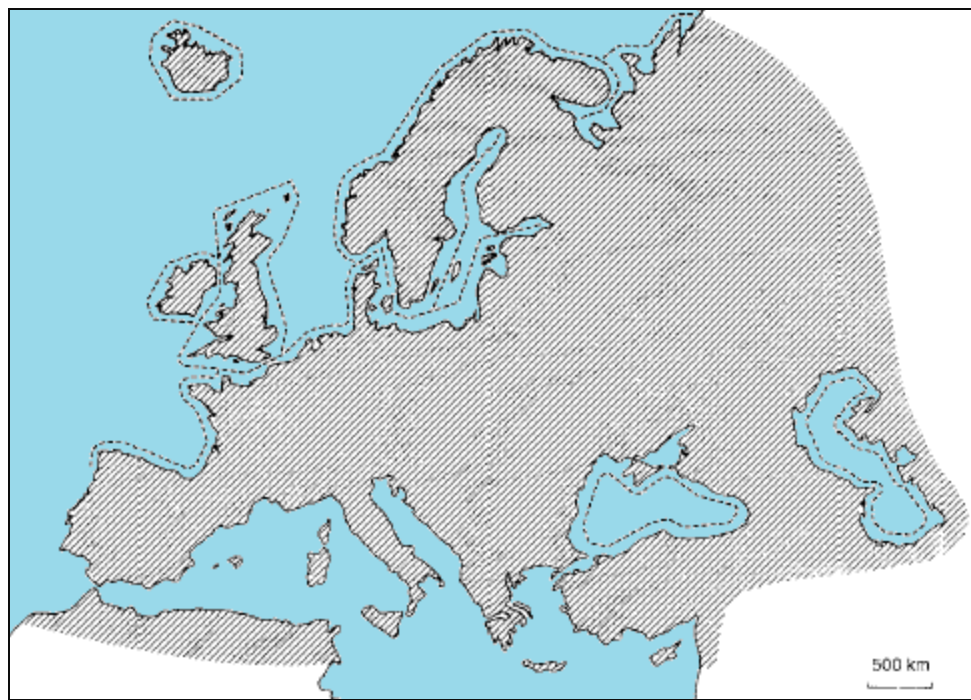


Slika 1. Morfologija potočne pastrmke (foto: Tošić).

1.1.2. Stanište i rasprostranjenost

Kao i sve vrste iz porodice Salmonidae i potočna pastrmka naseljava bistre i hladne vode, čija se temperatura kreće oko 10°C i koje obiluju kiseonikom. Ovo mogu biti visokoplaninska jezera ili gornji tokovi reka sa velikom brzinom vode, a jedinke koje su migratorne, u jednom delu životnog ciklusa naseljavaju i morsku vodu. Uglavnom živi u području umereno kontinentalne klime, ali i u borealnoj zoni. Postoje nesuglasice kada je u pitanju autohtoni areal potočne pastrmke. Kottelat i Freyhof (2007) smatraju da je ona autohtona samo u severozapadnom delu Evrope, odnosno od Španije do Češkog zaliva u Barentovom moru u Rusiji tako da se može naći u Atlantiku, Severnom, Baltičkom i Belom moru i da je introdukcijom dospela u ostale delove Evrope. Ipak, daleko je prisutniji stav (MacCrimmon, 1968; Behnke, 1986; Elliott, 1994; Berra, 2001) da je potočna pastrmka autohtona za vode Evrope, Azije i severnog dela Afrike (Slika 2). Ovakva različita gledišta nastaju i usled taksonomskog problema o kojem će biti više reči kasnije. Naime, Kottelat i Freyhof (2007) latinsko ime *Salmo trutta* koriste isključivo za atlantsku pastrmku (eng. *atlantic trout*) iako se ovaj naziv koristi od davnina i za rezidentne, ali i za anadromne crnomorske i kaspijske oblike. Kako je veći deo severozapadne Evrope bio pod ledom tokom poslednje glacijacije (pre oko 70 000 godina), rezidentne populacije u ovoj oblasti su najverovatnije nastale od migratornih pre oko 13 000 godina, u periodu kad se led povlačio (Elliott, 1994). Introdukcije van ovog nativnog areala počele su još u 19. veku kada je potočna pastrmka prenetu u Istočnu Rusiju, Australiju, Novi Zeland i Kanadu, a

zatim i Severnu i Južnu Ameriku, kao i preostale delove Azije i Afrike (Klemetsen i sar. 2003).



Slika 2. Distribucija potočne pastrmke. Isprekidane linije predstavljaju prisustvo anadromnih oblika (Preuzeto iz Elliott 1994).

1.1.3. Životni ciklus i ishrana

Mrest se odvija u slatkoj vodi, bez obzira da li su u pitanju rezidentne ili anadromne forme (ili populacije) i traje od oktobra do februara, ali najčešće u novembru i decembru. U doba mresta mužjacima se lobanja izdužuje i pojavljuje im se kukast izraštaj na donjoj vilici, a ženke koje su pune zrele ikre imaju nabubrela stomak i upadljivi, crveni polni otvor. Mreste se u parovima, ženka bira mesto za mrest na šljunkovitom terenu gde kopa trlo (eng. *redd*) u koje polaže od 500 do 30 000 jaja (Simonović, 2001) koje posle oplodjenja zatrpava šljunkom (Kottelat i Freyhof, 2007). Najčešće se mreste u brzim vodama, mada je povremeno zabeležen i mrest u jezerima (Klemetsen, 1967; Sneider, 2000). Ikru retko polažu na kamenoj podlozi, a anadromne jedinke ikru polažu blizu obale mora i ušća reke iz koje potiču. Mužjaci brane ikru i ženku od ostalih mužjaka (Kottelat i Freyhof, 2007).

Srednja dubina trla je najbolja za mlad: ukoliko je previše plitko, voda može lako odneti jaja, a ukoliko je previše duboko, može nastati problem sa nedostatkom kiseonika. Dubina trla najviše zavisi od veličine ženke. Po završetku mresta ženke odlaze, dok mužjaci ostaju još neko vreme na mestu mresta (Klemetsen i sar. 2003). Jaja su veličine 4.5 do 5 mm u prečniku. Period razvića u jajetu traje od 6 do 8 nedelja, zatim se embrioni izvaljuju i nastaju prelarve (eng. *alevin*) povezane sa žumancetnom kesom koje se ograničeno kreću u šljunkovitoj podlozi od 4 do 6 nedelja, posle čega proplivaju (eng. *parr*) i počinju ishranu planktonskim i bentosnim račićima (Simonović, 2001). Posle godinu dana dostižu dužinu oko 10 cm, a nakon dve godine i do 25 cm (Jevtić, 1989). Postaju polno zrele posle 2-3 godine, a mogu živeti i do 20 godina (Sømme 1941). Kod anadromnih populacija, dešavaju se morfološke i fiziološke promene (formiranje α -hlornih ćelija škruga itd.) zbog slane vode kojima će biti izloženi u okeanima, pa za ove sasvim drugačije juvenile postoji i određen naziv (eng. *smolt*), kao i za ženke koje su tek izbacile ikru (eng. *kelt*) (Simonović, 2010). Adulti su iteroparni i mreste se bar dva do tri puta u toku života (Elliott, 1994). Obično jedinke koje ranije postanu polno zrele kraće žive, što predstavlja „cenu“ reprodukcije (Wootton, 2000). Odrasle jedinke hrane se makrozoobentosom, insektima sa površine vode, najviše iz grupa Ephemeroptera, Trichoptera, Plecoptera i Simuliidae (Jonsson i Gravem, 1985; Steingrimsson i Gislason, 2002), ali i manjim ribama i njihovom ikrom (Simonović, 2001). Potočna pastrmka je poznata po oportunističkoj ishrani, koja varira u zavisnosti od staništa, sezone i veličine riba (Bridcut i Giller, 1995), najviše se pri ishrani oslanja na vid, pa je providnost vode od velikog značaja.

1.1.4. Sistematika i taksonomija

Taksonomski problemi vezani za potočnu pastrmku počeli su pre više od 250 godina, 1758. godine kada je Karl Line opisuje latinskim imenom *Salmo trutta*, međutim uvidevši razlike između migratornih i rezidentnih oblika, zadržava originalni naziv samo za rečni oblik, dok morski i potočni naziva *S. eriox* i *S. fario*, respektivno (Elliott, 1994). Od tada klasifikovana je pod mnogim drugim, kako latinskim tako i narodnim imenima, tako da je do kraja 20. veka opisano 50 varijeteta potočne pastrmke (Behnke, 1986). Karl Line se najviše služio klasičnom tipološkom koncepcijom vrste, dok su danas poznate i

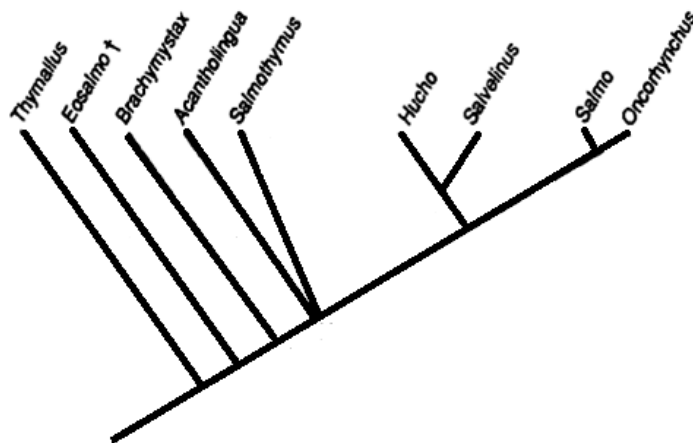
evolucionarna, filogenetska i biološka koncepcija. Evolucionarna i filogenetska se oslanjaju na istorijske dimenzije, dok biološka koncepcija definiše vrstu kao reproduktivno izolovanu od drugih takvih grupa (Tucić, 2003). S obzirom da ovi pristupi definišu vrstu na različite načine, naučnici mogu u okviru jedne grupe, u zavisnosti od koncepcije koju primenjuju opisati različit broj vrsta, što je slučaj i sa pastrmskim vrstama.

Potočna pastrmka pripada porodici Salmonidae, redu Salmoniformes, nadredu Protacanthopterygii, infraklasi Teleostei i potklasi Actinopterygii u okviru klase Osteichthyes. Prema pojedinim autorima (Simonović, 2001; Kottelat i Freyhof, 2007), u okviru porodice Salmonidae ne postoji podela na podporodice, pa ovde spadaju samo pastrmke, lososi, mladice, lenok i zlatovčice bez lipljena i ozimica, dok se prema tradicionalnoj klasifikaciji (Starley i Smith, 1993; Crisp, 2000; Klemetsen i sar. 2003) u okviru ove porodice mogu prepoznati tri podporodice: Coregoninae, Thymallinae i Salmoninae. Poslednja podela prisutna je u okviru univerzalnog taksonomskog informacionog sistema - ITIS (eng. Integrated Taxonomic Information System, 2003). Oko broja rodova i vrsta u okviru podporodice Salmoninae takođe postoji više različitih mišljenja. Crespi i Fulton (2004) razlikuju pet rodova u ovoj grupi, Nelson (2006) sedam, dok Stearley i Smith (1993) izdvajaju sedam recentnih rodova i jedan fosilni *Eusalmo*[†]. Ovaj fosilni rod sa predstavnikom *E. driftwoodensi* posedovao je intermedijarne osobine pastrmki i lipljena i prvi je poznati fosil pastrmskih vrsta čija je starost procenjena na 50 miliona godina (Wilson, 1977). Generalno, svi se slažu oko postojanja rodova: *Brachymystax*, *Hucho*, *Oncorhynchus*, *Salmo* i *Salvelinus*, od kojih su poslednja tri najbolje izučena, a vrste jezerska zlatovčica *Salvelinus alpinus*, atlantski losos *Salmo salar* i pastrmka predstavljaju najviše analizirane vrste riba u nauci (Klemetsen i sar. 2003). Pored ovih rodova, pojedini naučnici prihvataju i sledeće: *Acantholingua*, *Salmothymus*, *Parahucho*, *Plathysalmo*, *Parasalmo* i *Salvethymus*.

1.1.4.1. Morfološke metode u analizi filogenetskih odnosa porodice Salmonidae

Filogenetski odnosi unutar podporodice bazirani su u prošlosti pre svega na morfološkim analizama, a njihova interpretacija se razlikovala među naučnicima. Norden

(1961) smatra da su zlatovčice, *Salvelinus* sestrinska linija kladi koja obuhvata *Salmo* i *Oncorhynchus*, dok ih Kendall i Behnke (1984) smeštaju bliže rodu *Hucho* i *Brachymystax*, a Dorofeyeva (1989) smatra da su *Salmo* i *Salmothymus* jedna klada kojima je sestrinska *Oncorhynchus*, a da je *Salvelinus* sestrinska sa rodovima *Hucho* i *Brachymystax*. Starley i Smith (1993) analiziraju filogenetske odnose između osam rodova podporodice Salmoninae (jedan od njih je fosilni, *Eosalmo*[†]) na osnovu 119 različitih morfoloških karaktera. Smatraju da su *Hucho*, *Salvelinus*, *Salmo* i *Oncorhynchus* evolutivno mlađi od *Brachymystax*, *Salmothymus*, *Acantholingua* i *Plathysalmo* (na kraju priključen rodu *Salmothymus*) koje smatraju arhaičnim. Rod *Parasalmo* je uveo Vladykov (1963) za pacifičke pastrmke, pokušavajući da reši taksonomski problem koji je razdvajao pacifičke losose od pacifičkih pastrmki. Ipak, time nije rešen filogenetski problem koji svrstava pacifičke pastrmke bliže rodu *Oncorhynchus*, a ne rodu *Salmo* kako je do tad bilo (Starley i Smith, 1993). Morfološke analize (Starley i Smith, 1993) potvrdile su bliskost pacifičkih pastrmki i lososa (*Oncorhynchus*) sa atlanskim lososima i pastrmkama (*Salmo*). Njima sestrinska grana nosi rodove *Hucho* i *Salvelinus*, a najudaljeniji recentni rod je *Brachymystax* (Slika 3).

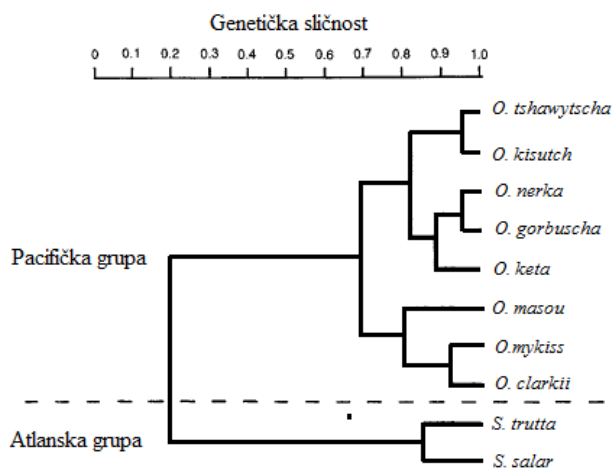


Slika 3. Filogenetski odnosi u okviru podporodice Salmoninae prema Starley i Smith (1993).

Četiri morfološke osobine izdvojile su rod *Salmo* u odnosu na ostale: široki dermetmoideum oblika dijamanta, prisustvo središnjeg nastavka na premaksilarnoj kosti, jako izražen kukast izraštaj na donjoj vilici mužjaka i uzak subooperkulum, dok se potočna pastrmka izdvaja po postojanju manje od 10 branhiostegalija. Monotipski rod *Salvethymus* u jezeru El'gygytgyn u Sibiru, sa jednom vrstom *S. svetovidovi*, izdvojen je usled posedovanja velike kariotipske i morfološke različitosti (Chereshnev i Skopets, 1990).

1.1.4.2. Molekularne metode u analizi filogenije porodice Salmonidae

Postepeno se taksonomija i filogenija sve više oslanjaju na molekularne metode kojima naučnici pokušavaju da reše ove kompleksne odnose između rodova i vrsta. Prva opširnija testiranja na alozimima vršili su Ferguson i Fleming (1983) i Cross (1989), gde je potvrđena srodnost između atlanskog lososa i potočne pastrmke, kao i njihova udaljenost od ostalih rodova (Slika 4).



Slika 4. Analizom alozima otkriveni su odnosi između vrsta porodice Salmonidae prema Ferguson i Fleming 1983; Cross 1989.

Analizom mitohondrijske DNK (mtDNK) potvrđuju se ovi zaključci (Berg i Ferris, 1984; Gyllensten i Wilson, 1987). Koristeći dva regiona mtDNK, citohrom b (*Cytb*) i kontrolni region (CR), kao molekularne markere, Snoj i sar. (2002) su utvrdili da je genetička distanca između rodva *Salmothymus*, *Acantholingua* i *Salmo* vrlo mala i da svi

zapravo spadaju u jedan rod – *Salmo*, što je u skladu sa molekularnim analizama rađenim na dupliranim jedarnim genima za hormon rasta (*GH1* i *GH2*) (Phillips i sar. 2000, 2004). Phillips i Oakley (1997), kao i Oakley i Phillips (1999), koristeći C intron gena *GH2* (*GH2C*), u više navrata potvrđuju parafiliju u rodu *Hucho* ukoliko je *Hucho perryi* uključen u analizu. Oni ističu neophodnost izdvajanja ovog monotipskog roda *Parahucho* kao monofiletskog, iako ga je Vladykov (1963) pregrupisao u rod *Hucho*. Takođe, Oakley i Phillips (1999) otkrivaju nov položaj roda *Brachymystax*, kao mlađeg, u okviru grane roda *Hucho*. Molekularne analize koje se tiču roda *Salvethymus* su malobrojne (Phillips i Oakley, 1997; Brunner i sar. 2001), ali ukazuju na blisko grupisanje ovog monotipskog roda u okviru grupe *Salvelinus* i to kao ishodišne vrste za *S. alpinus* (Brunner i sar. 2001).

Ukupan broj vrsta u okviru Salmoninae kreće se od oko 20 (Norden, 1961; Behnke, 1968; Kendall i Behnke, 1984, Nelson, 2006) do 100 (ITIS, <http://www.itis.gov>, 2016) i više, pa i broj vrsta u okviru roda *Salmo* varira u zavisnosti od koncepcije vrste koja se primenjuje. Tako Kottelat i Freyhof (2007) samo u okviru roda *Salmo* prepoznaju 29 vrsta, slično kao i ITIS, iako ovde nisu uključene novoopisane vrste (u periodu od 2005 do 2012. godine) vezane za afrički i azijski kontinent (*Salmo akairos*, *S. coruhensis*, *S. rizeensis*, *S. tigridis*, *S. labecula*, itd.), dok Crisp (2000) prihvata postojanje samo dve vrste u okviru ovog roda: *S. trutta* i *S. salar*. Prema prvom gledištu, Balkanskom poluostrvu pripadaju sledeće vrste: visovačka pastrmka, *S. visovacensis* (Taler, 1950), mekousna pastrmka, *S. obtusirostris* (Heckel, 1851), *S. farioides* (Karaman, 1938), zubatak, *S. dentex* (Heckel, 1851), *S. taleri* (Karaman, 1933), *S. montenigrinus* (Karaman, 1933), belvica, *S. ohridanus* (Steindachner, 1892), ohridska, *S. letnica* (Karaman, 1924), *S. lumi* (Poljakov i sar. 1958), letnica, *S. aphelios* (Kottelat, 1997), struška pastrmka, *S. balcanicus* (Karaman, 1927), peristerska pastrmka, *S. peristericus* (Karaman, 1938), zrmanjska pastrmka, *S. zrmanjaensis* (Karaman, 1938), makedonska pastrmka, *S. macedonicus* (Karaman, 1924), pelagonijska pastrmka, *S. pelagonicus* (Karaman, 1938), *S. lourosensis* (Delling, 2011), crnomorska pastrmka, *S. labrax* (Pallas, 1814) koje se prema reproduktivnoj izolaciji, kao osnovnom kriterijumu biološkog koncepta vrste, pre mogu posmatrati kao kompleks vrsta *S. trutta* (Simonović, 2001). Filogenetski odnosi i statusi pojedinih od ovih vrsta dosta su

izučavani, ali za mnoge još uvek nije sigurno da li su dobre vrste. Tako sa za *S. dentex* dugo smatralo da jeste, ipak, ispostavilo se da u Crnoj Gori ona predstavlja jezerski oblik *S. farioides* koji se naziva i strun (Mrdak i sar. 2006), dok je u Bosni i Hercegovini to jezerska forma glavatice *S. marmoratus*. Čak ni status vrste *S. marmoratus* nije u potpunosti rasvetljen: rezultati analize mtDNA Sušnik i sar. (2004) govore da ova vrsta zajedno sa *Salmo (Platysalmo) platycephalus* ulazi u sastav filogenetskog kompleksa potočne pastrmke. Molekularnim analizama kod *S. taleri* utvrđen je isti mitohondrijski haplotip kao i u rekama savskog sliva – Da1 (Simonović i sar. 2015a) na osnovu čega se može zaključiti da bi crnomorske potočne pastrmke iz Tare, Lima, Pive, Čehotine, Drine, a verovatno i iz celog sliva Save, trebalo smatrati posebnim u okviru kompleksa potočne pastrmke.

Različite adaptivne osobine potočne pastrmke učinile su taksonomsku situaciju još složenijom. Naime, prema ponašanju i izgledu tradicionalno su prepoznavana tri osnovna oblika: morski - *Salmo trutta* morpha *trutta (marinus)*, jezerski - *Salmo trutta* morpha *lacustris* i rečni - *Salmo trutta* morpha *fario*. Svi navedeni oblici mreste se u rekama, ali jedino je morska pastrmka anadromna i jedan deo života provodi u morima radi ishrane. Jezerski oblik odlazi u jezera u jednom delu životnog ciklusa, dok je rečni oblik jedini rezidentan, a migrira samo u okviru samog rečnog toka koji naseljava. Međutim, jedinke koje pripadaju različitim oblicima, uglavnom nisu reproduktivno izolovane, pa više oblika može postojati i u okviru jedne populacije, koja se tada označava kao parcijalno migratorna.

Kako bi prevazišli taksonomske probleme nastale usled velike fenotipske plastičnosti adaptivnih osobina potočne pastrmke, Bernatchez i sar. (1992) su u analizu dela CR mtDNK (640 baznih parova, bp) uključili sve tri ekološke forme (rečnu, jezersku i morsku), kao i glavaticu (*Salmo marmoratus*), gardsku (*Salmo carpio*), letnicu (*Salmo letnica*) i korzikansku pastrmku (*Salmo macrostigma*). Na osnovu dobijenih rezultata analize 24 populacije pastrmki iz atlantskog, dunavskog, sredozemnog i jadranskog sliva, autori su 12 novootkrivenih haplotiova razvrstali u pet filogenetskih haplogrupa – linija koje su mahom odgovarale geografskom poreklu populacija: sredozemna ili mediteranska (ME), jadranska (AD), dunavska (DA), atlantska (AT) i *marmoratus* (MA) linija.

Sekvenciranje celog CR mtDNK populacija potočne pastrmke Iberijskog poluostrva i severne Afrike vršili su Suárez i sar. (2001). Oni povećavaju broj do tada opisanih pet glavnih evropskih mtDNK grupa dodajući još jednu, endemičnu grupu ograničenu na Duero bazen Iberijskog poluostrva (DU, Duero). Bardakci i sar. 2006. ovim grupama pridodaju i sedmu, Tigris liniju (TI) iz severoistočne Anatolije, za populacije iz sliva Tigrisa koja kasnije biva opisana kao posebna vrsta *S. tigridis* (Turan i sar. 2011).

Prema Pustovrh i sar. (2014), analizom više od 20 lokusa jedarne DNK utvrđeno je da bi odgovarajuća taksonomska situacija izgledala ovako: naziv *S. trutta* bi trebalo da se odnosi isključivo na linije sa AT haplotipom, a *S. labrax* na DA haplotip što bi bilo u skladu sa predloženom taksonomijom Kottelat i Freyhof 2007. Kod ostalih mitohondrijskih haplotipova (AD, ME i MA linije) situacija nije najjasnija, ali je ipak u Krki i Zrmanji otkriveno nekoliko značajnih filogenetskih podgrupa koje u potpunosti odgovaraju distribuciji vrsta *S. visovacensis* Taler, 1950 i *S. zrmanjensis* Karaman, 1938. Njihove rezultate potvrdila su istraživanja Sušnik i sar. (2007) vezana za ohridsku pastrmku (*S. letnica*). Takođe se i kod *marmoratus* linije mogu uočiti jasno definisane geografske podgrupe. Kao što je već pomenuto, *S. dentex* predstavlja samo adaptivni oblik neretvanske glavatice. Neophodna su dalja istraživanja kako bi se utvrdilo da li glavaticu treba odvojiti u dve geografski izolovane sestrinske vrste. Dalje morfološke analize su neophodne, ali verovatno je svaka od ovih linija evoluciono značajna jedinica (eng. *evolutionarily significant units*, ESUs, videti detaljnije u poglavlju 1.1.7).

1.1.5. Genetika

Krajem dvadesetog veka radovi iz oblasti genetike porodice Salmonidae su sve brojniji, najviše zbog korišćenja ove grupe u akvakulturi (Elliott, 1994). Citogenetika i kariologija su u početku bile više zastupljene od molekularnih metoda, ali se od 1970. sve više koristi elektroforeza u analizi proteina i DNK, a posle 1990. i savremenije metode poput lančane reakcije polimeraze (eng. *polimerase chain reaction*, PCR) (Mullis i sar. 1986), sekvenciranja (utvrđivanja redosleda nukleotida) i analize dužine fragmenata. Tipičan broj hromozoma kod predstavnika potočne pastrmke iznosi $2n = 80$ (Cappana i sar.

1973; Gharbi i sar. 2006), mada se prema istraživanjima Hartley (1987) ovaj broj može kretati od 77 do 82, ali to, takođe, zavisi od koncepcije vrste koja se primenjuje. Broj hromozomskih kraka (NF - *nombre fundamental*) je oko 100, što ukazuje na činjenicu da je više hromozoma akrocentrično i telocentrično nego submetacentrično (Hartley, 1987). Za razliku od potočne pastrmke, losos koji pripada istom rodu poseduje $2n = 58$ (NF = 74), dok lipljen poseduje $2n = 102$ (NF = 170). Prisustvo multivalenata je karakteristično za metafazu mejoze I i to isključivo kod mužjaka, dok se kod ženki uočavaju bivalenti u pahitenu (Hartley, 1987). Prisustvo multivalenata jedan je od razloga zašto se ova vrsta, kao i čitava porodica Salmonidae, smatra tetraploidnom (Ohno i sar. 1969). Pored toga, kod različitih pastrmskih vrsta, analiziran je i sadržaj DNK, broj prisutnih hromozomskih kraka kao i broj dupliranih genskih lokusa. Prvi je Svärdson (1945) ukazao na mogućnost poliploidnog porekla pastrmskih riba pretpostavljajući da je ancestralni haploidni broj hromozoma $n = 10$ (Allendorf i Thorgaard, 1984). Tako bi dužičasta pastrmka, *Oncorhynchus mykiss* i atlanski losos bili heksaploidi, lipljeni dekaploidi, a potočna pastrmka oktaploid. Ipak, Ohno i saradnici (1969, 1970) su mnogobrojnim analizama definitivno pokazali da se radi o tetraploidiji i dizomičnom, a ne tetrazomičnom načinu nasleđivanja. Tačan period tetraploidnog događaja nije precizno utvrđen. Analizom dupliranih lokusa za laktat dehidrogenazu (*LDH-C1** ili *Ldh-5*) i starosti prvih fosila porodice Salmonidae (Allendorf i Thorgaard, 1984), ustanovljeno je da je u pitanju period između 25 i 100 miliona godina. Kariotip prvog pretka porodice Salmonidae je, najverovatnije, posedovao 48 akrocentričnih hromozoma, pa je tako prvi tetraploidni predak imao 96 akrocentričnih hromozoma, čijom je fuzijom nastalo više metacentričnih hromozoma (Hartley, 1984).

U cilju otkrivanja genetičkih razlika, osim citogenetike, često su korišćeni i pomenuti morfološki karakteri (Elliott, 1994). Usled nepoznavanja jasne povezanosti genotipa i fenotipa, morfološke osobine često su bile nepouzidane i vodile do pogrešnih zaključaka (Lewontin, 1984). Kako bi se prevazišli ovi problemi, bilo je neophodno analizirati različite alele na odabranim lokusima, direktno analizom DNK ili indirektno analizom proteina (Ferguson, 1981). Ovakvi markeri postali su dostupni nakon 1970.

godine uvođenjem elektroforetskih metoda (Elliott, 1994). Na ovaj način se mogu ispitati razlike u strukturama izozima - proteina koji su produkti različitih gena, ili alozima - koji su produkti različitih alela istog gena. Do kraja dvadesetog veka analizirano je više od 100 izozima u okviru porodice Salmonidae. Ukoliko se prate razlike među vrstama, informativniji su fiksirani, monomorfni, autapomorfni lokusi, dok su u okviru vrste informativniji polimorfni lokusi.

U svom opširnom pregledu genetičke varijabilnosti populacija pastrmki severozapadne Evrope, korišćenjem alozima, Ferguson (1989) otkriva postojanje velike geografske heterogenosti u učestalosti alela. Takođe otkriva veliki procenat polimorfnih lokusa: od 70 analiziranih, 38 su polimorfni, sa polimorfizmom od 16% u prosečnoj populaciji, što čini potočnu pastrmku jednim od najpolimorfnijih od svih kičmenjaka (Ferguson, 1981, 1989).

Alozimske analize korišćene su i za poređenje atlanskih i mediteranskih populacija (Apostolidis i sar. 1996a), utvrđivanje statusa glavatice (*Salmo marmoratus*) i analize populacija pastrmki kaspijskog i crnomorskog sliva (Osinov, 1989). Na ovaj način utvrđena je mala genetička varijabilnost potočnih pastrmki atlanske regije u odnosu na južni i jugoistočni deo. Pretpostavlja se da je to posledica poslednjeg ledenog doba kada je areal potočne pastrmke bio ograničen ledom u severnim krajevima Evrope. Jugoistočna Evropa i severna Azija mogle su predstavljati refugijum za atlanske populacije usled blaže klime. Populacije jugoistočne Evrope imale su daleko više vremena za razvoj veće genetičke varijabilnosti (Ryman i sar. 1979; Crozier i Ferguson, 1986; Hansen i sar. 1993, Ferguson, 1989).

Za analizu genetičke varijabilnosti, proteinska elektroforeza, pored brojnih prednosti, poseduje i pojedina ograničenja kao što su npr. nedovoljna osetljivost za detekciju aminokiselinskih zamena, jednaka mobilnost različitih alozima u gelu i mogućnost korišćenja isključivo rastvorljivih enzima (Gyllensten i Wilson, 1987). Usled redundantnosti genetičkog koda moguće je utvrditi samo jedan deo svih aminokiselinskih substitucija (Lewontin 1974). Krajem dvadesetog veka, u ove svrhe mnogo češće se koristi

DNK kao genetički marker i varijacije u DNK sekvenci za utvrđivanje razlika između vrsta i populacija.

Vrlo bitan DNK marker, koji se naročito dobro pokazao za rešavanje problema postglacijalne kolonizacije populacija, je gen koji kodira specifičan enzim oka *LDH-C**. Ovaj gen kod potočne pastrmke ima dva kodinantna alela: *LDH-C*100* i *LDH-C*90*. Prvi je najverovatnije ancestralni i daleko je ređi u populacijama, dok je češći, *LDH-C*90*, jedinstven za liniju potočne pastrmke i najčešće se javlja sa daleko većom učestalošću od *LDH-C*100* (Ferguson i Fleming, 1983). Na približno 200 lokaliteta u Britaniji, Irskoj, Islandu i Španiji utvrđeno je da više od 80% ovih populacija nosi fiksiran alel *LDH-C*90* ili je on daleko učestaliji (Hamilton i sar. 1989). Izgleda da su populacije koje poseduju ovaj alel vezane isključivo za severozapadni deo Evrope, a mesta gde je on fiksiran (delovi Baltika, Britanije i Irske) najverovatnije predstavljaju mesto nastanka ovog alela. Poznato je da atlanske populacije nastanjuju ovaj region od kraja poslednje glacijacije, što predstavlja period od oko 13000 godina. Najverovatniji zaključak je da su se desile dve postglacijalne kolonizacije potočnom pastrmkom u delovima severozapadne Evrope koji su ranije bili pod ledom. Prva je verovatno bila od strane ancestralne linije sa alelom *LDH-C*100* koja je kasnije zamenjena modernom linijom koja je nosila *LDH-C*90*, s tim što su pojedine fizičke barijere sprečile potpunu kolonizaciju. Korišćenjem drugih markera, kao što je mtDNK, otkriveno je da je ovaj proces bio daleko složeniji i da je broj rekolonizacija verovatno veći (Garcia-Marin i sar. 1999), mada pojedini autori navode i ljudsku aktivnost kao faktor rekolonizacije (Poteaux i sar. 1998). Populacije u kojima je fiksiran alel *LDH-C*100* česte su u Kaspijskom i Crnom moru (Osinov, 1984), Grčkoj, Korzici, Francuskoj (koja gravitira ka Mediteranu), Škotskoj, Islandu, Irskoj i severnom delu Španije (Elliott, 1994). Takođe, postoje i populacije kod kojih je učestalost ovog alela jako visoka i one se nalaze u jugozapadnoj Bretanji u Francuskoj, visokoplaninskim delovima Švedske, Norveškoj, Škotskoj i Velsu. Generalni zaključak je da se ovaj alel nalazi mahom u reliktnim populacijama i izolovanim lokalitetima, najčešće ukoliko postoje nepremostive prepreke kao što su veliki vodopadi (Ferguson, 1989, Hamilton i sar. 1989, Marshall i sar.

1992). Ferguson (1989) navodi da su genetičke razlike u ovim populacijama mogle nastati iz više razloga:

- a) Po završetku ledenog doba došlo je do nezavisne kolonizacije populacijama koje su se odvojile pre ili tokom poslednje glacijacije;
- b) Pošto je kolonizacija potekla od zajedničkog postglacijalnog pretka, genetička diferencijacija se desila u izolovanim vodenim površinama;
- c) Precizni zavičajni efekat omogućio je nezavisnu evoluciju populacija u okviru jednog sliva, imajući za posledicu promenu u migratornom ponašanju usled malih genetičkih ili sredinskih promena;
- d) Veštačko poribljavanje genetički različitim pastrmkama u rekama koje su već naseljene autohtonim populacijama ove vrste.

Ferguson (1989) je otkrio da je 66% genetičke varijabilnosti raspoređeno između populacija na svim lokusima zajedničkim za sve analizirane radove. Ova vrednost je čak niža od stvarne jer ne uključuje ostale lokuse koji su možda jedinstveni za pojedina područja. Tako svaka od ovih populacija nosi u proseku manje od trećine genetičkog diverziteta vrste. Ryman i sar. (1983) otkrivaju da odgovarajuća vrednost za ljudsku populaciju širom sveta iznosi 10% .

Od perioda Fergusona (1989) i njegove sveobuhvatne genetičke analize populacija potočnih pastrmki do danas korišćeni su razni genetički markeri. Neki od njih pomenuti su u poglavlju „Sistematika i taksonomija“ upravo zato što su u velikoj meri korišćeni u svrhe rasvetljavanja taksonomskog statusa ove vrste (Apostolidis i sar. 2011; Mrdak i sar. 2012), odnosno kompleksa vrsta *S. trutta*. Lokusi mtDNK koji se najčešće koriste su CR i gen za citohrom b (*Cytb*), a od jedarnih, pored gena *LDH-C** i *GHI* i *GH2*, koriste se gen za transferin, unutrašnji graničnik 1 i 2 koji se tanskribuju (eng. *internal transcribed spacer 1 and 2*, ITS1, ITS2) i mikrosateliti. Pored razrešavanja taksonomskih problema, ovi markeri često se koriste i u filogeografskim analizama (Bernatchez, 2001; Cortey i sar. 2004), populaciono-genetičkim (Zhang i Hewitt, 2003), konzervacionim (Apostolidis i sar. 2008;

Vera i sar. 2010b; Kohout i sar. 2012, 2013) u proceni obima lokalnih adaptacija (Meier i sar. 2011, Fraser i sar. 2011) i efektivne veličine populacije (Serbezov i sar. 2012).

Korišćenjem samo jednog lokusa analizira se mali deo genoma, pa je na taj način verovanoća da se uoče razlike znatno smanjena ili nije reprezentativna (Elliott, 1994). Zato je uvek preporučljivo pratiti više lokusa kako bi analiza bila što informativnija. Svaki od pomenutih gena poseduje prednosti i mane. Tako su gen za transferin i ITS1 i ITS2 okarakterisani kao filogenetski neinformativni usled selekcionog pritiska (Antunes i sar. 2002; Presa i sar. 2002, respektivno). Ova nekonzistentnost u odabiru genskih lokusa predstavlja ograničavajući faktor naročito u filogenetskim analizama. Ponekad se korišćenjem različitih genetičkih markera mogu dobiti različiti rezultati. Upoređivanjem rezultata dobijenih analizom mikrosatelita, mtDNK i alozima Giuffra i sar. (1996) dobili su različita filogenetska stabla što se objašnjava različitim evolucionim stopama i načinom nasleđivanja korišćenih genetičkih markera. To je najverovatnije razlog što nije dostupan nijedan obimniji pregled analiza jedarne DNK koji bi potvrdio rezultate dobijene analizom CR mtDNK (Pustovrh i sar. 2014).

1.1.6. Populaciona ekologija i parcijalna migratornost

Parcijana ili delimična migratornost je termin koji se koristi za populacije iste vrste u kojima žive jedinke koje su migratorne kao i one rezidentne. Prvobitno se ovaj termin odnosio mahom na migracione strategije ptica umerene zone (Lack, 1943), ali danas je uočena kod mnogih životinjskih vrsta, od insekata do viših kičmenjaka (Berthold, 1991). Parcijalna migratornost prisutna je i kod više vrsta pastrmskih riba, pa i potočne pastrmke. Ipak, ovaj fenomen nije shvaćen u potpunosti (Jonsson i Jonsson, 1993), pa je i dalje pod znakom pitanja da li je pod uticajem gena, sredine ili oba faktora.

Kako se kod potočne pastrmke prepoznaju tri ekološka oblika, deluje relativno jednostavno razlikovati i odgovarajuće oblike ponašanja potočne pastrmke. Ipak, u prirodnim uslovima to je daleko komplikovanije jer je često više oblika prisutno u jednoj populaciji. Ovakvo ponašanje proučeno je najbolje u norveškom jezeru Vangsvatnet, gde se rezidentne i migratorne forme zajedno mreste u pritokama jezera (Jonsson i Jonsson, 1993).

Pojedine jedinke ne napuštaju pritoke, dok druge migriraju između pritoka gde se mreste i jezera gde obitavaju, a pravi morski oblaci odlaze u obalske delove i do 100 km daleko od jezera pre nego što se vrate u pritoku iz koje potiču (Elliott, 1994).

Ukoliko postoji razlika u izgledu, rezidentne potočne pastrmke su najčešće manje u odnosu na migratorne jedinke. Mada ih je u prvim fazama razvoja često nemoguće razlikovati (Jonsson i Jonsson, 1993), u juvenilom stadijumu kod migranata dolazi do morfoloških promena. Juvenili obično imaju veću glavu i mladalačku prugastu obojenost. Tokom transformacije (“smoltifikacije”), jedinke spremne za migraciju u mora postaju fuziformniji i svetlije obojeni sa srebrnastim bočnim stranama i belim stomakom kakvi ostaju do sazrevanja (Jonsson 1985), a stiču i sposobnost osmoregulacije u morskoj vodi (Hoar, 1976). Jezerske migratorne potočne pastrmke najčešće su srebrnaste boje, slične anadromnim jedinkama (Frost i Varley, 1967), a različite od rezidentnih - rečnih srodnika koji imaju juvenilne pruge (eng. *parr-like dress*) (Jonsson, 1985).

Roditeljske jedinke iz parcijalno migratornih populacija produkuju obe vrste potomaka – i migratorne i rezidentne. Ako se ove dve forme veštački gaje pod istim uslovima, potomci su najčešće gotovo identični (Hindar i Jonsson, 1993). U prilog ovome govore poribljavanja na Novom Zelandu, gde je rezidentni oblik potočne pastrmke dao anadromne potomke (Frost i Varley, 1967), kao i u Severnoj Americi gde se desio obrnut slučaj (Rounsefell, 1958).

Parcijalne migracije u populaciji mogu da nastanu ako se hranidbeni uslovi u staništu promene, zato se smatra da je prednost migracija u odnosu na rezidentnost uglavnom vezana za ishranu (Gross i sar. 1988). Pošto su migratorne jedinke najčešće veće u odnosu na jedinke rezidentne forme njihova prosečna produkcija jaja je veća, jer je poznato da se sa porastom mase tela povećavaju fekunditet i fertilitet jedinke (Fleming i Gross, 1991). Bolji hranidbeni uslovi omogućavaju ženkama veću prosečnu produkciju jaja, a samim tim i prednost onih koje se “odluče” na migraciju, što objašnjava činjenicu da se među migrantima češće sreću ženke.

Mnogi radovi naglašavaju uticaj sredine na dve forme koje se u ovakvim populacijama nalaze. Čak i ukoliko postoje morfološke, populacione pa i ekološke razlike među ovim formama, genetičke razlike nisu izražene (Hindar i sar. 1991; Hansen, 2002;

Charles i sar. 2005). Jedan ovakav primer predstavlja zubatak ili strun, *Salmo dentex* koji naseljava reke i jezera Bosne i Hercegovine i Crne Gore. Specifični uslovi sredine uticali su da se u genetički ujednačenoj populaciji izdvoje dve karakteristične morfe sa odgovarajućim strategijama životne istorije (rezidentna i lakustična). Interesantno je da zubatak predstavlja fenotipsku varijaciju glavatice u Neretvi i isto tako formu potočne pastrmke u Skadarskom basenu. Primeri za ovakve reproduktivno izolovane, simpatričke pastrmske populacije postoje i u Švedskoj, jezerima u Irskoj i jezeru Sevan u Jermeniji, kao i u Ohridskom jezeru (Stefanović, 1948). U Ohridskom jezeru, na primer, u okviru dve forme *S. letnica typicus* i *S. letnica aestivalis* otkriveni haplotipovi endemični su za ovo jezero. Nivo genetičke diferencijacije između ovih formi predstavlja osnovno ograničenje u protoku gena i njihovu reproduktivnu izolaciju. Ovo je najverovatnije rezultat simpatričke diferencijacije (Sell i Spirkovski, 2004).

Teoretski, pomoću nekoliko modela može se objasniti postojanje migratornih i rezidentnih oblika u okviru iste populacije (Gross, 1984). Prema teoriji igara, evoluciono stabilni polimorfizam može da se ostvari ako obe morfe imaju istu adaptivnu vrednost usled ravnoteže zavisne od učestalosti (Gross, 1985). Rezidentne jedinke bi bile favorizovane kada migratorne dostignu veliku brojnost, i obrnuto, pri određenoj učestalosti očekivana adaptivna vrednost rezidentnih i migranata bi trebalo da bude ista (Gross, 1985).

1.1.7. Ugroženost i konzervacija vrste

Antropogeni uticaj najbitniji je faktor ugrožavanja potočne pastrmke, kako neposredno pod uticajem ribolova i poribljavanja, tako i posredno preko uništavanja staništa koje ona naseljava. Različite uticaje čoveka na predstavnike roda *Salmo* detaljno je analizirao Crisp (2000). Pod posrednim uticajem podrazumevaju se različiti tipovi zagađenja poput posledica građevinarstva, industrije, puteva i saobraćaja, urbanog razvoja kao i razvoja šumarstva i poljoprivrede. Tako, na primer, građevinarstvo može narušiti staništa pastrmskih reka tokom faza konstrukcije koje čak ne moraju da budu vezane za izgradnje brane i pregrađivanje tokova. Problemi mogu nastati usled izbacivanja različitih materija u reku kao što su opasne supstance i sedimenti, ili narušavanja šljunkovite podloge

koja je bitna za mrest pastrmki. Takođe i same građevinske konstrukcije mogu predstavljati problem: degradacija staništa zbog izgradnje kanalizacije, odbrana od poplava i kanalisanja tokova. Veliki pretnju predstavljaju i razne vrste brana, prevodnica i izgradnja hidroelektrana. Zatvaranjem nizvodnih delova menja se protok, temperatura i hemizam vode nizvodno. Primeri izgradnje vodozahvata u svrhe vodosnabdevanja ili hidroelektrana su brojni i na teritoriji Srbije. Vodozahvati za vodosnabdevanje izgrađeni su na Lopatnici i Mlavi, dok su u svrhe elektroprivrede pregrađeni Dunav, Drina, Lim, Božica, Vrla, Vlasina i brojne druge reke. Industrija predstavlja pretnju akvatičnim zajednicama najviše preko različitih vidova zagađenja koje variraju u zavisnosti od tipa industrije. Konstrukcije puteva i saobraćaj mogu uneti u vodotokove veliku količinu suspendovanih čvrstih materija i hemijskih zagađivača od kojih su najopasniji teški metali poput olova i cinka. Urbane sredine su najviše pretnja zbog oduzimanja vode radi vodosnabdevanja, stvaranja komunalnih otpadnih voda i otpada uopšte, atmosferskog zagađenja i raznoraznih slučajnih hazarda. Šumarstvo utiče najviše preko modifikacije terena usled krčenja šuma, što izaziva pojavu erozije i pojačanog spiranja vode, ali i preko gajenja šuma na ogoljenim površinama. Kako posađeno drveće raste, tako se stvara senka i snižava se prosečna temperatura vodotokova, ali se i smanjuje količina dostupne svetlosti koja je bitna za primarne producente, a kod četinarskih šuma može doći i do acidifikacije. U kiselim sredinama javlja se, u većim količinama, jedan izotop aluminijuma, inače normalno prisutan u zemljištu - Al^{3+} , koji i u vrlo malim koncentracijama može biti letalan za pastrmske vrste. Priroda i obim različitih uticaja zavise dosta od tipa zemljišta i podloge stadijuma šumske sukcesije i režima upravljanja. Poljoprivreda utiče na razne načine, ali najveći problem je unošenje suspendovanih čestica, organskog zagađenja i toksičnih pesticida u tokove usled gaženja od strane stoke i spiranja sa poljoprivrednih površina. U Tabeli 1 može se videti na koje sve načine ovi vidovi zagađenja mogu uticati na pastrmske populacije.

Direktan uticaj ogleđa se u činjenici da je potočna pastrmka poznata komercijalno i sportsko-ribolovno atraktivna vrsta. U Srbiji, na većini tokova minimalna dužina ulovljene jedinice je 25 cm standardne dužine (SL), broj ulovljenih primeraka svih pastrmki ograničen

je na tri, a lovostaj traje od 1. oktobra do 1. marta, dok traje mrest. Lovi se mušičarskim alatima i varalicama. Iako potočna pastrmka nema status ugrožene vrste (*Least Concern* – LC) ni u Srbiji (Simonović, 2001), ni u svetu (IUCN 2016), veliki pritisak od strane ribolovaca i ribokradica, i sa druge strane poribljavanja, mogu narušiti genetički diverzitet prirodnih populacija. Bez obzira što se vodi kao niskorizično ugrožena vrsta, kao posledica ukrštanja divljih i gajenih jedinki može doći do “genetičkog zagađenja” (Crisp, 2000) koje može biti jednako opasno kako za populaciju, tako i za vrstu.

Tabela 1. Antropogeni faktori i njihov posredni i neposredni uticaj na riblji fond.

Antropogene aktivnosti	Uticaj na tokove												
	Ribolov	Ribnjaci	Poribljavanje	Pregrađivanje toka	Regulacija toka	Navodnjavanje	Spiranje zemljišta	Kanalizacija	Industrija	Eksploatacija šljunka i peska	Promene u obalskoj vegetaciji	Putevi	Vozila
Ispuštanje otpada	*			*	*	*					*		
Brzina toka	*			*	*	*					*		
Temperatura	*			*	*			*			*		
pH	*						*	*	*		*		
Kiseonik	*			*	*		*	*	*			*	
Promene supstrata	*			*	*	*	*	*	*	*		*	*
Toksičnost	*					*	*	*	*			*	
Suspendovane čestice	*				*	*	*	*	*	*		*	*
Eutrofikacija	*					*	*	*	*				
Ograničavanje kretanja				*	*								
Genski pul	*	*											
Bolesti	*	*											
Introdukcije	*	*											
Preteran izlov	*												

Kako bi neka populacija ili vrsta opstale, neophodno je očuvati njen genetički diverzitet, a samim tim i njen evolucionni potencijal (Ryman i sar. 1995). Translokacije

organizama i menjanja prirodnih staništa od strane čoveka su najčešći uzroci hibridizacije i introgresije alohtonih gena u autohtone populacije (Allendorf i sar. 2001). Ribnjačke jedinke koje su često nastale od alohtonih ili hibridnih ribljih fondova često se namerno puštaju u prirodne vode i mešaju se sa autohtonim populacijama (Allendorf i sar. 2001) sa ciljem da se poveća brojnost ribolovno eksploatisane populacije. Pored toga, ribnjaci i uzgajanje riba, koje je kod nas sve zastupljenije, mogu uticati na kvalitet vode i širenje različitih zaraza u prirodnim populacijama. Ribnjački gajene jedinke retko su pogodne za poribljavanje jer je njihov genetički diverzitet daleko manji. Na primer, švedski ribnjački fondovi su zadržali u proseku samo oko 25% varijabilnosti mtDNK divljih populacija (Gyllensten i Wilson, 1987). Nasumično poribljavanje gajenom pastrmkom alohtonog porekla može dovesti do kompetitivnog isključenja native populacije ili do hibridizacije koja može dovesti do gubitka ili "razređivanja" jedinstvene genetičke kombinacije (Taggart i Ferguson, 1986). Postoji posebna potreba za konzervacijom populacija koje poseduju jedinstven genetički materijal. Značaj u konzervaciji ovakvih genetičkih fondova potočne pastrmke vrlo je veliki, jer se takva riba može koristiti za očuvanje staništa koje je nekad naseljavala data populacija. Zato bi poribljavanje trebalo da se vrši isključivo potočnom pastrmkom koja je autohtona za dati region sa odgovarajućim genotipom karakterističnim za taj lokalitet. Poznato je da su potočne pastrmke DA i AT haplogrupe unete u sliv Soče u Sloveniji čime je ugrožen genofond endemične glavatice, *Salmo marmoratus*. U Srbiji je ustanovljeno prisustvo potočne pastrmke AT haplotipa u Gradcu (Simonović i sar. 2014) i Brankovačkoj reci (Marić i sar. 2006), dok je poznato da je u Jermu uneta pastrmka AD haplotipa krajem 20. veka (Simonović, 2010). Pojedina istraživanja na dužičastoj pastrmci, *O. mykiss* govore da čak i poribljavanje autohtonim fondom može biti opasno (Araki i sar. 2007). Naime, generacijski je praćen reproduktivni uspeh prirodnih populacija koje su poribljavane materijalom iz lokalnog matičnog jata gde je utvrđeno da su potomci gajenih jedinki koji su se razvili u divljini imali daleko manji reproduktivni uspeh (Araki i sar. 2009). Dakle, i divlji autohtoni fond može da trpi smanjenje adaptivne vrednosti populacije usled introgresije gena gajenih jedinki (Araki i sar. 2010).

Populacije iste vrste različitih genotipova mogu zahtevati različite strategije upravljanja. Tako, na primer, kod populacija koje su malobrojne, poribljavanje autohtonim juvenilnim jedinkama ne bi imalo nikakav negativni efekat, dok bi kod populacija visoke gustine dodatno poribljavanje poremetilo ravnotežu i izazvalo smanjenje preživljavanja jedinki, jer je optimum preživljavanja pri određenoj gustini populacije. Ovo bi takođe uticalo i na veličinu ribe, koja će postati uniformnija i manja u datom toku (Simonović i sar. 2010). Neadekvatno, u ovom slučaju preterano, poribljavanje može dovesti do smanjenja veličine i brojnosti ulova (Elliott, 1994). Gajene, ribnjačke pastrmke mogu i slučajno dospeti do prirodnih tokova i populacija. Ponekad i mali broj odbeglih jedinki hibridizuje, što može dovesti do nestanka reproduktivne izolacije među populacijama. Uzgoj transgenih pastrmskih vrsta predstavlja naročitu opasnost po prirodne populacije, a jedan takav primer mogao bi biti gajeni atlanski losos u Severnoj Americi sa transgenom za sintezu antifriznih proteina vrste *Pseudopleuronectes americanus* (Fletcher i sar. 2005). Atlanski losos ne može da preživi na temperaturama ispod -0.7°C , što mu ovaj gen omogućava. Ukoliko ovakvi primerci iz uzgajališta dospeju u ekosistem, posledice bi bile neizbežne. Kako ne bi došlo do "genetičke kontaminacije" prirodnih populacija, mogle bi se iskoristiti sterilne triploidne jedinke atlanskog lososa koje se već koriste u akvakulturi i iz komercijalnih razloga (Benfey, 2001).

Karakterizacija genofondova je vrlo bitna jer omogućava zaštitu populacija još uvek nejasnog i nerazrešenog taksonomskog statusa sa posebnim adaptivnim i genetičkim osobinama. Ovo je omogućeno definisanjem konzervacionih jedinica kao što su evoluciono značajne jedinice (eng. *evolutionarily significant units*, ESUs), upravljačke jedinice (*management units*, MUs) i akcione jedinice (eng. *action units*, AUs) (Wan i sar. 2004). Mikrosateliti su se pokazali kao najbolji marker za definisanje ESU. Tako su kod lipljena (*Thymallus thymallus*) u centralnoj i severnoj Evropi definisane četiri ESU korišćenjem mtDNK i mikrosatelita u kombinaciji (Gum i sar. 2005).

Mnogi autohtoni genetički fondovi već su izgubljeni ili narušeni uvođenjem jedinki iz uzgajališta. Najveću vrednost najverovatnije predstavljaju ancestralne populacije sa već pomenutim alelom *LDH-C** 100 ne samo sa fundamentalne, već i aplikativne strane, jer

većina ovih populacija pokazuje jasnu povezanost genotipa i velikog potencijala za rast i dugovečnost (Hamilton i sar. 1989). Populacije Balkanskog poluostrva koje poseduju *LDH-C*100* alel samatraju se ancestralnim, a mnoge analize drugih molekularnih markera ukazuju da je Balkansko poluostrvo najverovatnije centar nastanka savremene potočne pastrmke (Marić i sar. 2006, Simonović, 2010). Prisustvo isključivo rezidentnog oblika je verovatno posledica tople klime kao i isušivanja Paratetisa i Mediterana u periodu tercijara (Simonović, 2010). Pored Balkanskog poluostrva, i velika stara jezera sa stabilnom klimom, poput Ohridskog i mnogih jezera u Irskoj, predstavljala su lokalne refugijume za vrste iz porodice Salmonidae.

Još jedan od faktora koji predstavlja pretnju kako genetičkom tako i specijskom diverzitetu je unos alohtonih vrsta u domaće tokove. Introdikovane, a posebno invazivne riblje vrste, mogu delovati indirektno putem menjanja uslova staništa i unosa novih i nepoznatih oboljenja u populaciju ili direktno predatorstvom i kompeticijom ili pak hibridizacijom ukoliko je u pitanju srodna vrsta. Za potočnu pastrmku posebnu potencijalnu opasnost predstavlja dužičasta pastrmka koja se dosta gaji kao konzumna riba jer brzo raste i relativno se lako mresti (Crisp, 2000). Danas je usled čestih bežanja iz ribnjaka prilično raširena po slivovima u Evropi, dok se u Srbiji uglavnom nalazi isključivo u blizini ribnjaka u kojima se gaji. U Velikoj Britaniji 1974. detektovana je na 462 lokaliteta, a u 40 od njih se prirodno mresti, dok je u tri od tih lokaliteta samoodrživa (Frost, 1974). Njeno prisustvo i naturalizacija u vodama na Balkanu ustanovljeno je još šezdesetih godina XX veka na Plitvičkim jezerima (MacCrimmon, 1971). Populacije dužičaste pastrmke koje se prirodno reprodukuju detektovane su i u Norveškoj (Sægrov i sar. 1996), kao i u pritokama Rajne na Alpima, gde je situacija alarmantna jer u pojedinim tokovima dužičasta pastrmka čini 90% od ukupnog broja pastrmki, dok se potočna pastrmka ovde smatra ugroženom (Peter, 1995). Slična situacija je i u Francuskoj (Blanchet i sar. 2007), kao i u Sloveniji gde je 1990. u Savi Bohinjki brojnost potočnih pastrmki pod pritiskom dužičaste pastrmke toliko opala da je zamalo istrebljena (Povž i Šumer, 2005; Pliberšek i Podgornik, 2014; Stanković i sar. 2015). Korišćenjem protokola za procenu invazivnosti (eng. *Fish Invasiveness Screening*

Kit, FISK), dužičasta pastrmka je u Hrvatskoj ocenjena srednje visoko (24.5/57) invazivnom vrstom (Piria i sar. 2016).

S druge strane, poznato je da je potočna pastrmka introdukovana širom sveta, gde je pokazala svoj invazivni potencijal. Zabeležen je negativni uticaj na autohtonu ihtiofaunu potoka i reka Novog Zelanda i Australije (Crowl i sar. 1992), kao i severoistočnog dela SAD i Kanade gde predstavlja pretnju za autohtonu potočnu zlatovčicu, *Salvelinus fontinalis*. Danas se nalazi na listi od 100 globalno najinvazivnijih vrsta uopšte (Lowe i sar. 2000).

1.2. Genetički markeri

U prethodnim poglavljima pomenuti su brojni geni (*LDH-C**, *GH*, *Cytb*) i intergenske sekvence (ITS1, ITS2) koji se koriste kao genetički markeri, kako za rasvetljavanje filogenetskih odnosa, tako i za populacione analize. U ovom radu kao molekularni markeri korišćeni su CR mtDNK i mikrosatelitski lokusi, tako da će o njima biti više reči u ovom poglavlju.

1.2.1. Mitohondrijska DNK

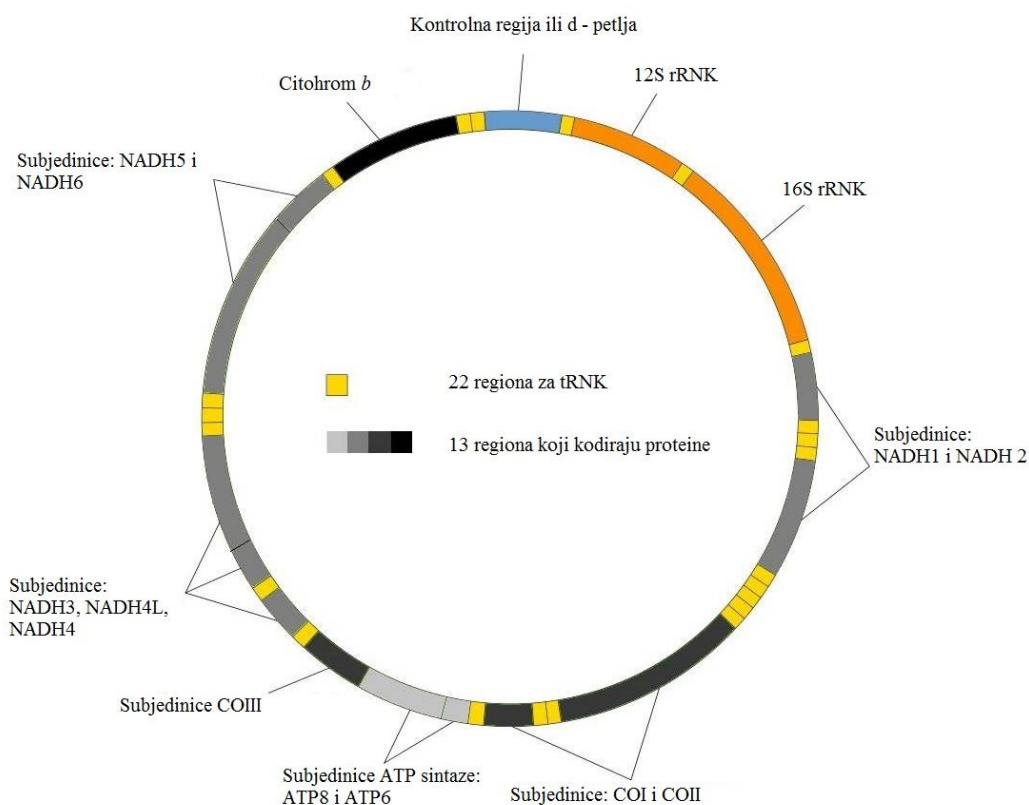
Mitohondrijski genom izgrađen je najčešće od kružne DNK, mada je kod pojedinih jednoćelijskih eukariota u vidu linearnog molekula (Savić Pavićević i Matic, 2011). Pored hloroplasta biljaka i algi, mitohondrije su jedine organele koje poseduju sopstveni genom (mtDNK) koja im omogućava delimičnu autonomnost, odnosno sposobnost da se udvajaju nezavisno od eukariotske ćelije u kojoj su. Ekspresija genoma, njegova struktura, kao i sekvenca, vrlo su slični istim odlikama kod bakterija. Ova sličnost ukazala je na najverovatnije poreklo mitohondrija od prokariota koji su stupili u simbiozu sa prvobitnom eukariotskom ćelijom – urkariotom (Woese i Fox, 1977), što je poznato kao endosimbiotska teorija (Margulis, 1970). Najverovatnije se tokom tog procesa izgubio jedan deo mitohondrijskih gena ili su oni postali sastavni deo jedarnog genoma (Woese i Fox, 1977). S obzirom da mitohondrije najverovatnije potiču od prokariotskog organizma i da je veliki broj gena redukovan, veličina mitohondrijskog genoma mnogo je manja od

jedarnog. Kod višćelijskih životinja, mitohondrijski genom najčešće je relativno mali i ne sadrži introne, za razliku od mitohondrijskog genoma nižih eukariota i biljaka koji sadrži introne, kao i duge intergenske sekvence. Broj mitohondrija po ćeliji najčešće se kreće od 10^2 do 10^4 , a svaka mitohondrija u sebi ima oko 10 kopija celokupnog genoma. Najveći broj kopija poseduju jajne ćelije, od 10^5 do 10^6 , dok spermatozoidi sadrže najviše 10^3 kopija. Geni mitohondrijskog genoma kodiraju proteine i RNK molekule koji su neophodni za funkcionisanje samih mitohondrija. Ovo su najčešće pojedini enzimi respiratornog lanca, proteini mitohondrijskih ribozoma, proteini koji učestvuju u translokaciji drugih proteina iz citoplazme u mitohondrije, kao i oni neophodni za transkripciju i translaciju mitohondrijskog genoma. Oni su izuzetno hidrofobni i zbog toga ne mogu biti kodirani jedarnim genima jer ne bi mogli proći kroz membrane mitohondrija (Savić Pavićević i Matić, 2011). Kod životinja se mitohondrijska DNA nasleđuje uglavnom maternalno, iako izuzeci postoje i poznati su primeri biparentalnog nasleđivanja kod beskičmenjaka (Hoeh i sar. 1991). Prilikom oplodjenja, mitohondrije iz spermatozoida bivaju razgrađene (Harrison, 1989) ili uopšte ne dospeju u jajnu ćeliju, tako da se mtDNK prenosi na potomstvo samo preko majke. Za razliku od jedarne DNK, mitohondrijska se ne rekombinuje (Hutchinson i sar. 1974), tako da se ona, ako izuzmemo mutacije, prenosi neizmenjena od majke na potomstvo. Ukoliko se dogodi da potomci dobiju mitohondrije i od oca i od majke, ova pojava naziva se heteroplazmija i izuzetno je retka (Avise, 2000), za razliku od homoplazmije gde je prisutan uvek identičan mtDNK molekul u svim ćelijama organizma.

1.2.1.1. Mitohondrijski genom porodice Salmonidae

Organizacija mitohondrijalnog genoma prilično je konzervisana kod svih kičmenjaka (Moritz i sar. 1987), mada postoje pojedina odstupanja u redosledu gena i dužini sekvence. Dužina kompletne mtDNK većine vrsta porodice Salmonidae utvrđena je analizom 272 fragmenta mtDNK dobijenih digestijom pomoću 15 restrikcionih enzima i iznosi 16670 bp, što je čini za 100 bp dužom od humane mtDNK (Berg i Ferris, 1984). U okviru ovih 16.7 kilobaza (kb) nalazi se D-petlja (eng. *D-loop*) poznata i kao kontrolni region (eng. *control region*, CR) i 37 gena, od kojih dva kodiraju rRNK mitohondrija, 22 gena kodiraju tRNK, a 13 polipeptide koji učestuju u respiratornom lancu elektrona (Ferris

i Berg, 1984). Kontrolni region učestvuje u replikaciji i transkripciji mtDNK i dužine je oko 1000 bp (Borst i Grivell, 1981), a polipeptidi su kodirani genima za sedam subjedinica NADH, tri subjedinice citohrom oksidaze (COI, COII, COIII), dve subjedinice ATP sintaze i jednom za *Cytb*. Redosled ovih gena prikazan je na Slici 5, a između proteinskih kodirajućih sekvenci nalaze se geni za različite tRNK od kojih se geni za one koje nose leucin (Leu), valin (Val), i serin (Ser) ponavljaju. Na početku svih 13 sekvenci koje kodiraju proteine nalazi se kodon za metionin (Met) (ATG), osim u COI koji počinje sa GTG (kodon za Val), dok se na krajevima uglavnom nalaze TAA i TAG stop kodoni.



Slika 5. Raspored gena na mitohondrijskoj DNK je prilično konzervisan i isti je za većinu kičmenjaka (<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=4304443>).

Kompletan mitohondrijski genom dužičaste pastrmke sekvenciran je 1995. godine i dužine je 16 642 bp (Zardoya i sar. 1995; GenBank: L29771.1). Genomi lososa i potočne pastrmke objavljeni su u Banci Gena (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) u okviru

NCBI (eng. *National Center for Biotechnology Information*) dvadeset godina kasnije i iznose 16 671 bp (Hauge i sar. 2014; GenBank: KF792729.1) i 16 677 bp (Lubieniecki, 2014; GenBank: NC_024032.1), respektivno. Kod pastrmskih vrsta, varijabilnost sekvenci mtDNK u okviru vrsta kreće se od 0.1 do 2%, dok interspecijska varijabilnost iznosi od 3 do 14%. Tako se potočna pastrmka razlikuje od pacifičkih lososa za oko 7.2%, a od zlatovčice za 10% (Berg i Ferris, 1984).

1.2.1.2. Prednosti i nedostaci mitohondrijske DNK kao genetičkog markera

Mitohondrijska DNK koristi se, kako u cilju razrešavanja taksonomskih problema, utvrđivanja filogenetskih i filogeografskih odnosa (Bernatchez, 2001; Corty i sar. 2004; Marić i sar. 2006; Vera i sar. 2010a; Kohout i sar. 2013), tako i u populaciono-genetičkim istraživanjima, za utvrđivanje introgresije, kao i konzervacione svrhe (Apostolidis i sar. 2008; Vera i sar. 2010b; Kohout i sar. 2012, 2013).

Stepen evolucije mtDNK je oko 2% na milion godina (Brown i sar. 1979), odnosno 300 bp na milion godina, ako znamo da je dužina oko 15000 bp, što je $5,7 \times 10^{-8}$ po sinonimnom mestu po godini. Ukoliko se proučava čitava mtDNK, to su tri supstitucije na 10 000 bp. Ova vrednost je 10 puta veća nego kod jedarnih gena, što je jedan od razloga zašto je mtDNK toliko vredan genetički marker. Stopa nesinonimnih supstitucija u okviru kompletnog mitohondrijskog genoma jako varira. Najveća učestalost mutacija uočena je u CR-u, a najmanja u okviru delova koji kodiraju rRNK (Ferris i Berg, 1988). I u okviru CR postoje razlike u učestalosti mutacija. Tako je centralni deo, koji ima oko 300bp, najkonzervisaniji (Shedlock i sar. 1992), za razliku od krajeva koji su najvarijabilniji. Razlog ovako visoke stope mutacija mtDNK je najverovatnije velika aktivnost mitohondrijskog genoma ili velika koncentracija mutagena koji nastaju pri metaboličkoj aktivnosti mitohondrija (WenHsiung, 1997) u kombinaciji sa neefikasnim reparacionim mehanizmima (Lopez i sar. 1997).

Mitohondrijska DNK kao marker ima i prednosti i ograničenja. Relativno se lako izoluje iz živih jedinki, bez žrtvovanja ili iz fosilnog materijala zahvaljujući velikom broju kopija mitohondrijskih genoma u svakom tkivu organizma (Brown i sar. 1979). Maternalno

nasleđivanje bez rekombinacija olakšava praćenje mtDNK markera kroz generacije, a velika stopa mutacija (Avice i sar. 1987) omogućava bolje sagledavanje diferencijacija analiziranih grupa. Efektivna veličina populacije mtDNK je za četvrtinu manja od biparentalno nasleđenog jedarnog genoma koji je diploidan, tako da će ona češće pokazati interpopulacione razlike od jedarne DNK, što znači da je podložnija smanjenju genetičke varijabilnosti usled genetičkih uskih grla (Nei i Tajima 1981; Birky i sar. 1983). Ako oba pola jednako migriraju između populacija, četiri puta više razmene neophodno je da bi se sprečila divergencija mtDNK, za razliku od jedarnog genoma, tj. četiri puta više migracija je potrebno da bi se smanjile postojeće razlike u učestalosti haplotipova mtDNK, nego učestalosti lokusa jedarnog genoma.

Neke od ovih osobina, kao što je maternalno nasleđivanje, mogu predstavljati i manu u zavisnosti o kom tipu istraživanja je reč. Ukoliko želimo da otkrijemo da li pojedine jedinke hibridizuju neophodno je, pored ovog markera korišćenje i nekog markera jedarnog genoma kako bi se pratilo i paternalno nasleđivanje, jer je poznato da maternalno nasleđena mtDNK može „okupirati“ genom srodne vrste (Ferris i sar. 1983). Takođe, ovaj marker nije dovoljno osetljiv, odnosno nije dovoljno varijabilan za analizu odnosa vrlo srodnih jedinki, pa se u te svrhe obično koristi u kombinaciji sa drugim markerima. Treba napomenuti i to da se u većini istraživanja koja koriste mtDNK kao marker retko koristi kompletna mtDNK, već samo pojedini njeni delovi (CR, *Cytb* i dr.), a jedan genetički marker nije uvek reprezentativni pokazatelj čitavog genoma, tako da postoji opasnost od pogrešnih interpretacija filogenije (Elliott, 1994). Ovo ne važi samo za mtDNK, već i za sve ostale genetičke markere: za što preciznije rezultate potrebno je uključiti više markera i ukoliko je moguće, uporediti ih sa morfološkim podacima. Ipak, takvih radova gde se koriste i molekularni markeri i morfološke analize, ima jako malo (Bernatchez i sar. 1992; Giuffra i sar. 1994; Patarnello i sar. 1994; Segherloo i sar. 2012) i često daju oprečne rezultate.

1.2.1.3. Kontrolni region mitohondrijske DNK kao genetički marker kod potočne pastrmke

Kao što je pomenuto u poglavlju „Sistematika i taksonomija“, do sada je na osnovu varijabilnosti CR mtDNK utvrđeno sedam filogenetskih haplogrupa (linija) potočne pastrmke širom Evrope i Azije (Bernatchez i sar. 1992, 2001; Suárez i sar. 2001., Bardakci i sar. 2006): sredozemna (mediteranska), jadranska, dunavska, atlantska, duero, *marmoratus* i *tigris* grupa. Poslednje dve se, prema nekim autorima, izdvajaju kao zasebne vrste (Turan i sar. 2011).

Bernatchez i sar. (1992) su analizirali 640 bp CR velikog broja potočnih pastrmki iz šire zapadnoevropske regije kako bi utvrdili da li ekološki oblici imaju monofiletsko poreklo i da li geografske razlike imaju filogenetske osnove. Prema dobijenim rezultatima zaključeno je da se ekološke forme ne izdvajaju kao posebne grupe, ali da postoji geografsko poklapanje sa opisanim haplogrupama (AT, AD, DA, ME, MA), u okviru kojih je raspoređeno 12 do tada poznatih haplotipova (At1, At2, Da1, Da2, Me1, Me2, Ad1, Ad2, Ad3, Ma1, Ma2, Ma3). Ova istaživanja su potvrdila da je potočna pastrmka jedna od najstruktuiranijih životinjskih vrsta kod koje se više od 50% ukupnog genetičkog diverziteta nalazi između populacija (Krieg i Gayomard, 1985). Velika struktuiranost uočena je i u analiziranim populacijama potočnih pastrmki iz Grčke, Albanije i Francuske: sa 11 opisanih haplotipova; srednja vrednost interpopulacionog diverziteta iznosila je 1.65% (Apostolidis i sar. 1996b). U daleko opsežnijoj analizi na 1794 jedinke u 174 populacije duž čitavog areala potočne pastrmke, Bernatchez (2001) otkriva 38 do tada poznatih haplotipova sa najvećom raznovrsnošću u okviru DA haplogrupe (14 haplotipova). On ukazuje na to da je alopatričnost ovih filogenetskih linija posledica kako izolovanosti, tako i uticaja glacijacija i klime na heterogenost područja koje naseljavaju. Analize istog regiona mtDNK na 27 populacija u Austriji, Weiss i sar. (2001) otkrivaju da su haplotipovi Da1 (AF322000) i Da2 (AF321999) ovde najzastupljeniji, ali pronalaze čak 44% haplotipova AT linije, iako su analizirane populacije dunavskog sliva, što navodi na zaključak da bi atlanska linija mogla biti nativna za ovaj deo Evrope. Ipak, poznato je da je u ovom regionu bilo poribljavanja alohtonim linijama, a naknadne analize kompletne CR su

potvrdile da ove populacije atlanskog haplotipa najverovatnije potiču iz danskih uzgajališta (Duftner i sar. 2003). Cortey i Garcia-Marin (2002) ukazuju na važnost sekvenciranja kompletnog CR radi utvrđivanja evolucione istorije potočne pastrmke. Analizom kompletnog CR i kalibracijom molekularnog sata na nešto niži nivo nukleotidne zamene (0.75%) Cortey i sar. (2004), zaključuju da je dunavska haplogrupa najancestralnija od svih do tada poznatih. Vera i sar. 2010b. otkrivaju da su u okviru endemične Duero linije sa 26 haplotipova na Iberijskom poluostrvu najzastupljeniji DUcs1 i DUcs2. Lerceteau-Köhler i sar. (2013) dovode u pitanje ovu filogeografsku paradigmu koja ne uspeva da objasni rasprostranjenje dunavskih i atlanskih haplotipova u centralnoj Evropi, kao ni mesto nastanka dunavske linije koja pokazuje veliki diverzitet osobina životne istorije i zauzima ceo Ponto-Kaspijski basen. Oni takođe dovode u pitanje alopatričko poreklo mediteranske linije i sugerišu na mogućnost nezavisnog postanka jadranske linije i pogrešan naziv s obzirom na njeno široko rasprostranjenje i fenotipske razlike.

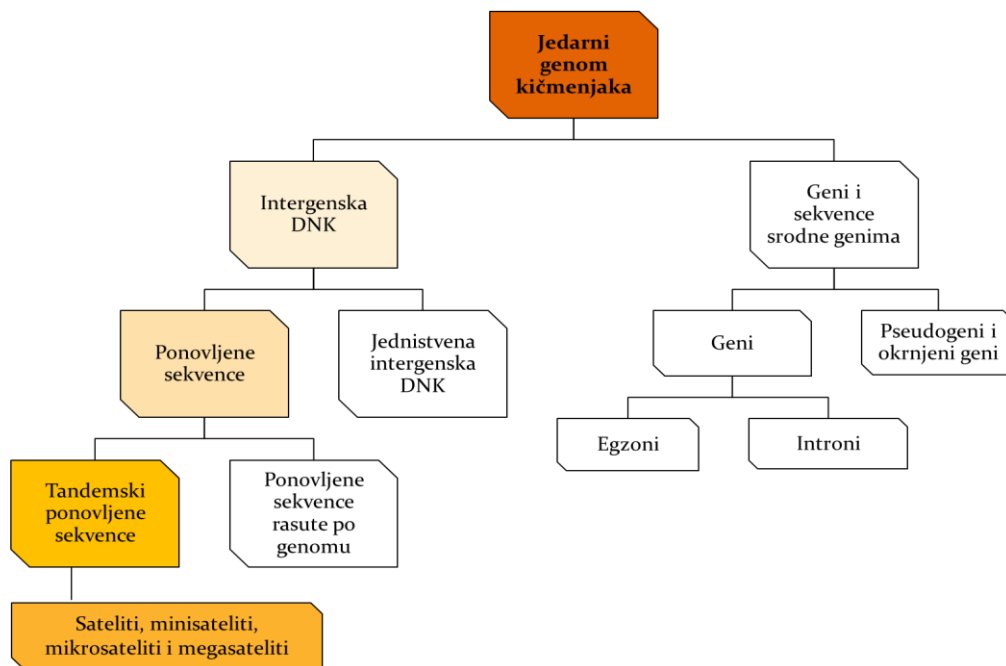
Na području Srbije, prvu analizu CR mtDNK populacija potočnih pastrmki izvršili su Marić i sar. 2006. godine. Analizom dela CR dužine 561 bp na 101 jedinki poreklom iz dunavskog, jadranskog i egejskog sliva, otkriveno je prisustvo 15 haplotipova od kojih je jedan alohtoni (ATcs1) nađen u dve reke (Gradac i Brankovačka reka) za koje se zna da su poribljavane. Raspored autohtonih haplotipova odgovarao je geografskom rasprostranjenju slivova. Novootkriveni haplotipovi u Džepskoj reci (Da*Dž) i Vrli (Da*Vr) zauzimaju centralno mesto u kladogramu poznatih haplotipova, što ukazuje na njihovu ancestralnost. Dalja opsežnija istraživanja na Balkanu, koristeći isti molekularni marker u kombinaciji sa mikrosatelitima, nastavljaju Kohout i sar. (2013). Akcenat je na antropogenom uticaju na autohtone fondove putem translokacija i poribljavanja introdukovanim linijama. Analizirane su 204 jedinke iz egejskog i crnomorskog sliva, a rezultati su ukazali na potencijalnu divergentnu evoluciju populacija potočne pastrmke crnomorskog sliva. Uočena je i introgresija AT haplotipa u native populacije oba sliva, mada ona nije tako velika kao u ostalim delovima sveta gde je ova linija introdukovana.

U Srbiji i na Balkanu najzastupljeniji su haplotipovi DA linije, tako da se ova linija smatra autohtonom za Balkansko poluostrvo (Bernatchez, 2001; Duftner i sar. 2003; Snoj,

2004; Marić i sar. 2006). Iako postoje neslaganja oko porekla AT linije u centralnoj Evropi (Balon, 1968; Weiss i sar. 2001; Lerceteau-Kohler i sar. 2013), nema dokaza da ova linija prirodno naseljava oblasti južno i jugoistočno od Alpa. Istraživanja haplotipova potočnih pastrmki u Rumuniji to i potvrđuju, odnosno u ovim vodama nađene su samo jedinke Da linije (Popa i sar. 2013). Potočne pastrmke AT linije u Srbiji nađene su na nekoliko lokacija: pomenuti Gradac i Brankovačka reka (Marić i sar. 2006).

1.2.2. Mikrosatelitska DNK

Mikrosateliti su poznati i pod nazivima kratki tandemski ponovci (eng. *short tandem repeats*, STRs) i jednostavne ponavljene sekvence (eng. *simple sequence repeats*, SSRs). Otkriveni su sedamdesetih godina prošlog veka (Hamada i sar. 1982), a danas se zna da su prisutni i kod prokariota (Gur-Arie i sar. 2000) i kod eukariota, kao i u genomima organela (Rajendrakumar i sar. 2007). Mikrosateliti, kao delovi jedarnog genoma, spadaju u grupu tandemski ponovljenih sekvenci (Slika 6). U okviru ove grupe sekvenci pored mikrosatelita nalaze se i sateliti, minisateliti i novootkriveni megasateliti (Savić Pavićević i Matić, 2011). Satelitska DNK se sreće kod svih eukariota, uglavnom u centromerama hromozoma, a dužina njenih ponovaka iznosi od 5 do 200 kb, dok je ukupna dužina niza od 1 kb do nekoliko Mb. Mega-, mini- i mikrosateliti, koji se nalaze u svim delovima genoma, razlikuju se međusobno po dužini ponovaka i ukupnoj veličini niza. Megasateliti su najveći, sa ponovcima od više kilobaza koji se ponavljaju nekoliko stotina puta; minisateliti sadrže ponovke od 6 do 64 kb, a nizovi su dugački od 0.1 do 20 kb, dok se mikrosateliti sastoje od motiva dužine od 1 do 6 bp i dostižu dužine od nekoliko desetina do stotina baznih parova (Savić Pavićević i Matić, 2011).



Slika 6. Organizacija jedarnog genoma kičmenjaka.

1.2.2.1. Struktura mikrosatelita

Najbrojniji mikrosateliti kod svih kičmenjaka su dinukleotidni $(CA)_n$, a zatim i nešto ređi $(AT)_n$. Tako se kod fugu ribe, *Takifugu rubripes*, $(CA)_n$ mikrosatelit sreće na svakih 6.56 kb DNK, dok se kod trobodljog gregorca, *Gasterosteus aculeatus*, sreće na približno svakih 14 kb. Na delu genoma potočne pastrmke otkriven je visok sadržaj $(GC)_n$ i $(CT)_n$ mikrosatelitskih lokusa od kojih su prvi daleko češći i javljaju se na svake 23 kb, dok se $(CT)_n$ lokusi javljaju na 76 kb (Estoup i sar. 1993). Mononukleotidi su dosta česti, dok su tri-, tetra-, penta- i heksanukleotidni ponovci oko 1.5 puta ređi od dinukleotidnih (Toth i sar. 2000). Di- i tetranukleotidni ponovci su češći u nekodirajućim delovima genoma, za razliku od tri- i heksanukleotidnih mikrosatelita koji se često nalaze i u kodirajućim delovima DNK. U egzonima kičmenjaka česti su trinukleotidi bogati G i C bazama (npr. CCG, CAG), dok su u intronima znatno ređi (Toth i sar. 2000). Prema tipu ponovljenih motiva mikrosateliti se mogu se podeliti na savršene, nesavršene i složene (Weber, 1990), odnosno čiste, prekinute i složene (Jarne i Lagoda, 1996). Savršeni (čisti) mikrosateliti nemaju prekide u ponovljenim motivima, nesavršeni (prekinuti) poseduju umetnute

nukleotide između ponovljenih motiva, složeni predstavljaju kombinaciju dva ponovljena motiva, a postoje i različite kombinacije u rasporedu između ovih grupa.

1.2.2.2. Varijabilnost mikrosatelita

Najbitnija osobina mikrosatelita, zbog koje su toliko korisni kao molekularni markeri, je njihov veliki polimorfizam koji je posledica velike stope mutacija. Ona se procenjuje na 10^{-2} do 10^{-6} po lokusu po generaciji što je od 1000 do 10^7 puta veća učestalost mutacija nego u kodirajućim delovima DNK (WenHsiung, 1997). Pretpostavlja se da su mutacije mikrosatelita, koje najčešće dovode do povećanja njihove dužine (Neff i Gross, 2001), posledica proklizavanja DNK polimeraze (Schlötterer i Tautz, 1992) ili nejednake rekombinacije (Jakupciak i Wells, 2000). Naime, pošto mikrosateliti poseduju ponavljene motive, polimeraza je tokom replikacije ovih regionima izuzetno podložna greškama, što je poznato pod nazivom replikaciono proklizavanje (eng. *replication slippage*) i najčešće dovodi do povećanja dužine fragmenta (Schlötterer i Pemberton, 1994). Iako je ovo gledište opšteprihvaćeno, pokazalo se da neregularna rekombinacija takođe doprinosi promeni dužine mikrosatelitskih lokusa (Jakupciak i Wells, 2000). Ovaj mehanizam je najverovatnije uključen u diferencijaciju i evoluciju paralognih sekvenci (duplicirani lokusi u okviru vrste) u porodici Salmonidae koje su nastali u procesu tetraploidizacije. Ovo je uočeno uporednom analizom sekvenci lokusa Str1INRA različitih vrsta podfamilije Salmoninae čije se duge bočne sekvence (eng. *flanking sequences*) protežu duž kodirajućih i nekodirajućih regiona (Angers i sar. 2002). Ova dva mehanizma najverovatnije deluju zajedno (Chistiakov i sar. 2006). Tokom replikacije duži nizovi predstavljaju veći problem za DNK polimerazu od kraćih. Analizom učestalosti proklizavanja tokom lančane reakcije polimeraze procenjeno je da broj ponovaka manji od četiri za $(CA)_n$ i osam za $(A)_n$ homopolimere neće dovesti do mutacija u mikrosatelitima (Shinde i sar. 2003). Mutacije su ređe u složenim i prekinutim mikrosatelitima jer ubačeni nukleotid služi kao sidro za polimerazu (Jarne i Lagoda, 1996). Ako se neki mikrosatelitski lokus uvek menja dodavanjem samo jednog ponovka, govorimo o stupnjevitom modelu mutacija (eng. *stepwise mutation model*, SMM) (Kimura i Ohta, 1978; Bell i Jurka, 1997). Ipak, neki mikrosateliti evoluiraju prema dvofaznom modelu mutacija (engl. *twophase*

mutational model, TPM) gde postoji mogućnost dodavanja ili uklanjanja samo jednog ponovka, ali i verovatnoća mutacionih događaja sa većim promenama u broju ponovaka (Di Rienzo i sar. 1994) ili prema modelu beskonačnog broja alela (engl. *infinite-allele model, IAM*) po kome svaka mutacija stvara novi alel (Kimura i Crow, 1964). Ukoliko procenjujemo distance između populacija, od velike je važnosti određivanje odgovarajućeg modela mutacija jer se pretpostavke pomenutih modela razlikuju, pa prema stupnjevitom modelu mutacija dužine mikrosatelita daju direktnu informaciju o srodničkim odnosima između alela, za razliku od onih kod kojih se broj ponovaka nepredvidivo menja (TPM). Što je duže vreme divergencije populacija, verovatnoća da aleli predstavljaju homoplazije¹ se povećava (Stojković i Tucić, 2012).

Mikrosateliti su poznati kao selektivno neutralni marker (Goldstein i Pollock, 1997). Ipak, oni na mnoge načine mogu uticati na funkciju DNK. Primećeno je da mikrosateliti zauzimaju različite DNK konformacije: $(dCA)_{32}$ i njihovi komplementarni ponovci su *in vitro* zauzimali levogiru Z-DNK konformaciju (Rich i sar. 1984), dok su ponovci $(GA)_n(AC)_n$ sa svojim komplementarnim nukleotidima, takođe zauzimali konformacije koje nisu B-DNK strukture (Epplen i sar. 1996). Na ovaj način oni mogu uticati na organizaciju hromatina (Chistiakov i sar. 2006). Takođe, smatraju se glavnim centrima rekombinacije (Jeffreys i sar. 1998), mogu predstavljati signal za završetak replikacije (Li i sar. 2002) i uticati na ekspresiju gena ukoliko se nađu u regionu promotora (Edwards i sar. 1998; Streelman i Kocher, 2002), a u intronima mogu predstavljati mesta za vezivanje regulatornih proteina (Epplen i sar. 1993, 1996). U prilog tome govori i činjenica da kod ljudi veliki broj trinukleotidnih ponovaka u egzonima mogu dovesti do različitih neurodegenerativnih poremećaja poput fragilnog X sindroma, Hantingtonove bolesti i razvojnih poremećaja (Jasinska i sar. 2003).

¹ Homoplazija predstavlja sličnost osobina koje su nastale evolucijom od različitog pretka tj. nisu identične po poreklu (usled konvergentne evolucije, paralelizama, duplikacije gena). U ovom slučaju, iste dužine alela ne moraju predstavljati istu sekvencu tako da njihova sličnost ne mora da predstavlja i njihovu srodnost.

1.2.2.3. Uloga mikrosatelita kao genetičkih markera

Činjenica da broj ponovljenih motiva u mikrosatelitima često varira između jedinki jedne vrste i da se kreće u jednom opsegu variranja karakterističnom za dati lokus, učinila ih je veoma korisnim genetičkim markerima (Savić Pavićević i Matić, 2011). Kao i mtDNK, mogu se izolovati iz bilo kog tkiva bez žrtvovanja jedinki, pa čak i iz fosilnog materijala (Nielsen i sar. 1999). Analiza mikrosatelita najčešće podrazumeva veliki broj lokusa koji daju daleko pouzdanije rezultate, a uglavnom je više lokusa moguće amplifikovati zajedno (Lerceteau - Köhler i Weiss, 2006). Oni se koriste, kako u granama biologije, tako i medicine, forenzici (DNK fingerprinting), parazitologiji, konzervacionoj i populacionoj genetici. Na polju ihtiologije i ribarstvene biologije, mikrosateliti se koriste za procenu genetičkog diverziteta populacija, uticaja poribljavanja na autohtone fondove (Hansen i sar. 2000a, b; 2002), srodstva uzorkovanih jedinki (Hansen i sar. 1997), obima lokalnih adaptacija (Meier i sar. 2011; Fraser i sar. 2011), efektivne veličine populacije (Serbezov i sar. 2012), kao i formiranja matičnih jata za poribljavanje (Hansen i sar. 2000b). Za razliku od alozimskih i mitohondrijskih markera, mogu se koristiti za analize populacija na mnogo manjim geografskim površinama (Estoup i sar. 1998), a u kombinaciji sa drugim genetičkim markerima mogu se koristiti i u svrhe rasvetljavanja filogenetskih odnosa (Angers i Bernatchez, 1998; Richard i Thrope, 2001; Segherloo i sar. 2012), iako zbog svoje velike varijabilnosti i moguće dužinske homoplazije ne važe za pouzdane filogenetske markere. Mikrosateliti se mogu koristiti za istraživanja širih razmera kao što je komparativno mapiranje gena i genoma, npr. informacije o genomu dužičaste pastrmke i atlanskog lososa mogu poslužiti za poređenje sa srodnim pastrmskim vrstama, kao i za genetičke rekonstrukcije njihovih zajedničkih predaka (Rexroad i sar. 2005).

1.3. Matematička analiza genetičke varijabilnosti

Populaciona genetika je nauka koja se bavi proučavanjem genetičke varijabilnosti najčešće preko promene učestalosti alela u populaciji. Ukoliko u populaciji postoji slučajno ukrštanje, moguće je na osnovu učestalosti alela izračunati učestalost genotipova o čemu govori Hardy-Vajenbergov (H-V) princip (eng. *Hardy-Weinberg Principle*). Pod

pretpostavkom da na jednom genskom lokusu postoje dva alela, A_1 i A_2 sa odgovarajućim učestalostima p i q ($p+q=1$), učestalost homozigotnih genotipova iznosiće p^2+q^2 jer se sabiraju učestalosti genotipova A_1A_1 (p^2) i A_2A_2 (q^2), dok će učestalost heterozigota biti $2pq$ za A_1A_2 genotip. Pomoću H-W principa mogu se lako izračunati vrednosti očekivane i uočene heterozigotnosti (H), ali ukoliko postoji veliki broj alela na jednom genskom lokusu, najlakše je ove parametre izračunati preko homozigotnosti: $H = 1 - \text{homozigotnost}$. Dakle, u slučaju da jedan lokus poseduje samo dva alela, data formula će biti: $H = 1 - (p^2 + q^2)$, za razliku od slučaja većeg broja alela: $H = 1 - \sum p_i^2$. Na ovaj način izračunava se očekivana heterozigotnost (eng. *expected heterozygosity*, H_{exp} , H_T). Detektovana heterozigotnost (eng. *observed heterozygosity*, H_o , H_I) u populaciji može odstupati od vrednosti očekivane heterozigotnosti, što se može iskoristiti za merenje genetičke diferencijacije između subpopulacija. Jedan od prvih matematičkih modela za procenu struktuiranosti populacija postavio je Sjuel Rajt (Wright, 1950) koji je poznatiji kao Rajtova F statistika. Struktuiranu populaciju, metapopulaciju (T) čini više dema-subpopulacija (S) sa pojedinačnim jedinkama (I). Parametar koji je uveo Rajt za opisivanje odstupanja učestalosti genotipova od očekivanih na svim hijerarhijskim nivoima naziva se indeks fiksacije (F). Stepem varijabilnosti genotipova na nivou čitave populacije (F_{IT}) može se opisati preko indeksa fiksacije unutar dema (F_{IS}) i između dema (F_{ST}) (Tucić, 2003).

1.4. Analizirana područja

U istočnoj Srbiji izdvajaju se karpatski i balkanski deo. Karpatski region zauzima severni deo istočne Srbije odnosno južni deo Karpatskih planina, dok balkanski zauzima južni deo, odnosno bugarski Balkan. Granica između ova dva regiona predstavljaju Knjaževac i Rtanj. U ovom radu analizirane su populacije reka karpatskog regiona istočne Srbije.

1.4.1. Područje Nacionalnog parka Đerdap

Nacionalni park Đerdap nalazi se u severoistočnom delu Srbije, na granici sa Rumunijom. Naziv „Đerdap“ potiče od persijske reči „Girdap“ što znači klisura vrtloga (Manojloić, 1986). Zaštićena zona parka zauzima površinu od 63799 ha

(<http://www.npdjerdap.org/>), što ga čini najvećim nacionalnim parkom u Srbiji. Park je pod zaštitom od 1974. godine, a prema Zakonu o zaštiti prirode uspostavljene su tri zone zaštite prirodnih objekata i spomenika kulture (Stanisavljević i sar. 2012). Nalazi se na desnoj obali Dunava, a prostire se od Golubačkog grada do Karataša kod Kladova.

1.4.1.1. Reljef i klima područja

Najdominantniji deo reljefa je nesumnjivo Đerdapska klisura koja nastaje radom Dunava, druge najveće reke u Evropi. Iako Đerdapska klisura predstavlja plovidbenu „kapiju“ Dunava, uslovi broskog saobraćaja, pre izgradnje brane, bili su izuzetno teški, te je zbog toga ova klisura u svetu poznatija pod nazivom Gvozdena vrata (eng. *Iron Gates*) (Manojlović, 1986). Ova kompozitna klisura, koja preseca karpatski venac, ujedno je i najveća i najduža klisura probojnica u Evropi, a sastavljena je od četiri manje: Golubačka (dužina 14 km, širina 1.8 km, dubina 48m), Gospođin vir (15 km, 1.28 km, 9 m), Kanjon Velikog i Malog kazana (19 km, 0.18 km, 68 m) i Sipska klisura (8.5 km, 1.15 km, 80 m). Tri kotline spajaju ove četiri klisure: Ljupkovska (10 km, 1.3 km, 19 m), Donjomilanovačka (15 km, 2.4 km, 25 m) i Oršavska (17 km, 4.6 km, 45 m). Ranije se naziv Đerdap ili Gvozdena vrata odnosio samo na Sipsku klisuru, ali se vremenom počeo koristiti za čitavu kompozitnu klisuru. U delu Velikog Kazana (Slika 7) izmerena je jedna od najvećih rečnih dubina u svetu - 90 m, koja se spušta čak i ispod nivoa Crnog mora, sa strmim liticama koji dostižu visinu i do 500 m (Manojlović, 1986), sa uglom nagiba i do 80°. Na ulasku u Đerdapsku klisuru Dunav je najširi (2000 m), a najuži u klisuri Gospođin vir -132 m (Rodić i Pavlović, 1994). Dužine toka Dunava kroz našu zemlju iznosi 449.35 km, a od toga je 100 km u Đerdapskoj klisuri koja čini granicu između srednjeg i donjeg toka Dunava (Manojlović, 1986).



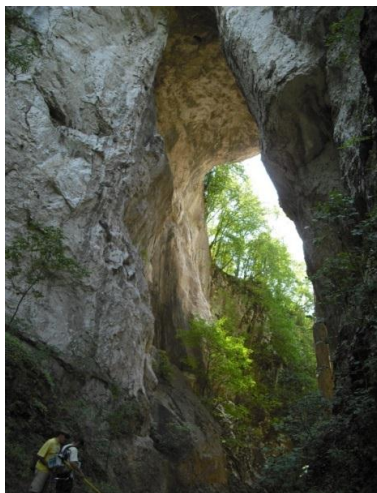
Slika 7. Pogled na kanjon Velikog i Malog kazana sa vidikovca Ploče (Foto: Tošić).

Đerdapski region poseduje reljef koji karakteriše velika morfo-genetska raznovrsnost. Ovde se sreću planine, kotline, abrazivni, vulkanski, rečni i kraški oblici reljefa. Najviše tačke ovog regiona pripadaju središnjem i spoljašnjem planinskom pojasu istočne Srbije. U središnjem pojasu, od Brnjice do Porečke reke, to su Šomrda (806 m n. v.) i Liškovac (803 m n. v.), dok spoljašnjem pojasu pripadaju Veliki Greben sa Crnim Vrhom (655 m n. v.) i Miroč sa Velikim (768 m n. v.) i Malim Štrpcem (626 m n. v.). U kraškom reljefu cele karpatske Srbije česte su i pećine, jame, kraška vrela, ali i prerasti, prirodni kameni mostovi od kojih su poznatije prerast na reci Vratni kod Brze Palanke i Zamni kod Plavne (Slika 8) koji su pod zaštitom kao spomenici prirode (Amidžić i sar. 2011). Kraška vrela prisutna su u Golubačkoj klisuri, ali i Kanjonu Velikog i Malog Kazana, a veliki broj potopljen je posle izgradnje brane, tako da je hladna izvorska voda omogućila stvaranje novih specifičnih uslova za razvoj ihtiofaune glavnog toka Dunava. Eolski oblici reljefa su retki, ali postoje na ulazu Dunava u Đerdapsku klisuru između Rama i Golupca javljaju se manje peščare, Ramska i Golubačka. Velika raznovrsnost reljefa uslovlila je i specifičnu Đerdapsku mikroklimu. Na klimu dosta utiče i velika vodena masa Dunava, dodatno povećana nakon izgradnje hidroelektrane Đerdap I, kao i raznovrsni biljni pokrivač koji je ovde izuzetno bogat. Tako su zime u Đerdapskoj klisuri blaže nego u južnom Banatu i Negotinskoj krajini, a leta su znatno svežija (Stanisavljević i sar. 2012).

1.4.1.2. Đerdapska klisura kao refugijum

Poznato je da su kanjoni velikih reka (Medail i Diadema, 2009) predstavljali refugijume za mnoge drevne biljne i životinjske vrste, a Đerdapska klisura nije izuzetak i predstavlja jedan od najznačajnijih refugijuma Evrope. Velika složenost i raznovrsnost

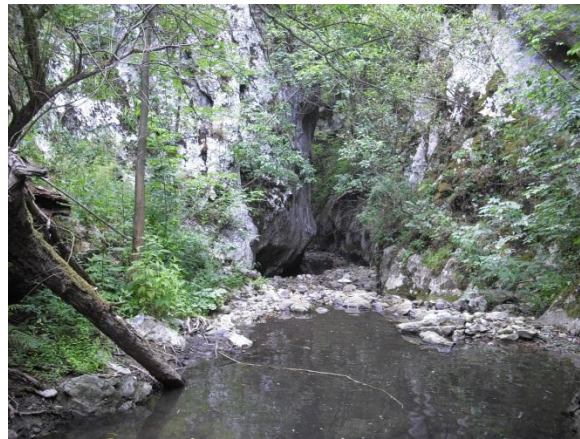
reljefa uslovlili su znatan broj raznolikih mikrostaništa gde je sklonište od ledenog klimata od tercijera do danas našlo više od 1100 biljnih vrsta. Prisutne su i brojne mešovite biljne zajednice, od kojih 35 ima reliktnu osobinu. Biljni tercijerni relikti predstavljeni su sledećim vrstama: mečja leska (*Corylus colurna*), orah (*Juglans regia*), jorgovan (*Syringa vulgaris*), tisa (*Taxus baccata*), srebrna lipa (*Tilia argentea*), kavkaska lipa (*Tilia caucasica*), pančičev maklen (*Acer intermedium*), hrast medunac (*Quercus pubescens*), zelenika (*Ilex aquifolium*), đerdapska lala (*Tulipa hungarica*) i banatski šafran (*Crocus banaticus*). Nažalost, za đerdapsku lalu i banatski šafran pretpostavlja se da su iščezle sa ovog područja, a samim tim i sa područja Srbije posle izgradnje hidroelektrane Đerdap i stvaranja veštačkog jezera. Nacionalni park Đerdap označen je kao značajno područje za biljke (eng. *important plant area*, IPA), ali i kao značajno područje za ptice (eng. *important bird area*, IBA). Đerdap nastanjuje oko 150 vrsta ptica kao na primer: orao belorepan (*Haliaeetus albicilla*), orao zmijar (*Circaetus gallicus*), suri orao (*Aquila chrysaetos*), crna roda (*Ciconia nigra*), siva čaplja (*Ardea cinerea*). Sisari su prisutni sa oko 55 vrsta od kojih su strogo zaštićene vidra (*Lutra lutra*), šareni tvor (*Vormela peregusna*), ris (*Lynx lynx*), kao i nekoliko vrsta slepih miševa. Nacionalni park Đerdap nalazi se na preliminarnom spisku za rezervat biosfere (eng. *UNESCO-MAB Biosphere Reserves*, RB), kao i za svetsku prirodnu baštinu (eng. *UNESCO World Heritage*, WH) pod zaštitom UNESCO (Amidžić i sar. 2011).



Slika 8. Prerast reke Zamne (Foto: Tošić).



Slika 9. Pritoke dunavske akumulacije, gore levo: Mala Boljetinska reka, gore desno Kožica, dole levo Brnjica, dole desno Zlatica (Foto: Tošić).



Slika 10. Reka Zamna posle sušnog perioda (Foto: Tošić).

1.4.1.3. Analizirane pritoke đerdapske akumulacije

Desne pritoke Dunava: Tumanska reka, Brnjica, Dobrinjska reka, Kožica, Čezava Boljetinska reka, Zlatica, Porečka, Vratna, Rečka, Zamna, svojim erozivnim radom usekle su poprečne doline i kanjone, gde se naročito ističe kanjon Boljetinske reke jer se ovde jasno vidi istorija razvitka zemljine kore u ovom delu Evrope od paleozika do danas. Reke koje su uključene u istraživanje u ovom radu (Slika 9), a nalaze se u okviru Nacionalnog parka Đerdap su: Brnjica, Dobrinjska, Kožica, Boljetinska, Zlatica i Porečka. Stanje ribljih zajednica koje nastanjuju ove reke do sad je analizirano isključivo preko godišnjih programa upravljanja (Simonović, 2010), dok populacije potočnih pastrmki u gornjim tokovima nisu nikad do sad analizirane. U ovom radu prvi put su analizirane ove populacije korišćenjem molekularnih metoda i to mitohondrijske DNK i mikrosatelita. Vratna, Rečka i Zamna (Slika 10) nalaze se u širem području Đerdapa, a u ranijim istraživanjima (Marić i sar. 2006) jedinke potočne pastrmke iz Rečke i Vratne bile su uključene u analizu mitohondrijske DNK, dok mikrosateliti kao markeri nisu korišćeni.

Nakon izgradnje hidroelektrane, ušća ovih reka i potoka su uglavnom potopljena i pretvorena u manje zalive. Najveći zaliv je u dolini Porečke reke i on je interesantan kao ornitološka stanica zbog prisustva mnogih vrsta ptica, a takođe je ribolovno atraktivan (Stanković, 2002). Potencijalno interesantne za mušičarski ribolov mogu biti Brnjica, Vratna, Rečka i Zamna. Rečka i Vratna predstavljaju konzervaciono bitne salmonidne reke (Simonović, 2008). Temperatura vode ovih pritoka Dunavske akumulacije kreće se u opsegu karakterističnom za salmonidne reke, mada u toku leta temperature mogu biti i veće od 20°C s obzirom da su u pitanju jako male reke, zapravo potoci. Koncentracija rastvorenog kiseonika se kreće od 7.5 do 13.5 mg l⁻¹, tako da prema ovim vrednostima navedene reke spadaju u vode I ili II kategorije. Elektroprovodljivost i blago alkalni pH se takođe kreću u granicama karakterističnim za ovaj tip vode. Glavni stanovnici faune dna predstavljeni su vrstama iz redova Ephemeroptera i Trichoptera. Struktura zajednica riba analiziranih reka (Brnjica, Kožica, Dobra, Boljetinska, Zlatica i Porečka) je slična, mada postoje razlike, naročito kada je u pitanju Porečka reka, koja je i najveća od svih analiziranih pritoka. Upravo zbog njihove male veličine, dešava se da tokom sušnih godina

ili perioda godine, neki delovi ovih reka potpuno presuše, što ima dalekosežne posledice na riblje zajednice. Obodni delovi potopljenih ušća ovih reka predstavljaju prirodna plodišta i rastilišta (staništa mlađi). Pored potočne pastrmke, u sastav riblje zajednice ovih pritoka ulaze i potočna mrena, pliska, pijor, krkuša, klen i manić.

1.4.1.4. Posledice izgradnje hidrocentrale Đerdap I

Izgradnjom hidrocentrale Đerdap I 1970. godine i prevodnica kod Kladova, podignut je nivo vode, a između Sipa i Rama nastalo je veštačko jezero, jedno od najvećih u Evropi, oko 140 km dugo i duboko do 130 m. Za vreme maksimalnih vodostaja, uspor vode oseća se do Beograda i Slankamena, kada se dužina jezera poveća na 264 km (Stanković, 2002). Brana dužine 760 m i visine 54 m izazvala je potapanje i izmeštanje nekoliko naselja (Donji Milanovac, Tekija, Sip, Golubinje) u kojima je živelo 10 000 građana tadašnje Jugoslavije i 15 000 građana Rumunije (Marković i Pavlović 1995). Izgradnja brane bez ribljih prolaza presekla je migratorne puteve mnogih ribljih vrsta, a ujezeravanje vode uticalo je na menjanje podloge i nestanka pogodnih plodišta naročito za jesetarske vrste uključujući i rezidentnu kečigu (Simonović, 2001; Kottelat i Freyhoff, 2007). Pored jesetarskih vrsta (sim, pastruga, moruna, dunavska jesetra), ugrožene su i crnomorske haringe. Morune i pastruge ranije su se mogle sresti i u vodama Slovačke, dok su simovi dolazili do Budimpešte. Status ugroženosti ovih vrsta u svetu je kritično ugrožen (CR), a ako se uzme u obzir da relativno kasno dostižu polnu zrelost (oko 15 godina), opstanak ovih vrsta je pod znakom pitanja. Gubitak je utoliko veći jer su one od velikog privrednog značaja, tačnije od jesetarskih vrsta se dobija izuzetno cenjena ikra za pravljenje kavijara (Simonović, 2001). Promena nivoa vode hidroakumulacije takođe negativno utiče na mrest i razviće raznih vrsta riba koje nastanjuju Dunav (Simonović, 2008). Ne zna se kako je ovo podizanje vodostaja uticalo na populacije pastrmki u analiziranim đerdapskim pritokama Dunava i da li je na taj način povećana ili smanjena komunikacija između analiziranih populacija.

1.4.2. Područje Timočke krajine

Timočka krajina pripada zapadnom delu Pontskog basena, kojeg je nekad ispunjavalo more. Ovde se nalazi ušće Timoka u Dunav koje predstavlja najnižu kontinentalnu tačku Srbije i cele bivše Jugoslavije i iznosi 29 m n. v. Ova regija predstavljena je takozvanim „šahovskim reljefom“ jer obuhvata sve tipove reljefa od dolina, preko kotlina do planina. Takođe, što se geološke istorije tiče, ovde su prisutne i sve vrste stena iz različitih perioda. Krajem krede dolazi do sve intenzivnijih tektonskih pokreta ubiranja, izdizanja i razmicanja tla, kada nastaje i Timočki eruptivni masiv izlivanjem andezitsko-dacitske magme u toplo more. Vulkanski tipovi reljefa, poput paleovulkanske kupe Tilva Njagra sa parazitskom kupom Tilva Mika, prisutni su u centralnom delu karpastke Srbije dužinom od 80 km. Najduži tok istočne Srbije predstavljaju Veliki, Beli i Svrljiški Timok zajedno (193 km). Veliki Timok nastaje od Crnog i Belog Timoka, dok Svrljiški Timok odvodnjava Svrljiške planine i teče 800 m podzemno (Marković i Pavlović, 1995). Reka Mirovštica, Radovanska reka i Lukovsko vrelo, koje su analizirane u ovom radu, predstavljaju pritoke Crnog Timoka. To su tipične salmonidne reke sa vrstama koje čine zajednicu gornjeg ritrona ($E_i = 1.00$), poput potočne pastrmke, peša *Cottus gobio*, pijora *Phoxinus phoxinus* i potočne mreke *Barbus balcanicus*. Temperature vode ovih reka u najtoplijem mesecu kreću se od 14 do 17°C, dok je pH blago alkalna, oko 8.2. Najviša prosečna vrednost elektroprovodljivosti je u Lukovskom vrelu i iznosi 515 $\mu\text{S cm}^{-1}$, u Mirovštici 415 $\mu\text{S cm}^{-1}$ dok je u Radovanskoj reci najniža, ali i dalje visoka, 389 $\mu\text{S cm}^{-1}$. Makrozoobentos čine uglavnom vrste reda Amphipoda, Trichoptera i Ephemeroptera. Prema Programu upravljanja ribarskim područjem „Srbija-Istok“ (Simonović i sar. 2008), na ovim rekama ustanovljen je režim ribolova „uhvati i pusti“, dok je Lukovskom vrelu dodeljen status prirodnog plodišta, a ribolov je zabranjen, s obzirom da ova rečica ne prestavlja ribolovno atraktivnu vodu.

1.5. Ciljevi rada

U ovoj studiji postavljeni su sledeći ciljevi:

- Određivanje autohtonih i alohtonih haplotipova potočne pastrmke prisutnih u rekama šireg područja Nacionalnog parka Đerdap (Brnjica, Dobra, Mala Boljetinska, Zlatica, Kožica, Porečka, Zamna, Vratna i Rečka) i sliva Crnog Timoka (Radovanska, Mirovštica i Lukovsko vrelo)
- Utvrđivanje genetičkih razlika u populacijama potočne pastrmke Dunavskog i Timočkog sliva.
- Utvrđivanje uravnoteženosti populacija potočne pastrmke i dominantnih evolucionih mehanizama koji u njima deluju.
- Predlaganje mera zaštite i očuvanja autohtonih populacija potočne pastrmke u slivovima istočne Srbije.

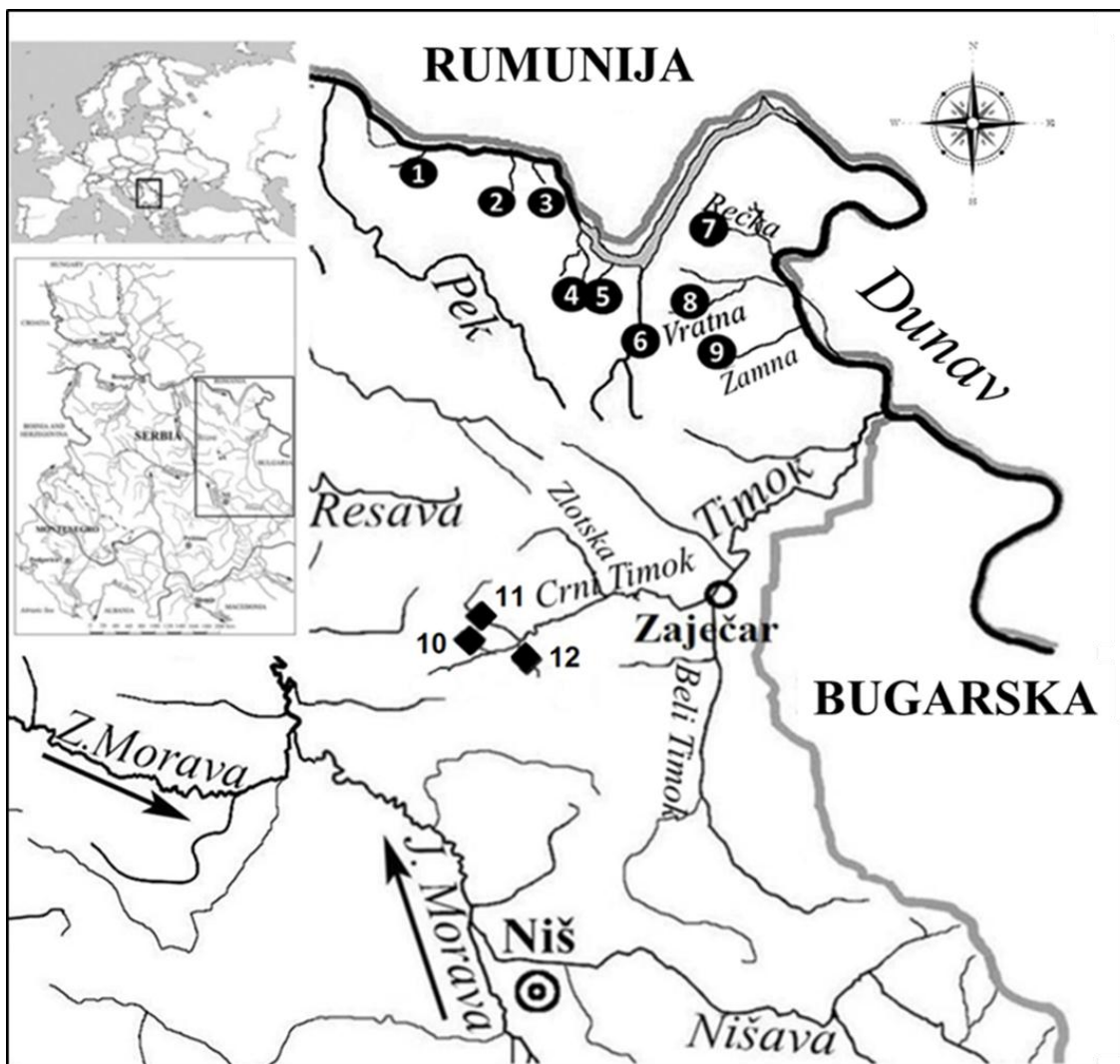
2. Materijali i metode

2.1. Prikupljanje materijala

U periodu od 2011. do 2014. godine vršeno je uzorkovanje materijala na području Nacionalnog parka Đerdap i sliva Crnog Timoka na ukupno 12 lokaliteta, devet u okviru šireg područja Nacionalnog parka Đerdap i tri u okviru sliva Crnog Timoka (Slika 12). U analizu je uključeno ukupno 127 jedinki potočne pastrmke, od kojih je 124 korišćeno u analizi mikrosatelitskih lokusa, dok je sekvenciranje CR mtDNK urađeno na 90 uzoraka, a RFLP analiza za *LDH-C** lokus za 10 uzoraka iz Vratne (Tabela 2). Od 90 uzoraka, 64 je sa područja Nacionalnog parka Đerdap, a 26 sa slivnog područja Crnog Timoka. Na širem području Nacionalnog parka Đerdap iz reke Brnjice (44°38'9.12"N, 21°45'9.70"E) analizirane su dve jedinke, jedan uzorak je iz reke Dobre (44°38'46.1"N, 21°54'17.1"E), 15 uzoraka iz reke Kožice (44°36'04"N, 21°58'01"E), šest iz Male Boljetinske reke (44°29'26"N, 22°01'10"E), 12 iz reke Zlatice (44°28'00"N, 22°05'50"E), 11 iz reke Rečke (44°31'10.82"N, 22°21'13.15"E), 10 iz reke Vratne (44°22'57.07"N, 22°20'23.99"E) i šest iz reke Zamne (44°17'32"N, 22°16'40"E). Uzorak iz Porečke reke (44°25'25"N, 22°10'22"E) potiče od jedinke koja je neočekivano ulovljena u ovoj reci od strane lokalnih ribolovaca i naknadno dostavljena. Na području sliva Crnog Timoka analizirano je 17 jedinki iz Radovanske reke (N 43°53'48.6"; E 21°47'04.0"), osam iz reke Mirovštice (N 43°48'37.1"; E 21°53'32.5") i jedna iz Lukovskog vrela (N 43°48'50.9"; E 21°51'39.4"). Prikupljana su tkiva analnih peraja potočnih pastrmki koja su odlagana u obeležene tubice od 2 ml sa 96% etanolom (Slika 13). Najveći deo materijala je uzorkovan pomoću elektroagregata IG200/1 (*AquaTech*, AU), ulazne struje 12 V, izlazne stuje 500 V, maksimalne jačine 15A DC i frekvencije 65 Hz, dok je jedan deo uzoraka dobijen od ribara, ulovljen ribarskim mrežama. Osim jedinki ulovljenih mrežama, sve ostale su vraćene žive u vodu iz koje su ulovljene odmah nakon uzimanja uzorka za DNK analize.

Tabela 2. Distribucija analiziranih jediniki po mestima uzorkovanja i analiziranim genetičkim markerima.

	mtDNK	Osam mikrosatelitskih lokusa	RFLP <i>LDH-C*</i>
Brnjica	2	-	-
Dobrinjska	1	-	-
Kožica	15	18	-
Mala Boljetinska	6	6	-
Zlatica	12	12	-
Porečka reka	1	-	-
Reka	11	11	-
Vratna	10	10	10
Zamna	6	7	-
Lukovsko vrelo	1	4	-
Radovanska	17	26	-
Mirovštica	8	30	-
Ukupno	90	124	10



Slika 12. Mapa sa mestima uzorkovanja: 1- Reka Brnjica (BR), 2- Dobrinjska reka (DO), 3- Kožica (KŽ), 4-Mala Boljetinska reka (MB), 5- Zlatica (ZL), 6- Porečka reka (PO), 7- Rečka reka (RE), 8- Vratna (VR), 9- Zamna (ZM), 10-Lukovsko vrelo (LV), 11- Radovanska reka (RA) 12 –Mirovštica (MR).



Slika 13. Uzorkovanje pastrmki i čuvanje tkiva analnog peraja u 96% etanolu (Foto: Tošić).

2.2. Laboratorijske analize

Ekstrakcija i amplifikacija DNK rađeni su na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu u Centru za genotipizaciju ribolovnih resursa. Umnoženi PCR fragmenti mtDNK sekvencirani su u MACROGEN[®] Europe, dok je analiza dužine fragmenata mikrosatelitskih lokusa izvršena u Centru za humanu molekularnu genetiku Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

2.2.1. Ekstrakcija DNK

DNK iz uzoraka analnog peraja izolovana je na dva načina: tehnikom izoljavanja (Miller i sar. 1988) i pomoću kita za ekstrakciju Quick-gDNA[™] MiniPrep (*Zymo research Corporation, SAD*), prema uputstvima proizvođača. Tehnika izoljavanja, koja je korišćena u početku, pokazala je brojna ograničenja. Najverovatnije zbog ostataka velike količine soli u izolatima DNK, umnožavanje željenih fragmenata PCR metodom bilo je uglavnom neuspešno. Početni koraci izolacije isti su za obe tehnike. Deo analnog peraja veličine oko 4 mm² ispira se od alkohola destilovanom vodom i suši se na papiru, pa prenosi u obeleženu tubu od 1.5 ml. Zatim se doda 200 µl ekstrakcionog TEN pufera², 7 µl 10% AccuGene[®] SDS³ (*Lonza, CH*) i 5 µl proteinaze K (*Applied Biosystems[®], SAD*), uz mešanje obrtanjem. Praćenjem instrukcija priloženog uputstva za optimalne uslove delovanja enzima proteinaze K, tubice sa uzorkom i dodatim reagensima se stavljaju na inkubaciju, 1h na 65°C i 500 rpm.

2.2.1.1. Tehnika izolacije DNK izoljavanjem

Nakon inkubacije u svaku tubicu dodato je 10 µl 5M NaCl koje su zatim centrifugirane 15 min na 2000 g (*BOECO, DE*). Iz svake tubice supernatant je prebačen u novu isto obeleženu tubicu, a talog je odbačen. Ovaj postupak ponavlja se još dva puta i nakon poslednjeg centrifugiranja i presipanja supernatanta u svaku tubicu, dodaje se 1 ml 96% etanola. Mešanjem obrtanjem prati se promena boje rastvora i prisustvo belih niti

² TEN pufer sastoji se od 1 M Tris-HCl, 0.5 M EDTA i 2 M NaCl

³ Deterdžent natrijum dodecil sulfat (eng. *sodium dodecyl sulfate, SDS*)

DNK u tubicama. Tubice se zatim kratko centrifugiraju na najvećoj brzini u trajanju od 15 s. Posle centrifugiranja odliva se supernatant, a talog se zadržava i u svaku tubicu se dodaje po 1 ml 75% etanola uz mešanje obrtanjem ili blagim vorteksiranjem. Sadržaj tubica se ponovo centrifugira na najvećoj brzini u trajanju od 15 s, zatim se pažljivo pipetom izvlači supernatant, a u talogu ostaje izolovana DNK. Talog se suše na vazduhu dok ne ispari sav alkohol i dodaje se 30 µl AccuGene[®] molekularne vode (*Lonza*, CH). Uzorci se ostavljaju na 4°C jedan dan kako bi se rastvorila DNK, a zatim se koriste za molekularne analize ili se čuvaju u zamrzivaču na -20°C. Jedan deo uzoraka izolovane DNK na ovaj način prečišćen je kroz Zymo-Spin[™] kolonice iz Quick-gDNA[™] MiniPrep kita (*Zymo research Corporation*, SAD), koji je zatim uspešno korišćen za amplifikaciju.

2.2.1.2. Quick-gDNA[™] MiniPrep

Ovaj način izolacije DNK urađen je prema uputstvima proizvođača (*Zymo research Corporation*, SAD) za materijal razgrađen pomoću proteinaze K (*Applied Biosystems*[®], SAD). Izolovana DNK rastvorena je u 60 µl odgovarajućeg pufera (*DNA Elution Buffer*) i čuvana na -20°C. Nakon izolacije DNK proverena je uspešnost ekstrakcije na gelu.

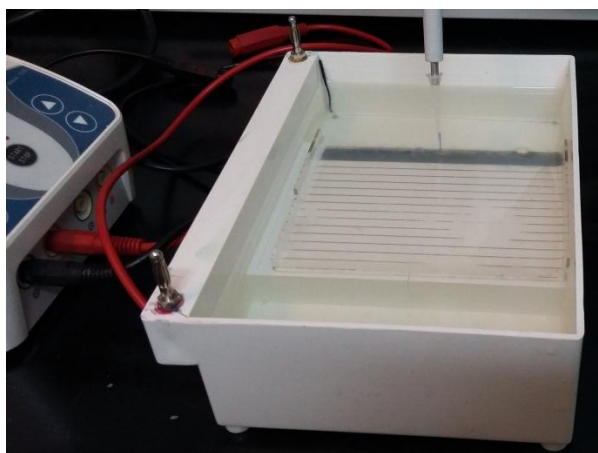
2.2.2. Agarozna gel elektroforeza

Osim provere ekstrakcije DNK, agaroznom gel elektroforezom, proverena je i uspešnost amplifikacije ciljanih fragmenata DNK, kao i analiza dužina fragmenata nakon delovanje restrikcionih enzima na produkt. Amplifikacija mikrosatelitskih lokusa nije proveravana na gelu. Agarozni gel pravi se od agaroze i 0.5X TBE pufera⁴ za elektroforezu. U zavisnosti od dužine ciljanog fragmenta, prave se agarozni gelovi različite procentnosti. Što su fragmenti duži, gel je manje procentan. Za proveru ekstrakcije DNK korišćen 0.5 – 1% gel, za proveru fragmenta CR mtDNK dužine 1100 bp korišćen je 1.5% gel, dok je za *LDH-C** fragment dužine 440 bp korišćen 2.5 - 3% gel. U zavisnosti od dužine ciljanog produkta koriste se i odgovarajući standardi za veličinu DNK. Tako je za proveru

⁴ Sastav TBE pufera (pH 8.0) za elektroforezu je 0.5M Tris baza, 0.5 M borna kiselina i 0.1 mM EDTA koji se rastvara na pH 8.3 uz dodavanje NaOH

ekstrakcije DNK korišćen marker od 1 kb (*Thermo Fisher Scientific, SAD*), dok je za *LDH-C** korišćen marker od 50 bp (*Thermo Fisher Scientific, SAD*).

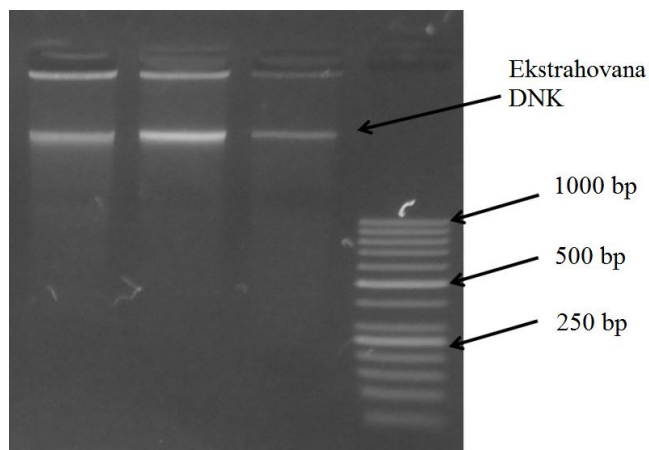
Za pravljenje 0.8% gela koristi se 0.8 g agaroze i TBE pufera, pH=8.0 koji se dodaje do 100 ml. Ova smeša se zagreva u mikrotalasnoj rerni na 70°C do ključanja dok se agarozna potpuno ne rastvori. Prilikom hlađenja posude sa gelom u vodi neophodno je konstantno mešanje štapićem kako se ne bi gel neravnomerno ohladio i time neravnomerno polimerisao. U ovu zapreminu gela dodaje se 3 µl SybrGreen (*Lonza, CH*) fluorescentne boje koja omogućava vizuelizaciju DNK u gelu. Kada dostigne temperaturu od oko 50°C, gel se naliva u odgovarajuće kalupe gde se ostavlja oko 20 min da polimeriše. Gel se vadi iz kalupa i stavlja u kadicu (*MRC, IL*) ispunjenu TBE puferom koji prekriva gel. U bunarčice na gelu nanosi se 4 µl izolovane DNK i u jedan bunarić se nanosi standard za veličinu DNK. Svi uzorci se prethodno pomešaju sa 1 µl 6X pufera za nalivanje uzoraka (*Thermo Fisher Scientific, SAD*) na parafilmu (Slika 14).



Slika 14. Procedura nalivanja uzoraka na gel (Foto: Tošić).

Elektroforeza je izvođena u trajnju od 30 minuta na naponu od 100 V. Kada je elektroforeza završena, DNK u gelu se vizuelizuje pomoću UV-transiluminatora (*Vilber Lourmat, FR*) (Slika 15) na svetlosti talasne dužine od 302 nm. Na ovaj način može se proceniti i koncentracija DNK poređenjem sa jačinom pojedinih traka standarda za veličinu

DNK. Ukoliko je neophodno, DNK se može dodatno razblažiti vodom za molekularno-biološke eksperimente ili odgovarajućim puferom.



Slika 15. Provera ekstrahovane DNK na gelu (Foto: Tošić).

2.2.3. Amplifikacija lančanom reakcijom polimeraze

Otkrićem polimeraze koja je stabilna na vrlo visokim temperaturama (Mullis, 1985), omogućena je amplifikacija bilo kojeg željenog fragmenta DNK *in vitro* do ogrmonog broja kopija. Lančana reakcija polimeraze (eng *polymerase chain reaction*, PCR) korišćena je u ovom radu za umnožavanje CR mtDNK, dela jedarnog gena za *LDH-C** kao i za osam mikrosatelitskih lokusa.

2.2.3.1. Amplifikacija kontrolnog regiona mitohondrijske DNK

Deo CR (D-petlje) mtDNK, dužine oko 1100 bp, umnožen je pomoću prajmera 28RIBa (5'-CAC CCT TAA CTC CCA AAG CTA AG -3') (Snoj i sar. 2000) i HN20 (5'-GTG TTA TGC TTT AGT TAA GC-3') (Bernatchez i Danzmann, 1993). U tubicama zapremine 0.2 ml napravljena je smeša za PCR ukupne zapremine 30 μ l sledećeg sastava: 0.4 μ M oba prajmera (*Metabion*, DE), 0.2 mM svaki dNTP, 1X PCR pufer (*Invitrogen*TM, SAD), 1.5 mM MgCl₂, 1.5 U *Taq* polimeraze (*Invitrogen*TM, SAD) i ~100 ng DNK. Umnožavanje je urađeno u aparatu ProFlexTM PCR System (*Applied Biosystems*[®], SAD) po sledećem programu: inicijalna denaturacija (95°C, 5 min), zatim 35 ciklusa denaturacije

(94°C, 1 min), vezivanja prajmera (52°C, 1 min) i elongacije (72°C, 2 min), i završena elongacija (72°C, 10 min). Po završetku PCR reakcije uspešnost amplifikacije je proveravana na 1.5% gelu kao što je opisano u poglavlju 2.2.2.

2.2.3.2. Amplifikacija mikrosatelitskih lokusa

Ukupno osam mikrosatelitskih lokusa korišćeno je u analizi: SsoSL438 (Slettan, 1995), Ssa85 (O'Reilly i sar. 1996), Str73INRA (Estoup i sar. 1993), SSsp2216 (Paterson i sar. 2004), Ssa410Uos (Cairney i sar. 2000), SsaD190, SsaD71 (King i sar. 2005) i OMM1064 (Rexroad i sar. 2002). Prajmeri za umnožavanje mikrosatelita preuzeti su iz navedenih radova (Tabela 3), dok su očekivane dužine PCR produkta (Tabela 3) preuzete iz Lerceteau-Kohler i Weiss (2006). Svaki uzvodni prajmer (eng. *forward*, F) obeležen je odgovarajućom fluorescentnom bojom koja omogućava detekciju fragmenta, čija se dužina očitava u odnosu na standard za veličinu DNK. Amplifikacija fragmenata osam lokusa urađena je u četiri dupleks reakcije, odnosno u jednoj reakciji kombinovana su po dva lokusa čije se očekivane dužine PCR produkta ne preklapaju (Tabela 3). Finalna koncentracija prajmera za lokuse SsaD190, SsaD71, SSsp2216 i OMM1064 iznosila je 0.2 µM, za prajmere lokusa Ssa410Uos i SsoSL438 0.4 µM, lokusa Str73INRA 0.15 µM i lokusa Ssa85 0.1 µM. Ostali uslovi amplifikacije bili su identični za navedene dupleks reakcije. Smeša za PCR pravljena je u zapremini od 10 µl sa 1X PCR puferom (*Invitrogen*TM, SAD), 0.2 mM svakim dNTP-om, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 U *Taq* polymerase (*Invitrogen*TM, SAD) i ~100 ng DNK sa izuzetkom četvrtog dupleksa gde je korišćeno ~200 ng DNK. Početni korak denaturacije od 3 min na 94°C praćen je denaturacijom (94°C, 45 s), vezivanjem prajmera (60°C, 1 min) i elongacijom (72°C, 30 s) koji su se naizmenično ponavljali u 30 ciklusa i finalnom elongacijom od sat vremena na 72°C. Jedino se u četvrtom dupleksu vezivanje prajmera odvijalo na 57°C, a broj ciklusa je bio 35. Dužina dobijenih produkata očitavana je fragment analizom.

Tabela 3. Analizirani mikrosateliti, njihova struktura, očekivana dužina PCR produkta i prajmeri korišćeni za njihovu amplifikaciju uz naznačen fluorescentni obeleživač (FAM ili NED).

Lokus	Ponavljajući motiv	Boja	Sekvence prajmera	Izvor	Očekivana dužina produkta
Prva dupleks reakcija					
Str73INRA	(GT) _x TTATCT(GT) ₃	FAM	5'-CCTGGAGATCCTCCAGCAGGA-3' 5'-CTATTCTGCTTGTAAGTACCTA-3'	Estoup i sar. 1993.	138-144 bp
Ssa410Uos	(GACA) _x	FAM	5'-GGAAAATAATCAATGCTGCTGGTT-3' 5'-CTACAATCTGGACTATCTTCTCA-3'	Cairney i sar. 2000.	173-310 bp
Druga dupleks reakcija					
SsaD190	(TAGA) _x	FAM	5'-GGCATTGGAGGTAAGGACAC-3' 5'-CCAGACCACTGAACTTCTCATC-3'	King i sar. 2005.	115-157 bp
SsaD71	(TAGA) _x	FAM	5'-AACGTGAAACATAAATCGATGG-3' 5'-TTAAGAATGGGTTGCCTATGAG-3'	King i sar. 2005.	183-239 bp
Treća dupleks reakcija					
Ssa85	(GT) ₁₄	FAM	5'-AGGTGGGTCCTCCAAGCTAC-3' 5'-ACCCGCTCCTCACTTAATC-3'	O'Reilly i sar. 1996.	101-113 bp
SSsp2216	(GTTA) ₂₅	NED	5'-GGCCCAGACAGATAAACAAACACGC-3' 5'-GCCAACAGCAGCATCTACACCCAG-3'	Paterson i sar. 2004.	133-215 bp
Četvrta dupleks reakcija					
SsoSL438	(AC) _x AT(AC) ₆	NED	5'-GACAACACACAACCAAGGCAC-3' 5'-TTATGCTAGGTCTTTATGCATTGT-3'	Slettan, 1995.	89-109 bp
OMM1064	(GATA) ₁₉	NED	5'-AGAATGCTACTGGTGGCTGTATTGTGA-3' 5'-TCTGAAAGACAGGTGGATGGTTCC-3'	Rexroad i sar. 2002.	163-286 bp

2.2.3.3. Amplifikacija *LDH-C**

Umnožavanje *LDH-C** regiona dužine 440 bp izvršeno je pomoću prajmera Ldhxon3F (5'-GGC AGC CTC TTC CTC AAA ACG CCC AA-3') i Ldhxon4R (5'-CAA CCT GCT CTC TCC CTC CTG CTG ACG AA-3') (McMeel i sar. 2001). Smeša za PCR ukupne zapremine 30 µl bila je sledećeg sastava: 1X PCR pufer (*Invitrogen*TM, SAD), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM svaki dNTP, 0.5 µM oba prajmera (*Metabion*, DE), 1.5 U *Taq* polimeraze (*Invitrogen*TM, SAD) i ~100 ng DNK. PCR reakcija započeta je inicijalnom denaturacijom na 95°C u trajanju od 5 min, nastavljena sa 30 ciklusa denaturacije (94°C, 1

min), vezivanja prajmera (62°C, 1 min) i elongacije (72°C, 1 min) i završena finalnom elongacijom na 72°C u trajanju od 10 minuta.

Dobijeni umnožci *LDH-C** gena vizualizovani su u 2.5% agaroznom gelu kao što je opisano u poglavlju 2.2.2. uz odgovarajući standard za veličinu DNK. Dobijeni PCR produkti su zatim korišćen u restrikcionoj analizi.

2.2.4. RFLP analiza

Restrikcionom analizom može se utvrditi polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata (eng. *restriction fragment length polymorphism*, RFLP) dobijenih digestijom restrikcionim enzimima. Restrikcioni enzimi seku DNK molekul na specifičnim mestima (obično su u pitanju palindromske sekvence), pa ukoliko na nekom delu DNK postoji polimorfizam ovi enzimi neće raditi, a dobijeni produkti će se razlikovati po dužini. Amplifikovani gen *LDH-C** prisutan je u dva oblika *LDH-C*90* i *LDH-C*100*, a restrikcioni enzim *BseII* seče DNK na mestu CCCNNNNN/NNGGG. Kod alela *LDH-C*90* ovaj enzim prepoznaje navedenu sekvencu i stvara dva fragmenta dužine 360 i 80 bp za razliku od alela *LDH-C*100* kod kojeg postoji supstitucija G u A tako da enzim ne prepoznaje mesto i fragment ostaje dužine 440 bp. Kod heterozigota *LDH-C*90/100* videće se tri trake na gelu od kojih se prve dve (440 i 360 bp) jasno uočavaju, dok će kod homozigota moći da se uoči samo jedna traka dužine 440 ili 360 bp. Dobijeni PCR produkti inkubirani su 16 sati sa *BseII* (*Thermo Fisher Scientific*, SAD) restrikcionim enzimom na 55°C. Prema uputstvu 10 µl produkta PCR reakcije sa 1.5 µl enzima, 2 µl 10X Tango pufera i 18 µl molekularne vode. Nakon toga izvršena je elektroforeza na 2.5% gelu uz marker od 50 bp i vizuelizacija na transiluminatoru.

2.2.5. Sekvenciranje kontrolnog regiona mitohondrijske DNK

Umnoženi fragmenti CR mtDNK poslani su u MACROGEN[®] Europe na prečišćavanje i Sangerovo sekvenciranje. Sekvenciranje je obavljeno pomoću kita za sekvenciranje, ABI BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (*Applied Biosystems*, SAD) u PCR mašini DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler (BIO-RAD), prema

uputstvima proizvođača. Reakcija sekvenciranja izvršena je u jednom smeru pomoću F - prajmera, 28RIBa. Produkti reakcije sekvenciranja prečišćeni su pomoću kita za prečišćavanje, BigDye XTerminator® Purification Kit (*Applied Biosystems, SAD*), prema uputstvima proizvođača. Produkti reakcije sekvenciranja su razdvojeni kapilarnom elektroforezom na sekvenatoru ABI 3730xl DNA Analyzer (*Applied Biosystems, SAD*). Dobijene sekvence DNK analizirane su u odgovarajućim programima (Poglavlje 2.3).

2.2.6. Fragment analiza mikrosatelitskih lokusa

Korišćenjem kapilarne elektroforeze koja razdvaja DNK fragmente na osnovu njihove dužine sa rezolucijom od 1 bp analizirani su produkti umnožavanja osam mikrosatelitskih lokusa. Na optičku ploču sa 96 polja (MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate, *Applied Biosystems, SAD*) naliveno je 8.7 µl Hi-Di formamida (*Applied Biosystems, SAD*), 0.3 µl standarda za dužinu DNK (Gene Scan 500 Lize Standard, *Applied Biosystems, SAD*) i 1.1 µl PCR produkta. Optička ploča centrifugirana je 1 min na 300 rpm, a zatim inkubirana 5 min na 95°C i odmah stavlja na led nekoliko minuta. Parametri za kapilarnu elektroforezu, izvedenu na sekvenatoru ABI-3130 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems, SAD*), izabrani su pomoću softvera Data Collection v3.1 (*Applied Biosystems, SAD*). Pri naponu od 3 kV vreme injektiranja uzorka bilo je 10 s, elektroforeza je urađena pri naponu od 15 kV na 60°C/25 min u kapilari od 36 cm ispunjenom polimerom POP4 (Performance Optimized Polzmer™ - 4, *Applied Biosystems, SAD*). Dobijeni rezultati analizirani su softverom GeneMapper® ID v3.2.1 (*Applied Biosystems, SAD*).

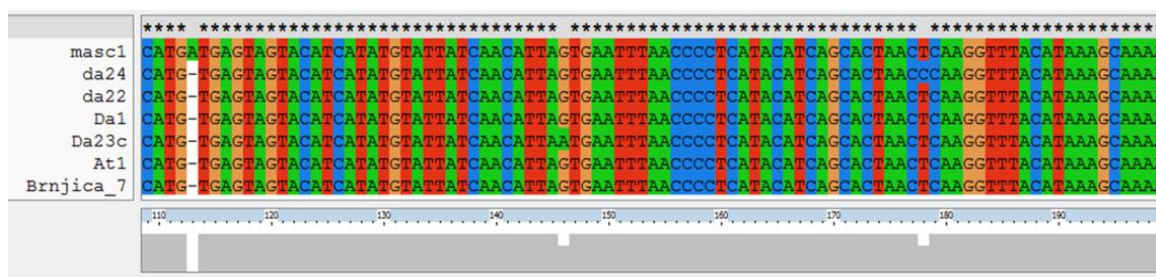
2.3. Softverske analize

Za analizu CR mtDNK korišćeni su programski paketi ClustalX2 (Larkin i sar. 2007), Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier i Lischer, 2010) i Network 5.0.0.0 (Bandelt i sar. 1999, fluxus-engineering.com), dok su za analizu mikrosatelitskih alela, prisutnih u populacijama, korišćeni programi Micro-checker 2.2.3 (van Oosterhout i sar. 2004.), GENETIX 4.05 (Belkhir i sar. 1996-2004), Fstat 2.9.3.2 (Goudet, 2002), POPULATIONS 1.2.31 (Langella 2002), Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier i Lischer, 2010), BOTTLENECK 1.2.02 (Cornuet i

Luikart 1996; Piry i sar. 1999), STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard i sar. 2000), Structure Harvester (Earl i vonHoldt, 2012) i STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc., 2001).

2.3.1. Programska analiza kontrolne regije mitohondrijske DNK

Sekvence, koje su dobijene iz MACROGEN Europe, upoređene su sa ostalim sekvencama iz Banke Gena (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) u okviru NCBI (eng. *National Center for Biotechnology Information*) baze pomoću alatke BLAST (eng. *Basic Local Alignment Search Tool*), kako bi se utvrdilo da li su pronađeni novi haplotipovi. Dobijene sekvence upoređene su korišćenjem programa ClustalX2 (Larkin i sar. 2007), kako međusobno, tako i sa pojedinim sekvencama CR dunavske haplogrupe i najčešćim haplotipovima ostalih haplogrupa (Slika 16) koji su preuzeti iz Banke Gena (Da1, Da2, Da-s6, Da22, Da23a, Da23b, Da-Dž, Da-Vr, Da-Vl, Ad1, At1, ATcs39, DUcs6, Ma1, Ma-s2, Ad-Prž, Ad-Bož)⁵. Navedene sekvence analizirane su u programu Network 5.0.0.0 (fluxus-engineering.com) korišćenjem MJ metode (eng. *Median Joining*) (Bandelt i sar. 1999), kako bi se odredili odnosi među njima. U svih devet populacija analiziran je sastav i diverzitet nukleotida, kao i diverzitet haplotipova, genetički diverzitet između parova populacija (eng. *pairwise FST*) i indeks fiksacije F_{ST} , kao i analiza molekularne varijanse (AMOVA) korišćenjem matrice distanci (*pairwise difference method*) u programu Arlequin (Excoffier i Lischer, 2010).



Slika 16. Izgled poređenih sekvenci u programu ClustalX sa varijabilnim mestima (bez zvezdice).

⁵ Pristupni brojevi za haplotipove: AH012981.2, AY185570.1, U18202.1, AY185573.1, AY185574.1, AY185575.1, DQ318124, DQ318125.1, DQ318123.1, AH012977.2, AF321990.1, EF530501.1, EF530518.1, AH012980.2, DQ318130, DQ318129.1, DQ318128.1, respektivno.

2.3.2. Programska analiza mikrosatelitskih lokusa

Kako bi se ustanovilo postojanje nultih alela ili greške u određivanju genotipova i kucanju, korišćen je program Micro-checker v. 2.2.3 (van Oosterhout i sar. 2004). U programu GENETIX 4.05 dobijene su vrednosti heterozigotnosti (očekivana, objektivna i detektovana), prosečan broj alela po lokusu, učestalost alela, kao i indeks fiksacije unutar dema (F_{IS}) prema Weir i Cockerham (1984) (W&C) i Robertson i Hill (1984) (R&H). U ovom programu izračunate su Nei distance (Nei, 1972) između populacija na 1000 permutacija, indeks fiksacije između dema F_{ST} , a urađena je i korespondentna faktorijalna analiza (FCA). Pomoću FSTAT 2.9.3.2 programa (Goudet, 2002) dobijene su vrednosti genskog diverziteta po lokusima i bogatstvo alela (eng. *allelic richness*), prosečan broj alela po lokusima u populacijama, kao i vrednosti Rajtove F statistike (F_{IS} , F_{ST} i F_{IT}). U ovom programu je testirano i da li su populacije u Hardi-Vajnbergovoj ravnoteži (eng. *Hardy-Weinberg equilibrium*, HWE). Program Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier i Lischer, 2010) korišćen je za računanje genetičkog diverziteta između populacija kao i analiza molekularne varijanse (AMOVA). Alelske distance (eng. *shared allele distances*, DAS, Chakraborty i Jin, 1993) korišćene su za procenu genetičke udaljenosti između jedinki i između populacija u programu POPULATIONS 1.2.31 (Langella, 2002), kao i za konstrukciju Neighbor-Joining (NJ) stabala. Podaci dobijeni korespondentnom faktorijalnom analizom u programu GENETIX 4.05 grafički su predstavljani u programu STATISTICA 6.0. Ovde je urađena i klaster analiza zasnovana na matricama DAS distanci dobijenih u programu POPULATIONS 1.2.31.

Pomoću programskog paketa BOTTLENECK 1.2.02 (Cornuet i Luikart, 1996; Piry i sar. 1999) procenjeno je da li je u navedenim populacijama došlo do ispoljavanja efekta uskog grla. Program koristi tri testa: *Sign test*, *Standardized differences test* i *Wilcoxon test* (*Sign-rank test*) za računanje i poređenje ravnotežne očekivane (H_{eq}) i uočene heterozigotnosti (H_e) u populacijama i tri modela mutacija: IAM, TPM i SMM (Videti poglavlje 1.2.2). Ukoliko je H_e veće od H_{eq} na većini lokusa, to znači da je u populaciji došlo do ispoljavanja efekta uskog grla. Test *Standardized differences* nije korišćen za analizu jer je neophodno najmanje 20 mikrosatelitskih lokusa, tako da su korišćeni *Sign* i

Wilcoxon (Sign-rank test) test sa sledećim parametrima za procenu značajnosti: proporcijom jednog mutacionog koraka u TPM od 95%, varijansom mutacije za TPM podešenom na 12 i 100 000 iteracija. Takođe, treba naglasiti da IAM model mutacija nije najpouzdaniji za analizu mikrosatelitskih lokusa (Cornuet i Luikart, 1996).

U programu STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard i sar. 2000), analizirana je struktuiranost populacija sa pretpostavljenim brojem grupa $K = 10$. Period testiranja podešen je od 100 000 do 500 000, što je ponovljeno 7 puta za svaku grupu K . Kako bi se procenila najverovatnija K vrednost prema Evanno i sar. (2005), korišćen je Structure Harvester softver (Earl i vonHoldt, 2012).

3. Rezultati

3.1. Analiza mitohondrijske DNK

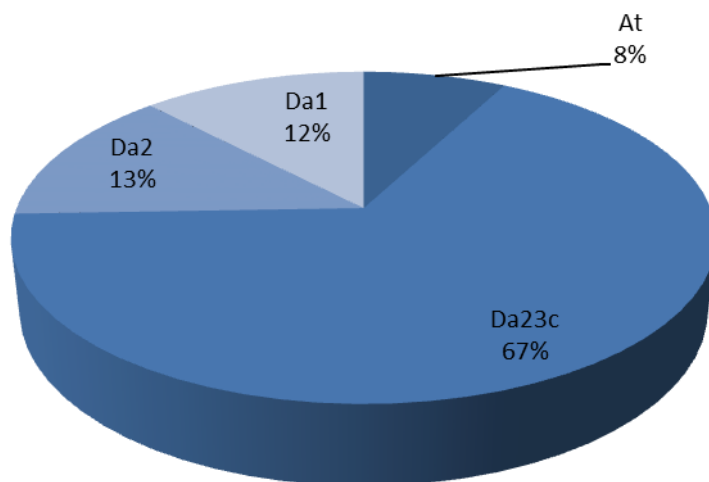
U okviru analiziranih uzoraka iz navedenih reka otkrivena su četiri različita haplotipa CR od kojih je jedan bio novoopisan. Kod jedinki iz sliva Crnog Timoka (Mirovštica, Radovanska i Lukovsko vrelo) to su bila dva haplotipa: Da2 i novootkriveni Da23c dok su kod jedinki na širem području Đerdapa otkrivena tri od kojih je jedan isti kao u slivu Crnog Timoka: Da1 (Da-s1), Da23c i At1. Novootkriveni Da23c haplotip pohranjen je u Banci Gena pod pristupnim brojem KC630984. Na poziciji 145 novog haplotipa nalazi se A, a na Da1 G nukleotid što predstavlja jedinu razliku u prvom delu sekvence CR koja je analizirana. Haplotipovi Da23a i Da23b na datoj poziciji imaju isti nukleotid, dok se Da23c od njih razlikuje na pozicijama 234 i 235 (Tabela 4).

Tabela 4. Varijabilna mesta dunavskih haplotipova i jednog atlanskog nađenih na području Srbije.

Haplotip	Varijabilna mesta CR mtDNK														
	2	26	61	145	227	233	234	235	388	389	529	541	542	544	547
Da1	C	A	C	G	T	G	A	G	T	C	C	A	C	T	T
Da2	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-
Da-s6	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Da22	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-
Da23a	-	-	-	A	-	A	G	-	-	-	-	-	-	G	-
Da23b	-	-	-	A	-	A	G	-	-	-	-	-	-	-	-
Da23c	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Da*Dz	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	T	G	-	-	C
Da*Vr	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	T	G	G	-	C
Da*Vl	-	-	-	-	-	-	G	-	-	T	-	-	-	-	-
At1	T	T	-	-	-	-	-	T	C	T	T	G	G	-	C

Na poziciji 544, Da23c (T) se razlikuje od Da23a (G), ali ne i od Da23b. Od Da2 se, osim na poziciji 145, razlikuje i na poziciji 234, gde se kod Da2 nalazi G, a kod Da1 A. Razlika u dva nukleotidna mesta prisutna je između Da23c i Da-s6 na mestu broj 26, gde je kod Da23c prisutan A, a na Da-s6 G. Od haplotipa Da22 razlikuje se takođe na dve

pozicije, od Da*VI na tri pozicije, od Da*Dz na pet pozicija, dok se od Da*Vr razlikuje na šest pozicija. U okviru uzoraka potočne pastrmke iz sliva Crnog Timoka, osam od 17 jedinki u Radovanskoj reci, pet od osam u Mirovštici i jedna iz Lukovskog vrela nosili su novootkriveni haplotip Da23c, dok su ostale bile Da2 haplotipa. Od ukupno 64 uzoraka sa područja Đerdapa, sedam (10.93%) je nosilo atlanski haplotip. U rekama Kožica, Mala Boljetinska, Zlatica i Zamna prisutan je jedino haplotip Da23c. U reci Vratni ovaj haplotip je prisutan kod sedam jedinki, dok su tri nosile haplotip AT linije. Svih 11 uzoraka iz Rečke reke imale su haplotip Da1. U ukupnom uzorku procentualna zastupljenost atlanskog haplotipa je 8%, haplotipa Da1, 12%, haplotipa Da2, 13% i haplotipa Da23c je 67% (Slika 17).



Slika 17. Procentualna zastupljenost detektovanih haplotipova na području severoistočne Srbije.

Rezultati analize molekularne varijanse, AMOVA (Tabela 5) pokazali su da je najveći procenat varijabilnosti u svih 12 reka između populacija (62.65%), sa odgovarajućom vrednošću indeksa fiksacije F_{ST} od 0.6265.

Tabela 5. Analiza molekularne varijanse (AMOVA) preko učestalosti haplotipova u okviru i između populacija. Stepene slobode (d.f.), suma kvadrata (SS) i proporcija varijanse (%Var), verovatnoća (p).

Izvor varijabilnosti	d.f.	SS	Varijabilnost komponenti	% Var	p
Između populacija	11	15.045	0.17658	62.65	<0.01
U okviru populacija	78	8.210	0.105526	37.35	
Ukupno	89	23.256	0.28184		
Indeks fiksacije F_{ST}	0.6265				

Na osnovu učestalosti haplotipova izračunate su značajne razlike između populacija (Tabela 6). Reka Rečka značajno se razlikuje od najvećeg broja populacija (8), dok populacije Porečke reke i Lukovskog vrela nisu pokazale značajne razlike u odnosu na ostale populacije. Vrednosti F statistike pokazale su značajne razlike između Rečke reke, s jedne strane i reka Kožice, Male Boljetinske, Zlatice, Zamne, Radovanske i Mirovštice (1.00, $P < 0.01$) sa druge strane.

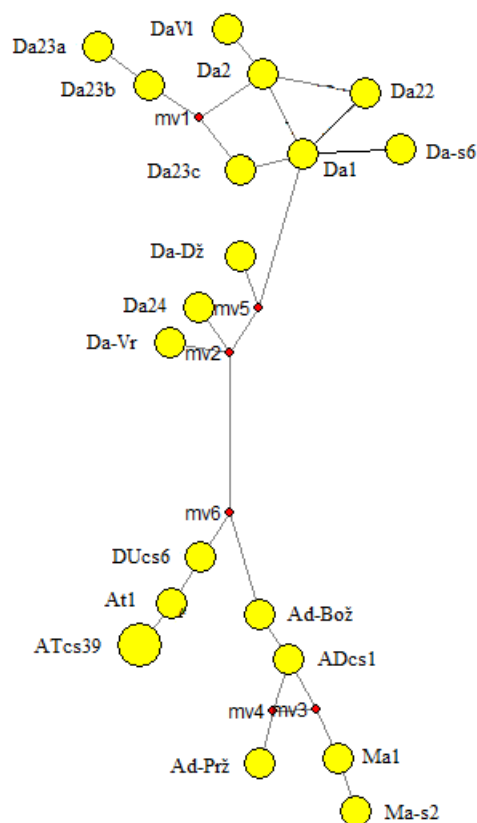
Od ukupno 11 polimorfnihi mesta, dva su pokazala različite F_{ST} vrednosti. Na polimorfnom mestu 145 $F_{ST} = 0.56223$, a na mestu 234 $F_{ST} = 0.35750$, dok su na svim ostalim mestima F_{ST} vrednosti iznosile 0.65721. Sve F_{ST} vrednosti bile su statistički značajne ($P < 0.01$).

Iako su na području severoistočne Srbije otkriveni i haplotipovi Da1, Da2 i At1, najčešći haplotip je Da23c (Slika 17).

Tabela 6. Tabela značajnih razlika između tokova (BR-Brnjica DO-Dobrinjska reka KŽ-Kožica MB-Mala Boljetinska ZL-Zlatica PO-Porečka RE-Rečka VR-Vratna ZM-Zamna RA-Radovanska MR-Mirovštica LV- Lukovsko vrelo). Dijagonalno levo: vrednosti parnih F_{ST} zasnovani na učestalosti haplotipova, dijagonalno desno značajnost ovih vrednosti * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$, H-diverzitet haplotipova, π – nukleotidni diverzitet.

	BR	DO	KŽ	MB	ZL	PO	RE	VR	ZM	RA	MR	LV	H	π
BR		0.991	**	**	*	0.991	*	0.135	*	**	*	0.991	0	0
DO	0		*	0.126	0.072	0.991	0.126	0.324	0.991	0.054	0.117	0.991	0	0
KŽ	1	1		0.991	0.991	0.991	**	*	0.991	**	0.081	0.991	0	0
MB	1	1	0		0.991	0.991	**	0.207	0.991	0.099	0.225	0.991	0	0
ZL	1	1	0	0		0.991	**	0.090	0.991	**	0.054	0.991	0	0
PO	0	0	1	1	1		0.072	0.333	0.153	0.054	0.171	0.991	0	0
RE	1	1	1	1	1	1		**	**	**	**	0.991	0	0
VR	0.464	0.333	0.290	0.143	0.252	0.333	0.777		0.306	*	0.297	0.991	0.467	0.008
ZM	1	1	0	0	0	1	1	0.143		*	0.189	0.991	0	0
RA	0.551	0.470	0.482	0.368	0.451	0.471	0.690	0.252	0.368		0.658	0.991	0.529	0.002
MR	0.569	0.464	0.409	0.233	0.363	0.464	0.771	0.111	0.233	-0.050		0.991	0.536	0.002
LV	1	1	0	0	0	1	1	-0.556	0	0	-0.429		0	0

Otkrivanje položaja haplotipa Da23c u odnosu na ostale, urađeno je u programu Network 5.0.0.0. Poređenje je vršeno sa dunavskim haplotipovima nađenim na području Srbije iz Tabele 4 i sa nekoliko stranih haplotipova drugih haplogrupa (At1, ATcs39, DUcs6, Ma1, Ma-s2, Ad-Prž, Ad-Bož). Haplotip Da1 predstavljen je kao centralni u odnosu na ostale dunavske haplotipove (Slika 18).

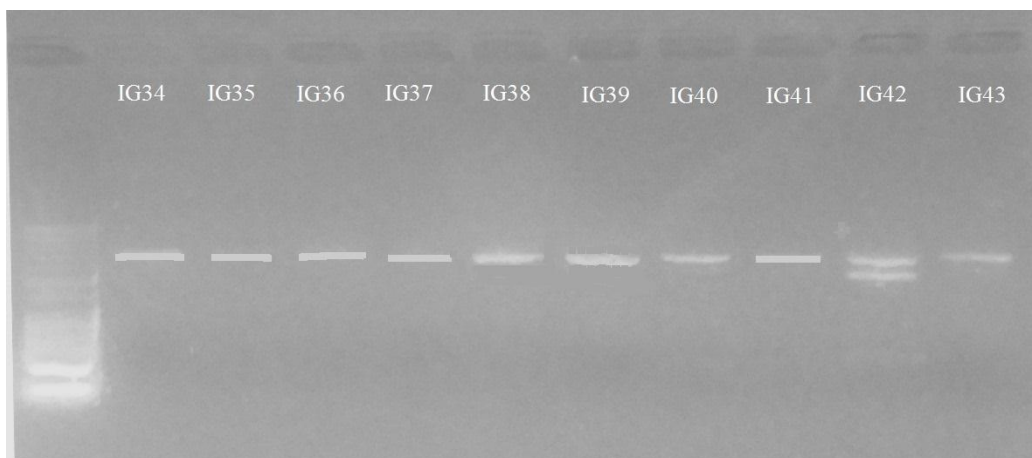


Slika 18. Položaj haplotipa Da23c u odnosu na ostale u okviru mreže haplotipova, mv (eng. *median vector*) – hipotetički haplotipovi koji nedostaju da bi se povezali postojeći metodom maksimalne parsimonije.

3.2. Analiza *LDH***C* lokusa

Jedina reka u kojoj su otkriveni i dunavski i atlanski haplotipovi mitohondrijske DNK je Vratna. Kako bi se utvrdilo da li je došlo do hibridizacije kod uzorkovanih 10 jedinki urađena je restrikciona analiza gena *LDH-C**. Od ovih deset uzoraka, tri (sa oznakama Ig39, Ig40 i Ig42) su nosila atlanski mitohondrijski haplotip, dok su svi ostali bili dunavskog haplotipa. Kod atlanske haplogrupe daleko je prisutniji kraći alel *LDH-C**90, dok je kod dunavske prisutniji *LDH-C**100. Ukoliko nije bilo hibridizacije ova tri uzorka trebalo bi da budu homozigotni za kraći alel *LDH-C**90 ili heterozigoti. Ipak, nije bilo

homozigota za kraći alel, prisustvo heterozigota utvrđeno je na jednom uzorku (IG42), dok su ostali bili homozigotni za duži alel *LDH-C*100* (Slika 19).



Slika 19. Rezultat restrikcione analize (Foto: Tošić)

3.3. Analiza mikrosatelitskih lokusa

Nekonzistentni aleli koji su uočeni u populacijama korišćenjem programa Microchecker v. 2.2.3 (van Oosterhout i sar. 2004) su prepravljani, a nultih alela nije bilo ni u jednoj populaciji. Uočeno je ukupno 12 privatnih alela, od kojih su na lokusima Ssa410UOS, SsoSL438 i OMM1064 uočena po tri privatna alela, na lokusu SSsp2216 dva i jedan na lokusu SsaD190. Najveća očekivana heterozigotnost (H_{exp}) je u Vratni i iznosi 0.51, dok je najveća detektovana heterozigotnost (H_{obs}) primećena u Zlatici - 0.58 (Tabela 7). Najniža očekivana heterozigotnost je primećena u Rečkoj (0.25), dok je detektovana heterozigotnost bila nešto veća (0.28), ali i dalje najniža vrednost u odnosu na ostale. Generalno, u svim analiziranim rekama detektovane heterozigotnosti uvek su malo veće od očekivanih, osim u slučaju Zamne, gde je detektovana heterozigotnost (0.32) malo manja od očekivane (0.39). Najveći prosečan broj alela po lokusu prisutan je u Zlatici (4.75), a najmanji u Rečkoj (1.75).

Tabela 7. Prosečna heterozigotnost analiziranih mikrosatelitskih lokusa u ispitivanim populacijama, (KŽ-Kožica MB-Mala Boljetinska ZL-Zlatica RE-Rečka VR-Vratna ZM-Zamna RA-Radovanska MR-Mirovštica LV- Lukovsko vrelo). H_{exp} - očekivana heterozigotnost, $H_{n.b.}$ - objektivna heterozigotnost, H_{obs} - detektovana heterozigotnost, SD - standardna devijacija, P - verovatnoća $\bar{A}n$ - prosečan broj alela po lokusima.

	MB	ZL	KŽ	VR	ZM	RE	RA	LV	MR
$H_{exp.}$	0.41	0.48	0.43	0.51	0.39	0.25	0.29	0.27	0.31
SD	0.31	0.31	0.28	0.28	0.30	0.26	0.35	0.32	0.35
$H_{n.b.}$	0.45	0.5	0.44	0.54	0.42	0.26	0.30	0.31	0.32
SD	0.34	0.32	0.28	0.29	0.33	0.27	0.36	0.37	0.35
$H_{obs.}$	0.48	0.58	0.52	0.55	0.32	0.28	0.29	0.34	0.33
SD	0.39	0.40	0.38	0.31	0.34	0.33	0.34	0.42	0.39
P(0.95)	0.75	0.75	0.75	0.87	0.75	0.5	0.5	0.5	0.62
P(0.99)	0.75	0.87	0.75	0.87	0.75	0.62	0.62	0.5	0.87
$\bar{A}n$	2.87	4.62	3	4.25	2.75	1.75	3.37	2.25	4.12

Najveći uočeni broj alela je 19 i prisutan je na lokusu Ssa410UOS. Na ovom lokusu izračunato je i najveće alelsko bogatstvo (5.964) kao i diverzitet gena i to u rekama Lukovsko vrelo, Vratna i Mirovštica, 0.867, 0.875, 0.866, repektivno, dok je u populacijama gde je prisutan samo jedan alel (na lokusima Str73INRA, SsaD190, Ssa85, SsoSL438) nije bilo genskog diverziteta (Tabela 8).

Tabela 8. Alelske učestalosti po lokusima za svaku populaciju (KŽ-Kožica MB-Mala Boljetinska ZL-Zlatica RE-Rečka VR-Vratna ZM-Zamna RA-Radovanska MR-Mirovštica LV- Lukovsko vrelo). H_{exp} - očekivana heterozigotnost, $H_{n.b.}$ - objektivna heterozigotnost, H_{obs} - detektovana heterozigotnost, SD - standardna devijacija, P - verovatnoća F_{IS} - indeks fiksacije, A - broj alela po lokusu, Ar - alelsko bogatstvo. Znakom (*) obeleženi su privatni aleli.

Lokus	Populacija								
	MB	ZL	KŽ	VR	ZM	RE	RA	LV	MR
Str73INRA									
(N)	6	12	18	10	7	11	26	4	30
138	1	1	1	1	1	1	0.961	1	0.95
144	0	0	0	0	0	0	0.038	0	0.05
H_{exp}	0	0	0	0	0	0	0.074	0	0.095
$H_{n.b.}$	0	0	0	0	0	0	0.075	0	0.097
H_{obs}	0	0	0	0	0	0	0.077	0	0.033
A	1	1	1	1	1	1	2	1	2
Ar	1	1	1	1	1	1	1.287	1	1.354
$F_{IS}(W\&C)$	-	-	-	-	-	-	-0.02	-	0.659
Ssa85									
111	0.583	0.583	0.722	0.85	1	0	1	1	0.967
113	0.417	0.417	0.278	0.15	0	0	0	0	0.033
117	0	0	0	0	0	1	0	0	0
H_{exp}	0.486	0.486	0.401	0.255	0	0	0	0	0.064
$H_{n.b.}$	0.530	0.507	0.413	0.268	0	0	0	0	0.065
H_{obs}	0.833	0.667	0.333	0.3	0	0	0	0	0.067
A	2	2	2	2	1	1	1	1	2
Ar	2	1.998	1.948	1.807	1	1	1	1	1.251
$F_{IS}(W\&C)$	-0.667	-0.133	0.197	-0.125	-	-	-	-	-0.018
SsaD71									
191	0	0.083	0	0.1	0.071	0	0.923	0.875	0.917
195	0.167	0.25	0.222	0.5	0.5	0	0	0.125	0.05
199	0.167	0.042	0.028	0	0.143	0	0	0	0
207	0	0.042	0	0	0.286	0	0	0	0
211	0	0.042	0	0.1	0	0	0	0	0
215	0.5	0.458	0.5	0	0	0.273	0.077	0	0.033
219	0.167	0.042	0	0.3	0	0.318	0	0	0
223	0	0.042	0.25	0	0	0	0	0	0
231	0	0	0	0	0	0.409	0	0	0
H_{exp}	0.667	0.712	0.637	0.64	0.643	0.657	0.142	0.219	0.156
$H_{n.b.}$	0.727	0.743	0.656	0.674	0.692	0.688	0.145	0.25	0.159
H_{obs}	0.833	0.917	0.778	0.6	0.571	0.727	0.154	0.25	0.167
A	4	8	4	4	4	3	2	2	3
Ar	3.727	4.171	3.045	3.281	3.392	2.936	1.499	2	1.605
$F_{IS}(W\&C)$	-0.163	-0.247	-0.193	0.115	0.186	-0.06	-0.064	0	-0.051
Ssa410UOS									
192	0.25	0.083	0	0	0	0	0	0	0
196	0.167	0.083	0	0	0	0	0	0	0
198	0	0	0	0	0	0.955	0	0	0

202*	0	0	0	0	0	0.045	0	0	0
210*	0	0	0	0.05	0	0	0	0	0
214	0.083	0.292	0.194	0.300	0	0	0	0	0
218	0	0.042	0	0	0	0	0.115	0.125	0.200
222	0	0	0	0.100	0	0	0	0	0.017
226	0.167	0.042	0.361	0.150	0.071	0	0	0	0
230	0	0	0	0	0	0	0.019	0.125	0.050
234*	0	0	0	0	0	0	0	0	0.017
238	0	0	0	0.150	0	0	0.019	0	0.033
242	0	0.125	0.444	0	0.214	0	0	0	0
246	0.333	0.208	0	0.100	0.714	0	0.077	0.25	0.100
250	0	0.125	0	0.100	0	0	0.019	0.125	0.033
254	0	0	0	0	0	0	0.231	0	0.150
258	0	0	0	0	0	0	0.019	0	0.050
262	0	0	0	0.050	0	0	0.462	0.375	0.233
266	0	0	0	0	0	0	0.039	0	0.117
H _{exp.}	0.764	0.823	0.634	0.830	0.439	0.087	0.712	0.75	0.852
H _{n.b.}	0.833	0.859	0.652	0.874	0.473	0.091	0.726	0.857	0.866
H _{obs.}	1	1	0.722	1	0.143	0.091	0.692	0.75	0.9
A	5	8	3	8	3	2	9	5	11
Ar	4.465	5.108	2.838	5.348	2.516	1.364	3.947	5	5.225
F _{IS} (W&C)	-0.224	-0.173	-0.111	-0.154	0.714	0	0.047	0.143	-0.04
SSsp2216									
135*	0	0	0	0	0	0	0	0	0.017
139	0	0	0	0	0.071	0	0.019	0	0.083
145	0	0	0	0.1	0	0	0	0	0
153*	0	0.042	0	0	0	0	0	0	0
169	0	0.208	0	0	0.214	0	0	0	0
173	0	0	0	0.05	0.214	0	0.346	0.125	0.117
177	0.083	0	0	0	0	0	0.192	0.250	0.183
181	0	0.083	0.194	0.1	0	0	0.442	0.625	0.600
185	0	0	0	0.2	0	0	0	0	0
189	0	0	0	0	0	0.409	0	0	0
193	0	0	0.305	0.25	0	0.591	0	0	0
197	0.583	0	0	0	0.429	0	0	0	0
201	0.167	0.542	0.5	0.3	0.071	0	0	0	0
209	0.167	0	0	0	0	0	0	0	0
229	0	0.125	0	0	0	0	0	0	0
H _{exp.}	0.597	0.639	0.618	0.785	0.714	0.484	0.647	0.531	0.586
H _{n.b.}	0.652	0.667	0.636	0.826	0.769	0.507	0.660	0.607	0.596
H _{obs.}	0.500	0.917	0.888	0.8	0.857	0.818	0.692	0.750	0.600
A	4	6	3	6	5	2	4	3	5
Ar	3.485	3.784	2.821	4.528	4.033	1.996	2.967	3	3.135
F _{IS} (W&C)	0.25	-0.399	-0.413	0.034	-0.125	-0.667	-0.05	-0.286	-0.008
SsaD190									
115*	0	0	0	0.050	0	0	0	0	0
119	1	0.958	1	0.700	0.643	1	0	0	0
123	0	0	0	0.150	0	0	1	1	1
127	0	0.042	0	0.100	0.357	0	0	0	0
H _{exp.}	0	0.080	0	0.475	0.459	0	0	0	0
H _{n.b.}	0	0.083	0	0.500	0.495	0	0	0	0
H _{obs.}	0	0.083	0	0.600	0.143	0	0	0	0
A	1	2	1	4	2	1	1	1	1
Ar	1	1.333	1	2.860	1.997	1	1	1	1

F_{IS} (W&C)	-	0	-	-0.213	0.727	-	-	-	-
OMM1064									
171*	0	0	0	0	0	0	0	0	0.017
191	0	0.417	0.055	0.500	0.357	0	0	0.125	0
195	0	0	0	0	0	0	0.365	0.250	0.433
199	0	0	0	0	0	0	0.019	0	0.100
203	0	0.083	0	0.150	0.143	0.227	0.154	0.125	0.133
207	0.333	0.125	0.472	0.250	0.357	0.773	0.154	0	0
211	0.083	0.083	0	0	0	0	0.192	0.500	0.200
215	0	0	0	0.050	0.143	0	0.039	0	0.083
223*	0	0	0	0.050	0	0	0	0	0
231*	0	0.042	0	0	0	0	0	0	0
247	0	0	0.055	0	0	0	0	0	0
251	0	0	0.027	0	0	0	0.077	0	0
255	0.083	0	0.388	0	0	0	0	0	0
259	0.500	0.042	0	0	0	0	0	0	0.033
263	0	0.208	0	0	0	0	0	0	0
H_{exp}	0.625	0.750	0.618	0.660	0.704	0.351	0.774	0.656	0.736
$H_{n.b.}$	0.682	0.783	0.636	0.695	0.758	0.368	0.790	0.750	0.749
H_{obs}	0.5	0.833	0.944	0.700	0.714	0.273	0.731	1	0.867
A	4	7	5	5	4	2	7	4	7
Ar	3.331	4.414	3.009	3.556	3.664	1.924	4.293	4.000	4.053
F_{IS} (W&C)	0.286	-0.068	-0.505	-0.008	0.063	0.268	0.076	-0.412	-0.161
SsoSL438									
93*	0	0	0.027	0	0	0	0	0	0
97	0.917	0.792	0.666	0.200	0.071	0.727	0	0	0.017
99	0.083	0.167	0.027	0	0	0	0	0	0
101	0	0.042	0.166	0	0	0	0	0	0
103*	0	0	0	0.050	0	0	0	0	0
107	0	0	0.111	0.700	0.929	0.273	1	1	0.983
109*	0	0	0	0.050	0	0	0	0	0
H_{exp}	0.153	0.344	0.513	0.465	0.133	0.397	0	0	0.033
$H_{n.b.}$	0.167	0.359	0.528	0.490	0.143	0.416	0	0	0.033
H_{obs}	0.167	0.333	0.5	0.4	0.143	0.364	0	0	0.033
A	2	3	5	4	2	2	1	1	2
Ar	1.667	2.162	2.903	2.698	1.571	1.960	1	1	1.133
F_{IS} (W&C)	0	0.074	0.056	0.191	0	0.13	-	-	0

Testiranje Hardy-Vajnborgove ravnoteže (HWE) populacija potočnih pastrmki pokazalo je da nema odstupanja od HWE i da su populacije u ravnoteži (Tabela 9). Prosečne vrednosti za svaku populaciju manje su od dobijene nominalne vrednosti od 0.00069.

Tabela 9. Testiranje HWE u populacijama. Proporcije randomizacije koje su pokazale manje F_{IS} vrednosti od uočenih na analiziranim mikrosatelitskim lokusima. KŽ-Kožica MB-Mala Boljetinska ZL-Zlatica RE-Rečka VR-Vratna ZM-Zamna RA-Radovanska MR-Mirovštica LV- Lukovsko vrelo.

	MB	ZL	KŽ	VR	ZM	RE	RA	LV	MR
Str73INRA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.981	NA	1
Ssa410Uos	0.328	0.142	0.360	0.229	1	1	0.767	0.917	0.406
SsaD190	NA	1	NA	0.346	1	NA	NA	NA	NA
SsaD71	0.486	0.095	0.174	0.833	0.894	0.532	0.882	1	0.834
Ssa85	0.244	0.551	0.927	0.844	NA	NA	NA	NA	0.984
SSsp2216	0.948	0.009	0.011	0.761	0.493	0.057	0.450	0.572	0.587
SsoSL438	1	0.745	0.778	0.900	1	0.892	NA	NA	1
OMM1064	0.953	0.491	0.002	0.658	0.785	0.961	0.855	0.230	0.060
Ukupno	0.342	0.008	0.005	0.480	0.990	0.274	0.694	0.324	0.231

Analiza molekularne varijanse (AMOVA), prema Weir i Cockerham, pokazala je da u ukupnoj genetičkoj varijabilnosti najveći procenat nose pojedinačne individue (62.14%), dok varijabilnost između populacija iznosi 41.48% (Tabela 10). Negativna vrednost proporcije intrapopulacione genetičke varijabilnosti ukazuje na manje razlike između jedinki u okviru subpopulacija u odnosu na totalnu populaciju. Totalnu populaciju predstavljaju sve jedinke u rekama analiziranog regiona, dok su jedinke pojedinačnih tokova posmatrane kao subpopulacije.

Tabela 10. Analiza molekularne varijanse (AMOVA) preko matrica distanci. Stepena slobode (d.f.), suma kvadrata (SS) i proporcija varijanse (%Var), verovatnoća (P).

Izvor varijabilnosti	d.f.	SS	Varijabilnost komponenti	% Var	Indeksi fiksacije	P
Između populacija	8	233.151	1.05772	41.48	F_{ST} 0.41478	
Između jedinki u okviru populacija	115	161.003	-0.09233	-3.62	F_{IS} -0.06187	<0.01
U okviru jedinki	124	196.500	1.58468	62.14	F_{IT} 0.37857	<0.01
Ukupno	247	590.653	2.55007			

Nei distance izračunate su sa 1000 permutacija za jedinke po svakom paru populacija (Tabela 11). Najveće vrednosti Nei distanci uočene su između Rečke, sa jedne strane, i Lukovskog vrela, Mirovštice i Radovanske reke sa druge strane: 1.517, 1.514, 1.397, respektivno, dok su najmanje vrednosti između Radovanske i Mirovštice, 0.022; Lukovskog vrela i Mirovštice, 0.028; kao i Radovanske i Lukovskog vrela, 0,033. Slične vrednosti dobijene su za parove subpopulacija (F_{ST}) (Tabela 12), dok je procenjeni protok gena prema formuli $Nm = (1 - F_{ST}) / 4 * F_{ST}$ najveći između populacija sa najmanjim distancama i obrnuto.

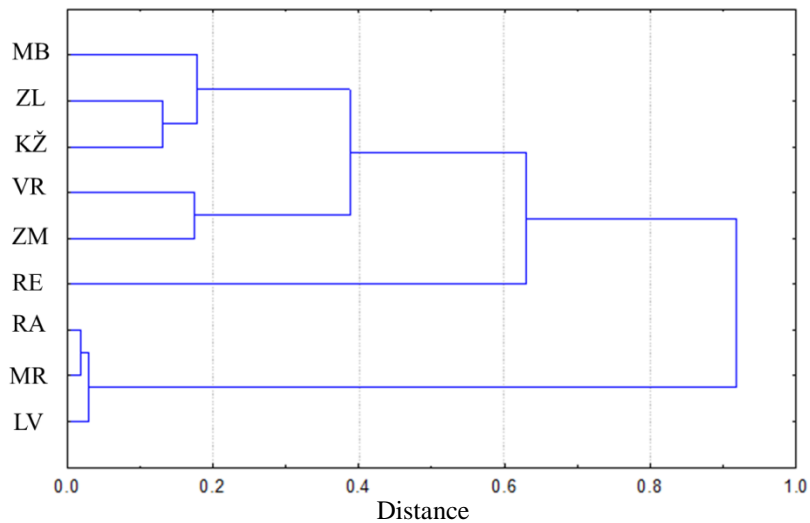
Tabela 11. Stvarne vrednosti Nei (1972) distanci. KŽ-Kožica MB-Mala Boljetinska ZL-Zlatica RE-Rečka VR-Vratna ZM-Zamna RA-Radovanska MR-Mirovštica LV- Lukovsko vrelo.

Nei distance	MB	ZL	KŽ	VR	ZM	RE	RA	LV
MB	0.102							
ZL	0.159	0.1						
KŽ	0.358	0.21	0.237					
VR	0.404	0.404	0.43	0.123				
ZM	0.496	0.558	0.477	0.612	0.847			
RE	1.078	0.987	0.921	0.453	0.479	1.409		
RA	1.038	0.898	0.917	0.399	0.426	1.482	0.003	
LV	1.088	0.976	0.943	0.457	0.5	1.498	0.011	-0.006

Tabela 12. Vrednosti genetičke udaljenosti za parove subpopulacija (F_{ST}) dijagonalno levo i procenjene vrednosti protoka gena (Nm) dijagonalno desno. Najtamnije - vrednosti veće od 0.5, svetlije - vrednosti od 0.3-0.5, najsvetlije - vrednosti od 0 do 0.3.

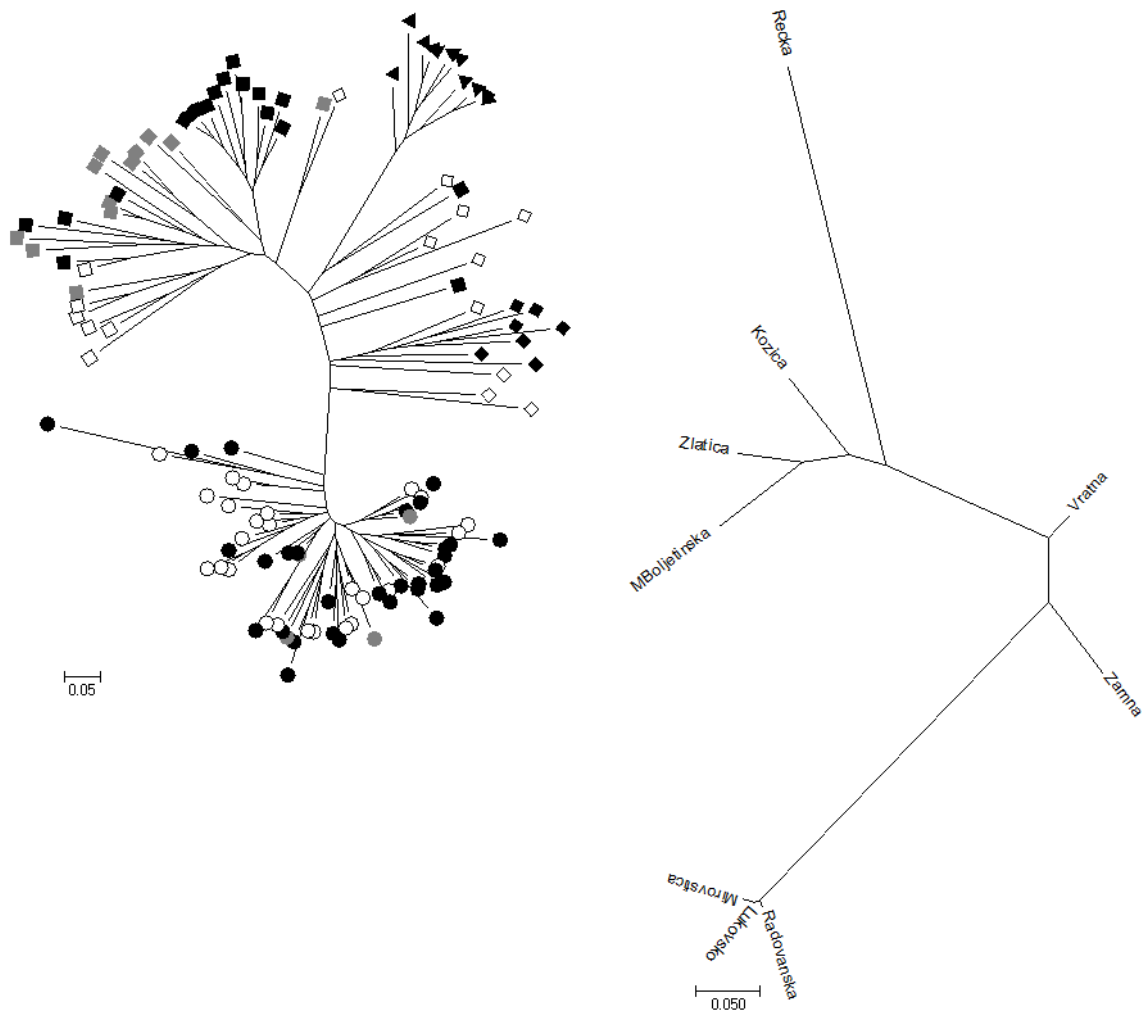
F_{ST}/Nm	MB	ZL	KŽ	VR	ZM	RE	RA	LV	MR
MB		2.15	1.28	0.81	0.59	0.31	0.19	0.24	0.21
ZL	0.09		2.09	1.34	0.65	0.35	0.24	0.32	0.25
KŽ	0.16	0.10		1.03	0.54	0.37	0.23	0.28	0.24
VR	0.23	0.15	0.19		2.08	0.34	0.42	0.64	0.43
ZM	0.30	0.28	0.31	0.11		0.21	0.33	0.45	0.34
RE	0.45	0.41	0.40	0.42	0.55		0.13	0.12	0.14
RA	0.56	0.52	0.52	0.38	0.44	0.65		32.61	10.24
LV	0.50	0.43	0.47	0.28	0.37	0.67	0.01		99
MR	0.55	0.50	0.51	0.37	0.43	0.64	0.02	~0.00	

Distance (Nei 1972) dobijene u programu GENETIX korišćene su za CLUSTER analizu metodom UPGMA (eng. *Unweighted pair-group average*), korišćenjem matrice različitosti (eng. *dissimilarities*). Od devet populacija, tri iz sliva Crnog Timoka su grupisane zajedno i odvojene od preostalih šest populacija (Slika 20). U okviru ovih šest populacija, Kožica i Zlatica predstavljaju sestrinske grupe, kao i Vratna i Zamna. Mala Boljetinska jednako je udaljena i od Kožice i od Zlatice, dok je Rečka zasebna kako u odnosu na njih, tako i u odnosu na populacije sliva Crnog Timoka.



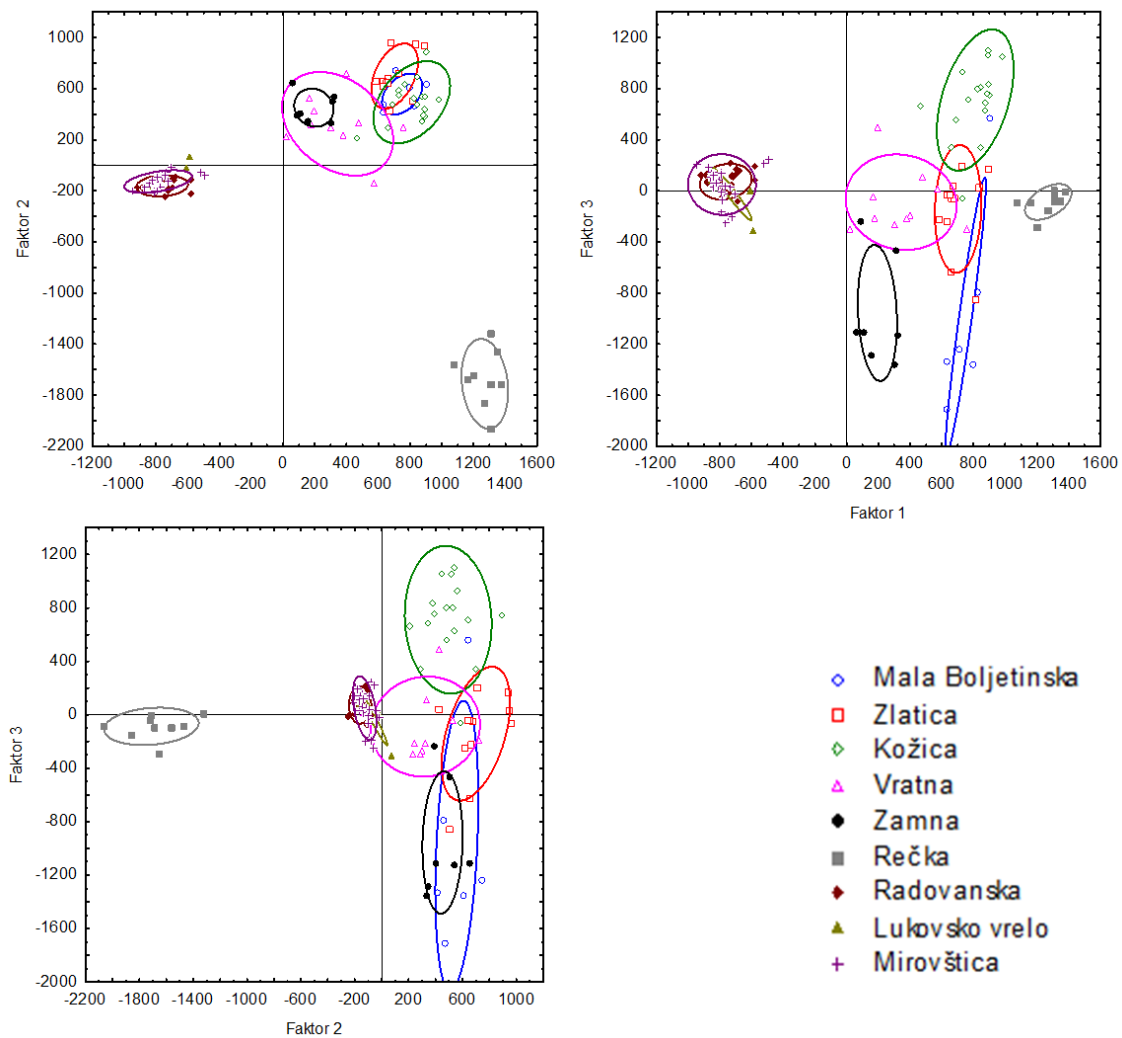
Slika 20. Klaster analiza matrica distanci devet ispitivanih populacija prema Nei distancama. KŽ-Kožica MB-Mala Boljetinska ZL-Zlatica RE-Rečka VR-Vratna ZM-Zamna RA-Radovanska MR-Mirovštica LV- Lukovsko vrelo.

Slična situacija utvrđena je korišćenjem D_{AS} distanci u programu POPULATIONS. Grupisanje populacija jasno izdvaja đerdapske populacije od timočkih, ali D_{AS} distance grupišu Lukovsko vrelo najbliže Mirovštici, za razliku od Nei distanci gde su Mirovštica i Radovanska reka sestrinske populacije (Slika 21). Takođe, prema D_{AS} distancama, Mala Boljetinska i Zlatica su sestrinske grupe, dok su prema Nei distancama to Zlatica i Kožica.



Slika 21. Grupisanje individua (levo) i populacija (desno) preko D_{AS} distanci.

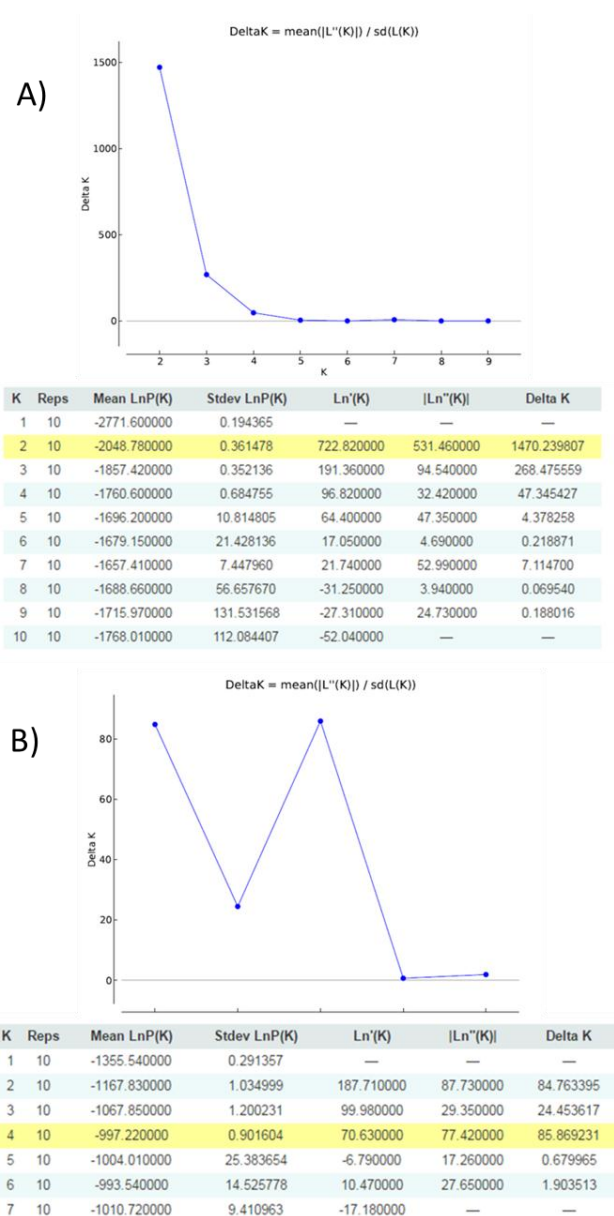
Prema korespondentnoj faktorskoj analizi po prvom faktoru, koji nosi 13.57% varijabilnosti, jasno su se odvojile grupe populacija iz sliva Crnog Timoka (Radovanska reka, Lukovsko vrelo i Mirovštica) od đerdapskih (Mala Boljetinska, Zlatica, Kožica, Vratna, Zamna), dok je Rečka blago izdvojena u treću grupu. Drugi faktor (8.63% varijabilnosti) jasno odvaja Rečku u zasebnu grupu od ostalih populacija. Treći faktor poneo je najmanji procenat varijabilnosti (5.19%), nema jasnog izdvajanja populacija, do preklapanja ne dolazi jedino između Kožice i Zamne (Slika 22).



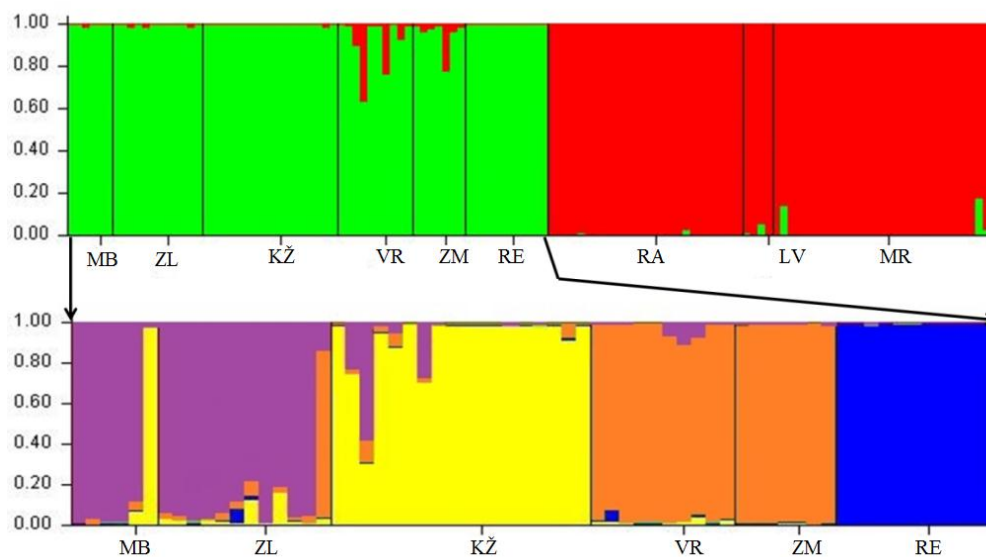
Slika 22. Korespondentna faktorska analiza devet ispitivanih populacija prema faktorima 1/2, 2/3 i 1/3.

Korišćenjem programa STRUCTURE totalna populacija podeljena je u nekoliko grupa. Pri prvom struktuiranju izdvojene su dve grupe: đerdapska i timočka. Preko vrednosti ΔK pri primeni metoda Evanno i sar. (2005) utvrđeno je da ΔK dostiže maksimalnu vrednost kada je $K = 2$ (Slika 23). Dalje stuktuiranje timočke populacije nije otkrilo nove klastere, za razliku od đerdapske grupe. U okviru četiri grupe, prvoj grupi pripadaju populacije iz Male Boljetinske reke i Zlatice, dok se Kožica odvaja kao posebna grupa. Zamna i Vratna se takođe grupišu zajedno, a Rečka se odvaja kao posebna u skladu

sa prethodnim analizama. Dalje struktuiranje nije pokazalo postojanje novih klastera i hibrida (Slika 24).



Slika 23. Vrednost ΔK za totalnu populaciju (A) i subpopulacije sliva đerdapske akumulacije (B).



Slika 24. Prikaz struktuiranosti totalne populacije (A) i populacije iz sliva đerdapske akumulacije (B), (KŽ-Kožica MB-Mala Boljetinska ZL-Zlatica RE-Rečka VR-Vratna ZM-Zamna RA-Radovanska MR-Mirovštica LV- Lukovsko vrelo).

Za svaku populaciju pojedinačno urađena je procena postojanja genetičkih uskih grla, osim za Lukovsko vrelo čiji je uzorak bio previše mali. Takođe je procena urađena i za tri grupe populacija koje su se izdvojile korespondentnom faktorskom analizom.

Prema TPM i SMM modelu, ni u jednoj populaciji nije detektovan efekat uskog grla. Ovaj efekat detektovan je prema IAM modelu u reci Kožici ($P < 0.05$). Test promene modaliteta (eng. *mode shift test*) otkrio je odstupanja od L-oblika distribucije alelskih učestalosti u rekama: Mala Boljetinska, Vratna, Rečka, Mirovštica i Lukovsko vrelo. Značajni deficit heterozigotnosti prema SMM i TPM modelu otkriven je u reci Mirovštici, i u Lukovskom vrelu prema SMM modelu (Tabela 13) što ukazuje na skorašnju ekspanziju populacija u ovim rekama.

Tabela 13. Značajnosti Wilcoxonovog testa u cilju utvrđivanja genetičkog uskog grla u pojedinačnim populacijama prema tri modela mutacija. Boldovane su vrednosti za značajnošću manjom od 0.05; D - deficit heterozigotnosti E - višak heterozigotnosti.

Populacija	IAM	TPM	SMM
Mala Boljetinska	0.219 E	0.578 E	0.578 E
Zlatica	0.656 E	0.961 E	0.973 E
Kožica	0.023 E	0.344 E	0.422 E
Vratna	0.234 E	0.812 E	0.945 E
Zamna	0.078 E	0.422 E	0.719 E
Rečka	0.078 E	0.313 E	0.313 E
Radovanska	0.406 E	0.953 E	0.953 E
Lukovsko vrelo	0.156 D	0.031 D	0.031 D
Mirovštica	0.234 D	0.007 D	0.004 D

U đerdapskoj metapopulaciji, na pet lokusa očekivana heterozigotnost (H_e) bila je manja od ravnotežne heterozigotnosti (H_{eq}), a samo na jednom sa značajnošću većom od 99%. Slična situacija je i u timočkoj metapopulaciji, gde takođe postoji pet lokusa sa očekivanom heterozigotnošću manjom od ravnotežne, a na dva od njih je verovatnoća manja od 0.05. S druge strane, u Rečkoj reci, koja je izdvojena u posebnu grupu, uočeno je pet lokusa sa značajnošću većom od 95%, a na četiri od njih je očekivana heterozigotnost manja od ravnotežne.

Model postupnih mutacija (*stepwise mutation model*; SMM) pokazao je značajnost u deficitu heterozigotnosti u populacijama Crnog Timoka i Đerdapa, dok u Rečkoj nije bilo značajnosti (Tabela 14).

Tabela 14. Tabela značajnosti Wilcoxonovog testa u tri metapopulacije prema dva modela mutacija, D - deficit heterozigotnosti E - višak heterozigotnosti.

Verovatnoća	Populacije		
	Đerdap	Crni Timok	Rečka
IAM			
D	0.945	0.187	0.953
E	0.148	0.851	0.078
SMM			
D	0.012	0.004	0.890
E	0.992	1	0.313
TPM			
D	0.019	0.004	0.890
E	0.988	1	0.313

4. Diskusija

Novootkriveni haplotip Da23c najdominantniji je na području Đerdapa i Crnog Timoka (Slika 17) i za sada je detektovan samo ovde. Ove činjenice ukazuju da je on nedvosmisleno autohton za analizirano područje. Za potočne pastrmke iz ovog regiona ranije su prijavljeni haplotipovi Da2 i Da23b (Marić i sar. 2006), pa je zbog toga, a i zbog male genetičke razlike između ovih haplotipova novi haplotip dobio naziv Da23c. Naknadno je ustanovljena velika sličnost u analiziranom delu CR (560 bp) i sa haplotipom Da1 (Tabela 4). Haplotip Da23b, koji je ranije opisan na ovom području u rekama Rečka, Vratna i Radovanska (Marić i sar. 2006), nije detektovan u uzorku analiziranom u ovom redu, pa se postavlja pitanje njegove prisutnosti. Drugi haplotip, koji je prisutan u slivu Crnog Timoka, Da2, najverovatnije je introdukovan pre 2003. godine poribljavanjem ovih reka gajenim pastrmkama. Ovakav režim prekinut je odmah nakon otkrivanja tada opisanog Da23b haplotipa. Malo je verovatno da nijedan od 26 uzoraka iz sliva Crnog Timoka ili pritoka Dunava u širem području Đerdapa nije bio haplotipa Da23b, tako da postoji mogućnost da je ovaj haplotip ili greškom opisan umesto Da23c (Marić i sar. 2006) ili da je bio prisutan kod malog broja jedinki koje su najverovatnije alohtonog porekla s obzirom da je opisan i u rekama donje Austrije (Duftner i sar. 2003). Otkrivanje haplotipa koji je autohton samo za ovu oblast je veoma bitno i povlači sa sobom važna konzervaciona pitanja, kao i ona vezana za upravljanje ovim ribarskim područjima. Kada je 2003. prekinuto sa poribljavanjem ovih tokova, uvođenje ribolovnog režima „uhvati i pusti“ nije uspešno sprovedeno, pa je došlo do smanjenja ukupne biomase pastrmki sa $27.261 \text{ kg km}^{-1}$ na 9.270 kg km^{-1} , kao i godišnje prirodne produkcije sa 12000 kg km^{-1} na 2.053 kg km^{-1} u 2003. i 2008. godini, respektivno (Simonović i sar. 2003, 2011). Najbolje rešenje bilo bi započinjanje veštačkog mresta i uzgajanje autohtonih pastrmki haplotipa Da23c kako bi se održao autohtoni fond. Ove aktivnosti će omogućiti bolji uvid u stanje genofonda potočnih pastrmki, naročito ukoliko se ove jedinke koriste kao matično jato za celo područje. Na području Crnog Timoka, koliko je poznato, ne postoje prepreke koje bi mogle sprečiti migraciju pastrmki između pritoka (Mirovštica, Lukovsko vrelo, Radovanska i Zlotska reka).

Prisustvo haplotipa Da1 (Da-s1) otkriveno je u Rečkoj i Vratni zajedno sa tada opisanim Da23b haplotipom (Marić i sar. 2006). U ovom radu potvrđeno je prisustvo Da1 samo u Rečkoj i to iznad vodopada koji najverovatnije predstavlja nepremostivu prepreku za jedinke koje žive nizvodno. Postoji mogućnost da u ovom delu postoje jedinke koje imaju Da23c haplotip, ali ne mogu da migriraju uzvodno zbog prepreke, pa zato u delu iznad vodopada postoji naselje sastavljeno isključivo od pastrmki Da1 haplotipa.

Kako nema čistih populacija potočne pastrmke haplotipa Da23c u timočkom delu, njihov nalaz u pritokama u Đerdapu je utoliko značajniji. Poznato je da je Đerdapska klisura predstavljala refugijum tokom pleistocenskih glacijacija za drevne biljne i životinjske vrste, zbog čega je Nacionalni park Đerdap bitna konzervaciona oblast za autohtonu floru i faunu. U potocima Kožica, Zlatica i Mala Boljetinska, i Zamna, prisutan je isključivo autohtoni haplotip Da23c. Otkrivanje populacija potočne pastrmke autohtonog haplotipa u ovim potocima značajno doprinosi poznavanju distribucije i populacione strukture ovih jedinstvenih i novootkrivenih linija potočnih pastrmki koje su inicijalno otkrivene na geografski vrlo bliskom području sliva Crnog Timoka (Tošić i sar. 2014). Prisustvo haplotipa atlantske linije otkriveno je u Brnjičkoj reci, Dobrinjskoj, Porečkoj i Vratni. To su uglavnom bili pojedinačni ulovi (po 1 jedinka), osim u reci Vratni, gde je bilo više uzoraka (tri) koji su nosili ovaj haplotip. Kod jedne jedinke iz Porečke reke ceo CR je sekvenciran (1080 bp), dok je kod ostalih jedinki sekvenciran deo kontrolne regije do bloka timinskog homopolimera koji počinje na 561 bp. Kod ove jedinke utvrđeno je prisustvo haplotipa H3 (At1c kod Duftner i sar. 2003), koji je poznat kao jedan od četiri haplotipa atlanske linije koji se gaji u austrijskim ribnjacima (Duftner i sar. 2003). Iako postoji mišljenje o mogućnosti prirodne kolonizacije gornjeg toka Dunava pastrmkom atlanske linije posle ledenog doba (Balon, 1968; Osinov i Bernatchez, 1996; Weiss i sar. 2001), u srednjem delu toka Dunava to je malo verovatno (Weiss i sar. 2001; Lerceteau-Kohler i sar. 2013). Ne postoje dokazi da atlantska linija potočne pastrmke prirodno naseljava oblasti južno i jugoistočno od Alpa, dok su jako česte i dominantne u pritokama gornjeg toka Dunava u Bavarskoj i u Austriji. Jedno od objašnjenja za prisustvo AT haplotipova moglo bi biti nekontrolisano poribljavanje alohtonim pastrmkama atlanske linije iz

uzgajališta. Ovakvi primeri poznati su kako na Balkanskom poluostrvu (Marić i sar. 2006; Jadan i sar. 2010; Simonović i sar. 2015) tako i u Evropi (Largiader i Scholl, 1996; Osinov i Bernatchez, 1996; Hansen i sar. 2000; Weiss i sar. 2001, Duftner i sar. 2003).

Postojanje haplotipa H3 koji je otkriven kod jedne jedinke iz Porečke reke u ovom delu Dunava poznato je još od 2010. Dve jedinke koje su nosile ovaj haplotip ulovljene su blizu Velikog Gradišta (rečni kilometar 1059) u samom Dunavu (Marić i sar. 2012). Pošto potočna pastrmka uglavnom naseljava gornje tokove reka, njeno nalaženje u glavnom toku vrlo je neobičano, s obzirom da osobine vode ne odgovaraju njenim uslovima za život. Ipak, postoji mogućnost da su ove jedinke opstale i potencijalno aklimatizovale zahvaljujući postojanju podvodnih kraških izvora koji donose hladnu vodu bogatu kiseonikom. Ukoliko su neke populacije mogle da prežive u samom toku Dunava, postavlja se pitanje da li su onda zalazile u analizirane pritoke radi mresta. Ovo pitanje dodatno je naglašeno jer su jedinke nosioci atlanskih haplotipova nalažene najčešće u kasno leto ili ranu jesen. Još uvek se ne zna pouzdano da li su se ove jedinke adaptirale na uslove života u Dunavu oko podvodnih izvora, tj. da li su uspostavile migratorno ponašanje. Ukoliko jesu, postoji bojazan da bi moglo doći do ukrštanja sa lokalnim đerdapskim populacijama i ugrožavanja ionako retkih autohtonih genofondova potočnih pastrmki. Poznato je da se ovakav scenario već odigrao u jednom zaštićenom području, na reci Gradac (Simonović i sar. 2014). Konzervacija potočne autohtone pastrmke u zaštićenim prirodnim dobrima od velike je važnosti kako zbog ekoloških, naučnih, kulturnih, ali i moralnih razloga (Bosse, 2004).

Potočna pastrmka atlanskog haplotipa u reci Vratni verovatno nije iz istog izvora kao one nađene u rekama Brnjica, Dobra i Porečka reka. Ovde je najverovatnije njihovo prisustvo posledica poribljavanja, jer je malo verovatno da bi atlanske pastrmke iz Dunava mogle naseliti Vratnu, a preskočiti Rečku reku koja je bliža Đerdapskoj klisuri od Vratne (Slika 12). Takođe, jedinke atlanskog haplotipa nisu stalno prisutne u ostalim pritokama, osim u reci Vratni, gde živi zajedno sa potočnom pastrmkom haplotipa Da23c. U ostalim pritokama to su bile pojedinačne jedinke isključivo AT haplotipa ulovljene u ranu jesen, za razliku od jedinki iz Vratne koje su stalno prisutne, a ulovljene su tokom ranog leta (maj-

jun), zajedno sa autohtonim jedinkama Da23c haplotipa. Nema direktnih podataka o tome da su poribljavanja Vratne potočnom pastrmkom zaista vršena, ali se u starim (pre 2000. godine) programima upravljanja - Ribarskim osnovama za ovo područje (Janković, pers. comm.) preporučivalo poribljavanje Zamne i Vratne potočnim pastrmkama. Ako su Vratna i Zamna i bile poribljavane pastrmkom, odsustvo potočne pastrmke AT haplotipa iz Zamne može se objasniti i njenim povlačenjem nizvodno u vreme potpunog presušivanja kakvom smo bili svedoci 2013. godine (Slika 10) i nemogućnošću povratka u uzvodne delove Zamne zbog postojanja betonskih kaskada u dolinskom delu ove reke bliže ušću u Dunav, neprolaznih uzvodno. Takav karakter Zamne verovatno je uticao i na nemogućnost sticanja polne zrelosti, pa time i hibridizacije sa autohtonim potočnim pastrmkama haplotipa Da23c i introgresijom u njihov genofond. Neobično je što su jedinke alohtonog haplotipa nalažene s jeseni samo u rekama koje ne naseljava autohtona potočna pastrmka, kao što su Brnjica, Dobra i Porečka, što bi moglo biti značajno za prirodnu introdukciju atlanskih potočnih pastrmki u ove reke, što bi trebalo detaljnije istražiti.

Sve analizirane jedinke iz Rečke reke nosile su Da1 haplotip CR mtDNK. Ovaj haplotip se smatra autohtonim za područje zapadnog Balkana (Marić i sar. 2006). Iako u ovom ispitivanju nije otkrivena nijedna jedinka Da23c haplotipa u Rečkoj reci, Marić i sar. (2006) objavili su prisustvo haplotipa Da23b u ovoj reci (verovatno greškom identifikovan, umesto Da23c, pogledati početni deo poglavlja Diskusija) kod jedne od tri jedinke, ali u drugoj, desnoj, istočnoj grani ove reke. Ukoliko je potočna pastrmka Da1 haplotipa introdukovana poribljavanjem, ona se mogla prenamnožiti i na taj način potisnuti autohtonu pastrmku Da23c haplotipa, a s obzirom da je uzorkovanje vršeno ovog puta samo na lokaciji iznad nepremostive prepreke, verovatno je Da23c kao autohtoni haplotip opstao samo u delu reke ispod vodopada, a potočne pastrmke haplotipa Da1 su mogle, sišavši s vodopada, da se mešaju sa pastrmkama haplotipa Da23c. S obzirom da se haplotipovi Da1 i Da23c u analiziranom delu CR mtDNK razlikuju samo na jednom nukleotidnom mestu, kao i da su sve dosadašnje analize odredile Da1 kao ancestralni haplotip u odnosu na Da23c, velika je verovatnoća da su oba autohtona za ovu regiju, a da je jedan nastao od drugog jednim mutacionim događajem upravo na ovom području. Prema mreži haplotipova, Da1 nalazi se u centru haplotipova, od koga su jednim mutacionim događajem

u analiziranom delu DNK odvojeni Da-s6, Da22, Da2 i Da23c. Ipak metode maksimalne parsimonije i maksimalne verodostojnosti ukazale su na sestrinske odnose haplotipova Da1 i Da23c, bez mogućnosti zaključivanja o predačkim odnosima između njih (Tošić i sar. 2016). Moguće je da potočna pastrmka Da1 haplotipa Rečke reke uzvodno od vodopada predstavlja stariju, autohtonu populaciju koja je ostala izolovana od potočnih pastrmki potencijalno izvedenog, mlađeg haplotipa Da23c. Ove nejasnoće u proceni pravog statusa autohtonosti pojačavaju potrebu za implementacijom konzervaciono-upravljačkih mera u ribarstvu naročito kad je analizirano područje u pitanju (Simonović i sar. 2014).

Od 11 polimorfniha mesta u totalnoj populaciji, dva (varijabilna mesta 145 i 234) su se razlikovala u F_{ST} vrednostima. Ovakve vrednosti indeksa fiksacije posledica su značajnih razlika između proporcija varijabilnosti unutar i između populacija (Tabela 5), pošto je većina tokova posedovala najčešće po jedan haplotip koji se razlikovao od populacije do populacije. Najveće razlike F_{ST} vrednosti između populacija, koje se zasnivaju na učestalosti haplotipova, ostvarene su između Rečke reke u odnosu na sve ostale tokove (Tabela 6), usled prisustva haplotipa Da1 koji nije pronađen ni u jednoj drugoj reci ovog područja. Navedene razlike između Rečke reke i ostalih tokova su značajne, osim kad su u pitanju Dobrinjska i Porečka reka zbog samo po jedne analizirane jedinice iz ovih reka. One ni sa ostalim rekama nisu pokazale značajne razlike upravo zbog veličine uzorka. Značajne razlike su prisutne između većine reka koje imaju prisutne različite haplotipove, kao kod Brnjice s jedne strane i Kožice, Male Boljetinske, Zlatice, Zamne, Rečke, Radovanske i Mirovštice sa druge strane. Ipak značajne razlike postoje i kad su prisutni isti haplotipovi u rekama kao u slučaju odnosa Radovanske reke i Kožice, na primer, jer u Radovanskoj reci prisutan je i haplotip Da2. Poznato je da rasprostranjenje ovog haplotipa odgovara južnom delu Nemačke i severnim delovima Austrije (Bernatchez, 2001; Weiss i sar, 2001), kao i to da je tokom širenja Austrougarskog carstva u 19. veku gajena riba sa tog područja introdukovana u razne delove Evrope (Kohout i sar. 2012). Autohtoni fond potočne pastrmke sliva Crnog Timoka narušen je u velikoj meri introdukcijom haplotipa Da2. Prisustvo haplotipa Da23c i u ovim rekama daje nadu za moguć oporavak uz veštački mrest i formiranje matičnih jata, obzirom na brojnost ovih populacija.

Pojedini tokovi, koji su analizirani na području severoistočne Srbije u kojima se nalazi isključivo pastrmka Da23c haplotipa (Zlatica i Mala Boljetinska), su vrlo mali sa velikim varijacijama u proticaju vode, a dešava se da tokom sušnih godina u potpunosti presuše. Čak i reka Zamna koja je jedna od većih na ovom području povremeno sasvim presuši, kao što je bio slučaj 2013. godine. Ove promene u protoku vode utiču i na veličinu populacija potočnih pastrmki, koja se može proceniti prema njihovoj relativnoj brojnosti (najviše do 10 jedinki po kilometru). U poređenju sa ovim rekama, Kožica je jedina koja ima koliko-toliko stabilni vodni režim i koja je nešto veća, gde se populacija potočnih pastrmki procenjuje na oko 100 jedinki po kilometru. Povremeni nepogodni sredinski uslovi ovih reka najverovatnije negativno utiču na brojnost populacija. Upravo činjenica da ove populacije broje malo jedinki predstavlja ograničavajući faktor kako u populacionim analizama, tako i u njihovom korišćenju za formiranje matičnog jata u cilju poribljavanja autohtonim jedinkama.

Analiza jedarnog genoma, za razliku od analize mitondrijskog genoma, govori i o paternalnom poreklu jedinki. Pošto samo u Vratni postoji mešavina atlanskih i dunavskih potočnih pastrmki, analiza jedarnog gena *LDH-C** obuhvatila je samo jedinke iz ove reke. Iako je analiza mtDNK otkrila tri jedinke od sedam sa atlanskim haplotipom, analizom gena *LDH-C** otkrivena je samo jedna heterozigotna jedinka. Jedan od alela koji je posedovala karakterističan je za populacije atlanskog regiona (*LDH-C*90*). Jedinke koje su nosile mtDNK atlanskog haplotipa vode poreklo po materinskoj liniji od atlanske potočne pastrmke. Postojanje dve jedinke koje nose mitohondrijski atlanski haplotip, a na jedarnoj DNK *LDH* alele isključivo vezane za dunavsku liniju, ukazuje na dunavsko paternalno poreklo ovih jedinki. To nesumnjivo ukazuje da je dolazilo do ukrštanja između ove dve linije u Vratni, kao i da su se introdukovane atlanske jedinke već introgresirale u populaciju autohtone, crnorečke pastrmke.

Iako su i mikrosateliti deo jedarnog genoma i takođe daju informacije i o paternalnom poreklu, korišćeni lokusi u ovom radu nisu bili diskriminatorski za linije potočnih pastrmki kao *LDH-C** lokus. Tri jedinke koje su nosile mitohondrijski atlanski haplotip nisu nosile posebne mikrosatelitske alele. Privatni aleli bili su prisutni i kod ovih jedinki i kod jedinki koje su nosile mitohondrijski haplotip dunavske haplogrupe. Doduše,

kod jedne od analiziranih jedinki iz Vratne (Ig39) atlanskog mitohondrijskog haplotipa otkrivena su dva privatna alela na lokusima SsaD190 i SsoSL438, što ukazuje na njenu različitost od ostalih u grupi. Ipak, ova jedinka bila je homozigotna za *LDH-C*100* alel karakterističan za dunavske populacije.

Najmanja vrednost detektovane heterozigotnosti uočena je u Rečkoj reci (0.28), što je verovatno posledica prostorne izolovanosti nepremostivom preprekom od drugih analiziranih populacija. U ovoj populaciji najverovatnije je došlo do smanjenja genetičke varijabilnosti, odnosno veće genetičke sličnosti između jedinki, kako zbog lokalnog ukrštanja, tako i zbog efekta genetičkog drifta usled male brojnosti. Ipak, Wilcoxon test nije pokazao značajnost za efekat uskog grla u ovoj reci, ali odstupanja od L-oblika distribucije alelskih učestalosti prema *mode-shift* testu (koji nema statističku potporu) postoje, što je pokazatelj da je ovde verovatno bilo skorijeg efekta uskog grla. Ista situacija je i u Maloj Boljetinskoj reci i Vratni. Ekspanzija populacija otkrivena programom BOTTLENECK u Mirovštici i Lukovskom vrelu mogla bi biti posledica unesenog stranog haplotipa Da2 koji utiče na sliku o ukupnoj genetičkoj varijabilnosti uzorka.

Generalno, prema rezultatima analize molekularne varijanse, genetička diferencijacija subpopulacija prilično je izražena (41.48%), ali je procenat varijabilnosti na nivou jedinki u totalnoj populaciji daleko veći (62.14%), nego na nivou jedinki u subpopulacijama (-3.62). Ipak, Rečka reka pokazala je brojne specifičnosti. Pored prisustva isključivo Da1 mitohondrijskog haplotipa, i mikrosatelitski aleli bili su ekskluzivni samo za ovu reku, što sve zajedno ukazuje na dugogodišnju izolovanost ove populacije i govori u prilog njenog autohtonog i predačkog karaktera. Izolovanost je najverovatnije posledica postojanja visokog vodopada koji predstavlja nepremostivu prepreku za ove jedinke.

Najveće genetičke razlike, prema F_{ST} vrednostima i najmanji protok gena upravo je i uočen između Rečke reke i reka sliva Crnog Timoka, što je i očekivano usled velike udaljenosti. Visoka F_{ST} vrednost (0.55) i proporcionalno mali protok gena (0.21) uočen je i između Rečke i Zamne koje nisu toliko geografski udaljene. Uzimajući u obzir navedene činjenice, nije iznenađujuće što je prema korespondentnoj faktorskoj analizi Rečka reka izdvojena u posebnu grupu. Posebnosti populacije Rečke reke uočene su i CLUSTER i

STRUCTURE analizom. Klaster analizom ova populacija svrstana je u grupu đerdapskih reka, ali kao najudaljenija grana.

U programu STRUCTURE, izdvojeno je konačno pet populacija od kojih su četiri u grupi đerdapskih reka, a preostala predstavlja reke sliva Crnog Timoka koje su prepoznate kao jedna populacija. Rečka reka se i ovde izdvaja kao posebna grupa, kao i reka Kožica, dok se Mala Boljetinska reka i Zlatica, kao i reke Vratna i Zamna grupišu zajedno. U populacijama koje su zajedno grupisane, najverovatnije je dolazilo do međusobnog ukrštanja, što i nije neverovatno obzirom da su ove reke prostorno vrlo bliske, mada nije u potpunosti jasno da li ove su jedinke komunicirale preko izvorišnih delova reka ili prolazeći kroz Dunav. Ukoliko između ovih reka zaista takva vrsta komunikacije postoji, to može omogućiti i širenje alohtonih haplotipa koji se ovde nalaze, pa samim tim i ugroziti preostale čisto autohtone populacije i njihov genetički diverzitet.

5. Zaključak

Novootkriveni haplotip Da23c predstavlja autohtoni haplotip CR mtDNK potočne pastrmke za region severoistočne Srbije. Njegovo otkrivanje u ovom delu Srbije, nesumnjivo povećava konzervacioni značaj ovog regiona. Nasuprot njemu, ovde su otkrivene i jedinke atlanskog haplotipa koji nije autohton za ovu oblasti, ali je već integrisan u populaciju u reci Vratni, što predstavlja pretnju u vidu mogućeg širenja ovih jedinki u susedne, bliske tokove.

Još jedan haplotip, Da2, koji je najverovatnije alohton, nalazi se u timočkim populacijama i verovatno je davno uveden u populaciju. Bez obzira, jedinke sa Da23c haplotipom u ovom slivu su i dalje brojne, i mogu predstavljati izvor za očuvanje autohtonog diverziteta.

Poribljavanje neodgovarajućim genetičkim materijalom predstavlja veliku pretnju i ovakvu praksu bi trebalo napustiti ili odustati od bilo kakvog poribljavanja, dok se ne ustanovi matično jato sa autohtonim jedinkama, kako ne bi došlo do smanjenja genetičke varijabilnosti i narušavanja autohtone kombinacije gena. Postojanje reka, koje nastanjuju samo jedinke Da23c haplotipa, daje nadu i mogućnost za razmartanje korišćenja ovih populacija za formiranje matičnog jata u svrhu proizvodnje odgovarajuće mladi za poribljavanje ovog regiona, kako bi se oporavio genetički diverzitet. Ipak, ove populacije nisu tako brojne, pa je pitanje da li bi ih trebalo izlagati takvom stresu, a poznato je da čak i takva vrsta poribljavanja (eng. *supportive*) može negativno uticati na genetički diverzitet.

Bez obzira što su populacije male, ustanovljeno je da najverovatnije nisu prošle kroz genetičko usko grlo, a pojedini testovi pokazuju da su Rečka, Vratna i Mala Boljetinska reka imale promene učestalosti analiziranih mikrosatelitskih alela koje ukazuju na *bottleneck*. U Rečkoj reci ovo je i bilo očekivano, s obzirom na izolovanost ove populacije. Nepostojanje genetičkih uskih grla ukazuje na stabilnu genetičku varijabilnost uzorka, naročito onih u slivu Crnog Timoka. Ne treba ipak gubiti iz vida da su reke tog sliva poribljavane jedinkama Da2 haplotipa, što može da utiče na rezultate analiza učestalosti alela.

U cilju održanja autohtonog genetičkog diverziteta ovog područja, neophodno je preduzeti odgovarajuće konzervacione i upravljačke mere. Neke od njih su: 1) praćenje genetičkog stanja ovih populacija; 2) razmatranje mogućnosti formiranja matičnih jata, radi poribljavanja odgovarajućim genetičkim materijalom i kako bi se osnažio genofond, kao i 3) uvođenje genetičkih analiza (genotipizacije) za potočne pastrmke koje se koriste za poribljavanje.

6. Literatura

Allendorf, F., Thorgaard, G.H. (1984). Tetraploidy and the Evolution of Salmonid Fishes. In: Evolutionary Genetics of Fishes. B. J. Turner (ed.). *Plenum Press*, New York, pp. 1 – 53.

Allendorf, F., Leary, R., Spruell, P., Wenburg, J. (2001). The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends Ecol. Evol.* **16** (11), 613-622.

Amidžić, L., Krasulja, S., Đorđević, Z., Panjković, B., Ostojić, D., Belij, S., Habijan-Mikeš, V., Kovačev, N., Kovačević, B., Šehovac, E. ... Petrović, B. (2011). Zaštićena prirodna dobra Srbije II. Beograd, Srbija (Ministarstvo životne sredine, rudarstva i prostornog planiranja Srbije). Zavod za zaštitu prirode Srbije. 280 pp.

Angers, B., Bernatchez, L. (1998). Combined use of SMM and nonSMM methods to infer fine structure and evolutionary history of closely related Brook Charr (*Salvelinus fontinalis*, Salmonidae) populations from microsatellites. *Molecular Biology and Evolution*, **15**, 143–159.

Angers, B., Gharbi, K., Estoup, A., (2002). Evidence of gene conversion events between paralogous sequences produced by tetraploidization in Salmoninae fish. *Journal of Molecular Evolution*, **54**, 501–510.

Antunes, A., Templeton, A. R., Guyomard, R., Alexandrino, P. (2002) The role of nuclear genes in intraspecific evolutionary inference: genealogy of the transferrin gene in the brown trout. *Molecular Biology and Evolution*, **19**, 1272–1287.

Apostolidis, A. P., Loukovitis, D., Tsigenopoulos, C. S. (2008). Genetic characterization of brown trout (*Salmo trutta*) populations from the Southern Balkans using mtDNA sequencing and RFLP analysis. *Hydrobiologia*, **600**, 169–176.

Apostolidis, A., Karakousis, Y., Triantaphyllidis, C. (1996a). Genetic differentiation and phylogenetic relationships among Greek *Salmo trutta* L. (brown trout) populations as

revealed by RFLP analysis of PCR amplified mitochondrial DNA segments. *Heredity*, **77**, 608–618.

Apostolidis, A., Karakousis, Y., Triantaphyllidis, C. (1996b). Genetic divergence and phylogenetic relationships among *Salmo trutta* L. (brown trout) populations from Greece and other European countries. *Heredity*, **76**, 551–560.

Apostolidis, A.P., Stoumboudi, M.T., Kalogianni, E., Cote, G., Bernatchez, L., (2011). Genetic divergence among native trout *Salmo trutta* populations from southern Balkans based on mitochondrial DNA and microsatellite variation. *Journal of Fish Biology* **79**, 1950–1960.

Araki, H., Ardren, W. R., Olsen, E., Cooper, B., Blouin, M. S. (2007a). Reproductive success of captive-bred steelhead trout in the wild: evaluation of three hatchery programs in the hood river. *Conservation Biology*, **21**, 181–190.

Araki, H., Cooper, B., Blouin, M. S., (2009). Carry-over effect of captive breeding reduces reproductive fitness of wild-born descendants in the wild. *Biol. Lett.* (published online). doi:10.1098/rsbl.2009.0315.

Araki, H., Schmid, C. (2010). Is hatchery stocking a help or a harm? Evidence, limitations and future directions in ecological and genetic surveys. *Aquaculture*, **308** (Suppl. 1), S1–S11.

Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A., Saunders, N. C. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **18**, 489-522.

Avise, J. C. (2000). Phylogeography: the history and formation of species. Cambridge, MA. *Harvard University Press*.

Balon, K. E. (1968). Notes to origin and evolution of trouts and salmons with special reference to the Danubian trouts. *Acta Societatis Zoologicae Bohemoslovacae*, **32** (1), 1-21.

Bandelt, H. J., Forster, P., Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution*, **16** (1), 37-48.

Bardakci, F., Degerli, N., Ozdemir, O., Basibuyuk, H. H. (2006). Phylogeography of the Turkish brown trout *Salmo trutta* L.: mitochondrial DNA PCR-RFLP variation. *Journal of Fish Biology*, **68** (A), 36-55.

Behnke, R. J. (1968). A new subgenus and species of trout, *Salmo* (*Platysalmo*) *platycephalus* from south central Turkey, with comments on the classification of the subfamily Salmonidae. *Mitteilungen Hamburgisches Zoologisches Museum und Institut*, **66**, 1-15.

Behnke, R. J. (1986). Brown trout. *Trout*, **27**, 42-47.

Bell, G. I., Jurka, J. (1997). The length distribution of perfect dimer repetitive DNA is consistent with its evolution by an unbiased single-step mutation process. *Journal of molecular evolution*, **44** (4), 414-421.

Benfey, T. J. (2001). Use of sterile triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) for aquaculture in New Brunswick, Canada. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*, **58** (2), 525-529.

Berg, W. J., Ferris, S. D. (1984). Restriction endonuclease analysis of salmonid mitochondrial DNA. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **41** (7), 1041-1047.

Bernatchez, L., Guyomard, R., Bonhomme, F. (1992). DNA sequence variation of the mitochondrial control region among geographically and morphologically remote European brown trout *Salmo trutta* populations. *Molecular Ecology*, **1**, 161-173.

Bernatchez, L., Danzmann, R. G. (1993). Congruence in control - region sequence and restriction – site variation in mitochondrial DNA of brook charr (*Salvelinus fontinalis* Mitchill). *Molecular Biology and Evolution*, **10**, 1002-1014

Bernatchez, L. (2001). The evolutionary history of brown trout (*Salmo trutta* L.) inferred from phylogenetic, nested clade, and mismatch analyses of mitochondrial DNA variation. *Evolution*, **55** (2): 351-379.

Berra, T. M. (2013). A Review of "Ecology of Australian Freshwater Fishes" Edited by Paul Humphries and Keith Walker. CSIRO Publishing, Collingwood, Victoria, Australia. 2013. 423 pages. \$ A130. 00 (hardcover). *Transactions of the American Fisheries Society*, **142** (5), 1477-1480.

Berthold, P. (1991). Genetic control of migratory behaviour in birds. *Trends in Ecology & Evolution*, **6** (8), 254-257.

Birky, C. W., Maruyama, T., Fuerst, P. (1983). An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplasts, and some results. *Genetics*, **103** (3), 513-527.

Blanchet, S., Loot, G., Grenouillet, G., Brosse, S. (2007). Competitive interactions between native and exotic salmonids: a combined field and laboratory demonstration. *Ecology of Freshwater Fish*, **16** (2), 133-143.

Borst, P., Grivell, L. A. (1981). Small is beautiful - portrait of a mitochondrial genome. *Nature*, **290**, 443-444

Bridcut, E. E., Giller, P. S. (1995). Diet variability and foraging strategies in brown trout (*Salmo trutta*): an analysis from subpopulations to individuals. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **52** (12), 2543-2552

Brown, W. M., George, M., Wilson, A. C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **76**, 1967-1971.

Brunner, P. C, M. R. Douglas, A. Osinov, C. C. Wilson, Bernatchez L.. (2001). Holarctic phylogeography of Arctic char (*Salvelinus alpinus* L.) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Evolution* **55**, 573-586.

Cairney, M., Taggart, J. B., Hoyheim, B. (2000). Characterization of microsatellite and minisatellite loci in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and cross-species amplification in other salmonids. *Molecular Ecology*, **9**, 2155–2234.

Capanna, E., Cataudella, S., De Fronza, T. G. (1973). Some remarks on the karyotype of an intergeneric hybrid, *Salmo trutta* x *Salvelinus fontinalis* (Pisces: Salmoniformes). *Genetica*, **44**, 194-206.

Chakraborty, R., Jin, L. (1993). A unified approach to study hypervariable polymorphisms: statistical considerations of determining relatedness and population distances. In *DNA fingerprinting: state of the science* (pp. 153-175). Birkhäuser Basel.

Charles, K., Guyomard, R., Hoyheim, B., Ombredane, D., Baglinière, J. L. (2005). Lack of genetic differentiation between anadromous and resident sympatric brown trout (*Salmo trutta*) in a Normandy population. *Aquatic Living Resources*, **18** (1), 65-69.

Chereshnev, I. A., Skopets M. B. (1990). *Salvethymus svetovidovi* gen. et sp. nova - A new endemic fish of the subfamily Salmoninae from Lake El'gygytgyn (Central Chukotka). *Problems in Ichthyology* **30**, 201-213.

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

Chung, H. J., Jung, J. D., Park, H. W., Kim, J. H., Cha, H. W., Min, S. R., ... Liu, J. R. (2006). The complete chloroplast genome sequences of *Solanum tuberosum* and comparative analysis with Solanaceae species identified the presence of a 241-bp deletion in cultivated potato chloroplast DNA sequence. *Plant cell reports*, **25** (12), 1369-1379.

Cornuet, J. M., Luikart, G. (1996). Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, **144** (4), 2001-2014.

Cortey M., García-Marín J. L. (2002). Evidence for phylogeographically informative sequence variation in the mitochondrial control region of Atlantic brown trout. *Journal of Fish Biology*, **60**, 1058-1063.

Cortey, M., Pla, C., García-Marín, J. L. (2004). Historical biogeography of Mediterranean trout. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **33**, 831-844.

Crespi, B. J., Fulton, M. J. (2004). Molecular systematics of Salmonidae: combined nuclear data yields a robust phylogeny. *Molecular phylogenetics and evolution*, **31** (2), 658-679.

Crisp, D. T., (2000). Trout and Salmon: Ecology, Conservation and Rehabilitation, Blackwell Science. Oxford. 212 pp

Cross, T. F. (1989). *Genetics and the management of the Atlantic salmon*. Atlantic Salmon Trust. Pitlochry.

Crowl, T. A., Townsend, C. R., McIntosh, A. R. (1992). The impact of introduced brown and rainbow trout on native fish: the case of Australasia. *Reviews in fish biology and fisheries*, **2** (3), 217-241.

Crozier, W. W., Ferguson, A. (1986). Electrophoretic examination of the population structure of brown trout, *Salmo trutta* L., from the Lough Neagh catchment, Northern Ireland. *Journal of Fish Biology*, **28** (4), 459-477.

Delling, B. (2010). Diversity of western and southern Balkan trouts, with the description of a new species from the Louros River, Greece (Teleostei: Salmonidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters* **21**, 331–344.

Di Rienzo, A., Peterson, A. C., Garza, J. C., Valdes, A. M., Slatkin, M., Freimer, N. B. (1994). Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **91**(8), 3166-3170.

Dorofeyeva, E. A. (1989). The basic principles of classification and phylogeny of the salmonid fishes (Salmoniformes, Salmonoidei, Salmonidae). *Biology and Phylogeny of*

Fishes, (Korovina, V. M., ed.). St. Petersburg: Proceedings of Zoological Institute, USSR Academy of Sciences (in Russian), pp. 5-16.

Duftner, N., Weiss, S., Medgyesy, N., Sturmbauer, C. (2003). Enhanced phylogeographic information about Austrian brown trout populations derived from complete mitochondrial control region sequences. *Journal of Fish Biology*, **62**, 427-435.

Earl, D. A., vonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* vol. 4 (2) pp. 359-361

Edwards, Y. J., Elgar, G., Clark, M. S., Bishop, M. J., (1998). The identification and characterization of microsatellites in the compact genome of the Japanese pufferfish, *Fugu rubripes*: perspectives in functional and comparative genomic analysis. *Journal of Molecular Biology*, **278**, 843–854

Elliott, J. M. (1994). Quantitative ecology and the brown trout. Oxford Series in Ecology and Evolution, Oxford University Press, Oxford, Great Britain, 286 pp.

Epplen, C., Melmer, G., Siedlaczek, I., Schwaiger, F. W., Maueler, W., Epplen, J. T., (1993). On the essence of “meaningless” simple repetitive DNA in eukaryote genomes. In: DNA Fingerprinting: State of the Science, pp. 29–45. Birkhäuser Verlag, Basel Switzerland.

Epplen, J. T., Kyas, A., Maueler, W., (1996). Genomic simple repetitive DNAs are targets for differential binding of nuclear proteins. *FEBS Lett.* **389** (1), 92–95.

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

Estoup, A., Rousset, F., Michalakis, Y., Cornuet, J.-M., Adriamanga, M., Guyomard, R. (1998). Comparative analysis of microsatellite and allozyme markers: a case

study investigating microgeographic differentiation in brown trout (*Salmo trutta*). *Molecular Ecology*, **7**, 339-353.

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), 2611-2620.

Excoffier, L., Lischer, H. E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources*, **10** (3), 564-567.

Ferguson, A., Mason, F. M. (1981). Allozyme evidence for reproductively isolated sympatric populations of brown trout *Salmo trutta* L. in Lough Melvin, Ireland. *Journal of Fish Biology*, **18** (6), 629-642.

Ferguson, A., Fleming, C. C. (1983). Evolutionary and taxonomic significance of protein variation in the brown trout (*Salmo trutta* L.) and other salmonid fishes. In *Protein polymorphism: adaptive and taxonomic significance* (Vol. 24, pp. 84-99). Academic Press London.

Ferguson, A. (1989). Genetic differences among brown trout, *Salmo trutta*, stocks and their importance for the conservation and management of the species. *Freshwater biology*, **21** (1), 35-46.

Ferris, S. D., Sage, R. D., Huang, C. M., Nielsen, J. T., Ritte, U., Wilson, A. C. (1983). Flow of mitochondrial DNA across a species boundary. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **80** (8), 2290-2294.

Ferris, S. D., Berg, W. J. (1987). The utility of mitochondrial DNA in fish genetics and fishery. *Population Genetics, Fishery Management*. University of Washington Press, Seattle, WA, 277-299.

Fleming, I. A., Gross, M. R. (1990). Latitudinal clines: a trade-off between egg number and size in Pacific salmon. *Ecology*, **71** (1), 1-11.

Fletcher, G. L., Shears, M. A., Yaskowiak, E. S., King, M. J., Goddard, S. V. (2005). Gene transfer: potential to enhance the genome of Atlantic salmon for aquaculture. *Animal Production Science*, **44** (11), 1095-1100.

Fraser, D. J., Weir, L. K., Bernatchez, L., Hansen, M. M., Taylor, E. B. (2011). Extent and scale of local adaptation in salmonid fishes: review and meta-analysis. *Heredity*, **106** (3), 404-420.

Frost, W. E., Varley, M. E. (1967). *The trout* (Vol. 21). Collins.

Frost, W. E. (1974). *A survey of the rainbow trout (Salmo gairdneri) in Britain and Ireland*. publisher not identified.

Garcia-Marin, J. L., Utter, F. M., Pla, C. (1999). Postglacial colonization of brown trout in Europe based on distribution of allozyme variants. *Heredity*, **82**, 46-56.

Gharbi, K., Gautier, A., Danzmann, R. G., Gharbi, S., Sakamoto, T., Høyheim, B., ... Okamoto, N. (2006). A linkage map for brown trout (*Salmo trutta*): chromosome homeologies and comparative genome organization with other salmonid fish. *Genetics*, **172** (4), 2405-2419.

Giuffra, E., Bernatchez, L., Guyomard, R. (1994). Mitochondrial control region and protein coding genes sequence variation among phenotypic forms of brown trout *Salmo trutta* from northern Italy. *Molecular Ecology*, **3** (2), 161-171.

Giuffra, E., Guyomard, R., Forneris, G. (1996). Phylogenetic relationships and introgression patterns between incipient parapatric species of Italian brown trout (*Salmo trutta* L. complex). *Molecular ecology*, **5**, 207-212

Goldstein, D. B., Pollock, D. D. (1997). Mutation processes and methods of phylogenetic inference. *J Hered*, **88**, 335-342.

Goudet, J. (2002). FSTAT version 2.9. 3.2, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. *Institute of Ecology, Lausanne, Switzerland*. Website <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm> [accessed 20 August 2012].

Gross, M. R. (1984). Sunfish, salmon, and the evolution of alternative reproductive strategies and tactics in fishes. *Fish reproduction: strategies and tactics*, pp. 55-75.

Gross, M. R. (1985). Disruptive selection for alternative life histories in salmon. *Nature*, **313** (5997), 47-48.

Gross, M. R., Coleman, R. M., McDowall, R. M. (1988). Aquatic productivity and the evolution of diadromous fish migration. *Science (Washington)*, **239** (4845), 1291-1293.

Gum, B., Gross, R., Kuehn, R. (2005). Mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of European grayling (*Thymallus thymallus*): evidence for secondary contact zones in central Europe. *Molecular Ecology*, **14** (6), 1707-1725.

Gur-Arie, R., Cohen, C. J., Eitan, Y., Shelef, L., Hallerman, E. M., Kashi, Y. (2000). Simple sequence repeats in *Escherichia coli*: abundance, distribution, composition, and polymorphism. *Genome research*, **10** (1), 62-71.

Gyllensten, U., Wilson, A. C. (1987). Mitochondrial DNA of salmonids. *Population Genetics and Fisheries Management. University of Washington Press, Seattle*, 301-307.

Hamada, H., Petrino, M. G., Kakunaga, T. (1982). A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **79** (21), 6465-6469.

Hamilton, K. E., Ferguson, A., Taggart, J. B., Tomasson, T., Walker, A., Fahy, E. (1989). Post-glacial colonization of brown trout, *Salmo trutta* L.: *Ldh-5* as a phylogeographic marker locus. *Journal of Fish Biology*, **35** (5), 651-664.

Hansen, M. M., Loeschcke, V., Rasmussen, G., Simonsen, V. (1993). Genetic differentiation among Danish brown trout (*Salmo trutta*) populations. *Hereditas*, **118** (2), 177-185.

Hansen, M. M., Nielsen, E. E., Mensberg, K. L. (1997). The problem of sampling families rather than populations: relatedness among individuals in samples of juvenile brown trout *Salmo trutta* L. *Molecular Ecology*, **6** (5), 469-474.

Hansen, M. M., Nielsen, E. E., Ruzzante, D. E., Bouza, C., Mensberg, K. L. D. (2000). Genetic monitoring of supportive breeding in brown trout (*Salmo trutta* L.), using microsatellite DNA markers. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **57** (10), 2130-2139.

Hansen, M. M., Ruzzante, D. E., Nielsen, E. E., Mensberg, K. L. D. (2000). Microsatellite and mitochondrial DNA polymorphism reveals life-history dependent interbreeding between hatchery and wild brown trout (*Salmo trutta* L.). *Molecular Ecology*, **9** (5), 583-594.

Hansen, M. M. (2002). Estimating the long-term effects of stocking domesticated trout into wild brown trout (*Salmo trutta*) populations: An approach using microsatellite DNA analysis of historical and contemporary samples. *Molecular Ecology*, **11** (6), 1003-1015.

Hansen, M. M., Ruzzante, D. E., Nielsen, E. E., Bekkevold, D., Mensberg, K. L. D. (2002). Long-term effective population sizes, temporal stability of genetic composition and potential for local adaptation in anadromous brown trout (*Salmo trutta*) populations. *Molecular Ecology*, **11** (12), 2523-2535.

Harrison, R. G. (1989). Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in Ecology & Evolution*, **4** (1), 6-11.

Hartley, S. E., Horne, M. T. (1984). Chromosome relationships in the genus *Salmo*. *Chromosoma*, **90** (3), 229-237.

Hartley, S. E. (1987). The chromosomes of salmonid fishes. *Biological Reviews*, **62** (3), 197-214.

Hauge, H., Dahle, M. K., Kristoffersen, A. B., Wiik-Nielsen, C. R., Tengs, T. (2014). Screening for large scale deletions in the genome of a landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar*) using high throughput sequencing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/574450792>.

Heckel, J. J. (1851). Bericht einer ichthyologischen Reise. II. Beiträge zu den Gattungen “*Salmo*, *Fario*, *Salar*, *Coregonus*, *Chondrostoma*” und “*Telestes*”. *Sitzungsberrichte der Akademie der Wissenschaften*, Wien, 347–390.

Hindar, K., Jonsson, B., Ryman, N., Ståhl, G. (1991). Genetic relationships among landlocked, resident, and anadromous brown trout, *Salmo trutta* L. *Heredity*, **66** (1), 83-91.

Hindar, K., Jonsson, B. (1993). Ecological polymorphism in Arctic charr. *Biological Journal of the Linnean Society*, **48** (1), 63-74.

Hoar, W. S. (1976). Smolt transformation: evolution, behavior, and physiology. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, **33** (5), 1233-1252.

ITIS. (2016). <http://www.itis.gov>.

Hutchison, C. A., Newbold, J. E., Potter, S. S., Edgell, M. H. (1974). Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature*, **251**, 536-538.

Jakupciak, J. P., Wells, R. D. (2000). Gene conversion (recombination) mediates expansions of CTG· CAG repeats. *Journal of Biological Chemistry*, **275** (51), 40003-40013.

Jarne, P., Lagoda, P. J. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in ecology & evolution*, **11** (10), 424-429.

Jasinska, A., Michlewski, G., De Mezer, M., Sobczak, K., Kozłowski, P., Napierala, M., Krzyzosiak, W. J. (2003). Structures of trinucleotide repeats in human transcripts and their functional implications. *Nucleic acids research*, **31** (19), 5463-5468.

Jeffreys, A. J., Murray, J., Neumann, R. (1998). High-resolution mapping of crossovers in human sperm defines a minisatellite-associated recombination hotspot. *Molecular cell*, **2** (2), 267-273.

Jevtić, J. (1989). Ribarstvo. Praktikum. Naučna knjiga, Beograd.

Jonsson, B., Gravem, F. R. (1985). Use of space and food by resident and migrant brown trout, *Salmo trutta*. *Environmental Biology of Fishes*, **14** (4), 281-293.

Jonsson, B., Jonsson, N. (1993). Partial migration: niche shift versus sexual maturation in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **3** (4), 348-365.

Karaman, S. (1924). Pisces Macedoniae. Derzeit am institut Z. Erforschung und Bekämpfung D. Malaria, Trogir (Dalmatien) Split.

Karaman, S. (1927). Salmonidi Balkana [Salmonids of Balkans]. *Glasnik Naučnog Društva Skopje*, **2**, 253–268.

Karaman, S. (1933). Prilozi ihtiologiji Crne Gore. Ribarski list, **8**, 104–106

Karaman, S. (1938). Prilog poznavanju slatkovodnih riba Jugoslavije. *Glasnik skopskog naučnog društva – Odeljenje prirodnih nauka*, **18**, 131-139.

Kendall, A. W., Behnke, R. J. (1984). Salmonidae: development and relationships. *Ontogeny and systematics of fishes. American Society of Ichthyologists and Herpetologists, Special Publication*, **1**, 142-149.

Kimura, M., Crow, J. F. (1964). The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, **49** (4), 725-738.

Kimura, M., Ohta, T. (1978). Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **75** (6), 2868-2872.

King, T. L., Eackles, M. S., Letcher, B. H. (2005). Microsatellite DNA markers for the study of Atlantic salmon (*Salmo salar*) kinship, population structure, and mixed-fishery analyses. *Molecular Ecology Notes*, **5** (1), 130-132.

Kinnison, M. T., Hendry, A. P. (2004). From macro-to microevolution: tempo and mode in salmonid evolution. *Evolution illuminated: salmon and their relatives. Oxford University Press, New York*, 208-231.

Klemetsen, A. (1967). On the feeding habits of the population of brown trout (*Salmo trutta* L.) in Jølstervann, west Norway, with special reference to the utilization of planktonic crustaceans. *Nytt Mag. Zool*, **15**, 50-67.

Klemetsen, A., Amundsen, P. A., Dempson, J. B., Jonsson, B., Jonsson, N., O'connell, M. F., Mortensen, E. (2003). Atlantic salmon *Salmo salar* L., brown trout *Salmo trutta* L. and Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.): a review of aspects of their life histories. *Ecology of freshwater fish*, **12** (1), 1-59.

Kohout, J., Jašková, I., Papoušek, I., Šedivá, A., Šlechta, V. (2012). Effects of stocking on the genetic structure of brown trout, *Salmo trutta*, in Central Europe inferred from mitochondrial and nuclear DNA markers. *Fisheries Management and Ecology*, **19** (3), 252-263.

Kohout, J., Šedivá, A., Apostolou, A., Stefanov, T., Marić, S., Gaffaroğlu, M., Šlechta, V. (2013). Genetic diversity and phylogenetic origin of brown trout *Salmo trutta* populations in eastern Balkans. *Biologia*, **68** (6), 1229-1237.

Kottelat, M. (1997). *European freshwater fishes: an heuristic checklist of the freshwater fishes of Europe (exclusive of former USSR), with an introduction for non-systematists and comments on nomenclature and conservation* (Vol. 5). Slovak Academy of sciences.

Kottelat, M., Freyhof, J. (2007). *Handbook of European freshwater fishes*. Publications Kottelat.

Krieg, F., Guyomard, R. (1985). Population genetics of French brown trout (*Salmo trutta* L): large geographical differentiation of wild populations and high similarity of domesticated stocks. *Génétique sélection évolution*, **17** (2), 225-242.

Lack, D. (1943). The problem of partial migration. *British Birds*, **37**, 122-131.

Langella, O. (2002). POPULATIONS 1.2. 28. Population genetic software (individuals or populations distances, phylogenetic trees). *CNRS, France*.

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., ... Thompson, J. D. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *bioinformatics*, **23** (21), 2947-2948.

Lerceteau-Köhler, E., Weiss, S. (2006). Development of a multiplex PCR microsatellite assay in brown trout *Salmo trutta*, and its potential application for the genus. *Aquaculture*, **258** (1), 641-645.

Lerceteau-Köhler, E., Schliewen, U., Kopun, T., Weiss, S. (2013). Genetic variation in brown trout *Salmo trutta* across the Danube, Rhine, and Elbe headwaters: a failure of the phylogeographic paradigm?. *BMC evolutionary biology*, **13** (1), 1.

Lewontin, R. C. (1974). *The genetic basis of evolutionary change* (Vol. 560). New York: Columbia University Press.

Lewontin, R. C., Rose, S., Kamin, L. J. (1984). Not in our genes: Biology, ideology, and human nature. New York. Pantheon.

Li, Y. C., Korol, A. B., Fahima, T., Beiles, A., Nevo, E. (2002). Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular ecology*, **11** (12), 2453-2465.

Lopez, J. V., Culver, M., Stephens, J. C., Johnson, W. E., O'Brien, S. J. (1997). Rates of nuclear and cytoplasmic mitochondrial DNA sequence divergence in mammals. *Molecular Biology and Evolution*, **14** (3), 277-286.

Lowe, S., Browne, M., Boudjelas, S., De Poorter, M. (2000). 100 of the World's Worst Invasive Alien Species: A Selection from the Global Invasive Species Database. The Invasive Species Specialist Group (ISSG) a specialist group of the Species Survival Commission (SSC) of the World Conservation Union (IUCN), Gland, pp. 1-12.

Lubieniecki, K. P., Saeed, D., So, M., Fujiki, K., Koop, B. F. Davidson, W. S. (2014). Evolution of Salmoniformes based on their mitochondrial genomes. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_024032.1.

MacCrimmon, H. R., Marshall, T. L. (1968). World distribution of brown trout, *Salmo trutta*. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, **25** (12), 2527-2548.

MacCrimmon, H. R. (1971). World distribution of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of the Fisheries Board of Canada*, **28** (5), 663-704.

Manojlović, P. (1986). Severoistočna Srbija: fizičko-geografske karakteristike. Istorijski arhiv Krajine, Ključa i Poreča, Negotin.

Margulis, L. (1970). *Origin of eukaryotic cells: evidence and research implications for a theory of the origin and evolution of microbial, plant, and animal cells on the Precambrian earth*. New Haven: Yale University Press.

Marić, S., Sušnik, S., Simonović, P., Snoj, A. (2006). Phylogeographic study of brown trout from Serbia, based on mitochondrial DNA control region analysis. *Genetics Selection Evolution*, **38** (4), 411-430.

Marić, S., Nikolić, V., Tošić, A., Simonović, P. (2012). Short communication Record of the brown trout *Salmo trutta* L., 1758 in the main riverbed of the Serbian part of the Danube River. *J. Appl. Ichthyol*, **28**, 135-137.

Marković, J. Đ., Pavlović, M. A. (1995). *Geografske regije Jugoslavije:(Srbija i Crna Gora)*. Savremena administracija. Beograd. 214 pp.

Marshall, G. T., Beaumont, A. R., Wyatt, R. (1992). Genetics of brown trout (*Salmo trutta* L.) stocks above and below impassable falls in the Conwy river system, North Wales. *Aquatic Living Resources*, **5** (1), 9-13.

Médail, F., Diadema, K. (2009). Glacial refugia influence plant diversity patterns in the Mediterranean Basin. *Journal of Biogeography*, **36** (7), 1333-1345.

Meier, K., Hansen, M. M., Bekkevold, D., Skaala, Ø., Mensberg, K. D. (2011). An assessment of the spatial scale of local adaptation in brown trout (*Salmo trutta* L.): footprints of selection at microsatellite DNA loci. *Heredity*, **106** (3), 488-499.

Miller, S. A., Dykes, D. D., Polesky, H. F. R. N. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*, **16** (3), 1215.

Moritz, C., Dowling, T. E., Brown, W. M. (1987). Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and systematics*, Vol **18**, pp. 269-292.

Mrdak, D. (2009). Environmental risk assessment of the Morača dams: fish fauna of Morača river canyon and Skadar Lake. *Report committed by WWF MedPO and Green Home under the framework of Sharing Water Project–Skadar Lake component. Podgorica.*

Mrdak, D., Nikolić, V., Tošić, A., Simonović, P. (2012). Molecular and ecological features of the soft-muzzled trout *Salmo obtusirostris* (Heckel, 1852) in the Zeta River, Montenegro. *Biologia*, **67** (1), 222-233.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986, January). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 51, pp. 263-273). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Neff, B. D., Gross, M. R. (2001). Microsatellite evolution in vertebrates: inference from AC dinucleotide repeats. *Evolution*, **55** (9), 1717-1733.

Nei, M., Tajima, F. (1981). Genetic drift and estimation of effective population size. *Genetics*, **98** (3), 625-640.

Nelson, J. S. (2006). *Fishes of the World*. 4th eds. *New York: John*. pp. 601.

Nielsen, E. E., Hansen, M. M., Loeschcke, V. (1999). Analysis of applications DNA from old scale samples: technical aspects, and perspectives for conservation. *Hereditas*, **130** (3), 265-276.

Norden, C. R. (1961). Comparative osteology of representative salmonid fishes, with particular reference to the grayling (*Thymallus arcticus*) and its phylogeny. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, **18** (5), 679-791.

Oakley, T. H., Phillips, R. B. (1999). Phylogeny of salmonine fishes based on growth hormone introns: Atlantic (*Salmo*) and Pacific (*Oncorhynchus*) salmon are not sister taxa. *Molecular phylogenetics and evolution*, **11** (3), 381-393.

Ohno, S., Muramoto, J., Klein, J., Atkin, N. B. (1969). Diploid-tetraploid relationship in clupeoid and salmonoid fish. *Chromosomes today*, **2**, 139-147.

Ohno, S. (1970). The enormous diversity in genome sizes of fish as a reflection of nature's extensive experiments with gene duplication. *Transactions of the American Fisheries Society*, **99** (1), 120-130.

O'Reilly, P. T., Hamilton, L. C., McConnell, S. K., Wright, J. M. (1996). Rapid analysis of genetic variation in Atlantic salmon (*Salmo salar*) by PCR multiplexing of dinucleotide and tetranucleotide microsatellites. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **53** (10), 2292-2298.

Osinov, A. G. (1984). Zoogeographical origins of brown trout, *Salmo trutta* (Salmonidae): data from biochemical genetic markers. *Journal of Ichthyology*, **24**, 10-23.

Osinov, A. (1989). Brown trout (*Salmo trutta* L., Salmonidae) in basins of the Black and Caspian Seas: A population genetic analysis. *Genetika*, **24**, 1523-1534..

Pallas, P. S. (1814). *Zoographia rosso-asiatica, sistens omnium animalium in extenso Imperio Rossico et adjacentibus maribus observatorum recensioem, domicilia, mores et descriptiones anatomen atque icones plurimorum*. Vol. 3. Animalia monocardia seu frigidi sanguinis imperii rosso-asiatici recensente P. S. Pallas. Supplendis quirusdam ranarum descriptionibus et locupletavit Guil. Theophil. Tilesius. Petropolis: Academia Scientiarum, pp. 422.

Patarnello, T., Bargelloni, L., Caldara, F., Colombo, L. (1994). Cytochrome b and 16S rRNA sequence variation in the *Salmo trutta* (Salmonidae, Teleostei) species complex. *Molecular phylogenetics and evolution*, **3** (1), 69-74.

Paterson, S., Piertney, S. B., Knox, D., Gilbey, J., Verspoor, E. (2004). Characterization and PCR multiplexing of novel highly variable tetranucleotide Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) microsatellites. *Molecular Ecology Notes*, **4** (2), 160-162.

Peter, A. (1995). Untersuchungen über die Konkurrenz zwischen Bachforellen und Regenbogenforellen. Beispiele aus dem Einzugsgebiet der Bodenseezuflüsse. Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft, Mitteilungen zur Fischerei, **55**, 89-108.

Phillips, R. B., Oakley, T. H. (1997). Phylogenetic relationship among the Salmoninae based on nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Molecular systematics of fishes*. Academic Press, London. pp. 145-162

Phillips, R. B., Matsuoka, M. P., Konon, I., Reed, K. M. (2000). Phylogenetic analysis of mitochondrial and nuclear sequences supports inclusion of *Acantholingua ochridana* in the genus *Salmo*. *Copeia*, **2**, 546-550.

Phillips, R. B., Matsuoka, M. P., Konkol, N. R., McKay, S. (2004). Molecular systematics and evolution of the growth hormone introns in the Salmoninae. In *Genetics of Subpolar Fish and Invertebrates* (pp. 433-440). Springer Netherlands.

Piria, M., Povž, M., Vilizzi, L., Zanella, D., Simonović, P., Copp, G. H. (2016). Risk screening of non-native freshwater fishes in Croatia and Slovenia using the Fish Invasiveness Screening Kit. *Fisheries management and ecology*, **23** (1), 21-31.

Piry, S., Luikart, G., Cornuet, J. M. (1999). BOTTLENECK: a program for detecting recent effective population size reductions from allele data frequencies. *Journal of Heredity*, **90**, 502-503.

Pliberšek, K., Podgornik S. Ihtiološka raziskava Save Bohinjke. *Ribič*, **73** (6): 168-170 (2014).

Poljakov, G. D., Filipi, N. D., Basho, K., Hysenaj, A. (1958). Fishes of Albania. *Tirana: University of Tirana (in Albanian)*. 281 pp.

Popa, G. O., Khalaf, M., Dudu, A., Curtean-Banaduc, A., Banaduc, D., Georgescu, S. E., Costache, M. (2013). Brown trout's populations genetic diversity using mitochondrial markers in relatively similar geographical and ecological conditions-a carpathian case study. *Transylvanian Review of Systematical and Ecological Research*, **15** (2), 125.

Poteaux, C., Beaudou, D., Berrebi, P. (1998). Temporal variations of genetic introgression in stocked brown trout populations. *Journal of Fish Biology*, **53** (4), 701-713.

Povž, M., Šumer, S. (2005). A brief review of non-native freshwater fishes in Slovenia. *Journal of Applied Ichthyology*, **21** (4), 316-318.

Presá, P., Pardo, B. G., Martínez, P., Bernatchez, L. (2002). Phylogeographic congruence between mtDNA and rDNA ITS markers in brown trout. *Molecular Biology and Evolution*, **19** (12), 2161-2175.

Pritchard, J. K., Stephens, M., Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155** (2), 945-959.

Pustovrh, G., Snoj, A., Bajec, S. S. (2014). Molecular phylogeny of *Salmo* of the western Balkans, based upon multiple nuclear loci. *Genetics Selection Evolution*, **46** (1), 1.

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

Rexroad, C. E., Coleman, R. L., Hershberger, W. K., Killefer, J. (2002). Rapid communication: thirty-eight polymorphic microsatellite markers for mapping in rainbow trout. *Journal of Animal Science*, **80** (2), 541-542.

Rexroad, C. E., Rodriguez, M. F., Coulibaly, I., Gharbi, K., Danzmann, R. G., DeKoning, J., ... Palti, Y. (2005). Comparative mapping of expressed sequence tags

containing microsatellites in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BMC genomics*, **6** (1), 54.

Rich, A., Wang, A. H., Nordheim, A. (1983). Chemistry and Biology of Left-Handed Z DNA. *Annual Review of Biochemistry* **53**, 791–846.

Richard, M., Thorpe, R. S. (2001). Can microsatellites be used to infer phylogenies? Evidence from population affinities of the Western Canary Island lizard (*Gallotia galloti*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **20** (3), 351-360.

Robertson, A., Hill, W. G. (1984). Deviations from Hardy-Weinberg proportions: sampling variances and use in estimation of inbreeding coefficients. *Genetics*, **107** (4), 703-718.

Rodić, D., Pavlović, M. (1994). Geografija Jugoslavije I. Savremena administracija. Beograd. 204 pp.

Rounsefell, G. A. (1958). *Anadromy in North American Salmonidae*. US Government Printing Office.

Ryman, N., Allendorf, F. W., Ståhl, G. (1979). Reproductive isolation with little genetic divergence in sympatric populations of brown trout (*Salmo trutta*). *Genetics*, **92** (1), 247-262.

Ryman, N. (1983). Patterns of distribution of biochemical genetic variation in salmonids: differences between species. *Aquaculture*, **33** (1-4), 1-21.

Ryman, N., Jorde, P. E., Laikre, L. (1995). Supportive breeding and variance effective population size. *Conservation biology*, **9** (6), 1619-1628.

Savić Pavićević, D., Matic, G. (2011). Molekularna biologija I. NNK International. Beograd

Schlötterer, C., Tautz, D. (1992). Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic acids research*, **20** (2), 211-215.

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

Schneider, B. (2000). Spawning microhabitat selection by brown trout in the Linthkanal, a mid-sized river. *Journal of Freshwater Ecology*, **15** (2), 181-187.

Segherloo, I. H., Farahmand, H., Abdoli, A., Bernatchez, L., Primmer, C. R., Swatdipong, A., Karami, M., Khalili, B. (2012). Phylogenetic status of brown trout *Salmo trutta* populations in five rivers from the southern Caspian Sea and two inland lake basins, Iran: amorphogenetic approach. *Journal of fish biology* **81** (5): 1479–1500.

Sell, J., Spirkovski, Z. (2004). Mitochondrial DNA differentiation between two forms of trout *Salmo letnica*, endemic to the Balkan Lake Ohrid, reflects their reproductive isolation. *Molecular Ecology*, **13**, 3633–3644.

Serbežov, D., Jorde, P. E., Bernatchez, L., Olsen, E. M., Vøllestad, L. A. (2012). Short-term genetic changes: evaluating effective population size estimates in a comprehensively described brown trout (*Salmo trutta*) population. *Genetics*, **191** (2), 579-592.

Shedlock, A. M., Parker, J. D., Crispin, D. A., Pietsch, T. W., Burmer, G. C. (1992). Evolution of the salmonid mitochondrial control region. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **1**, 179-192.

Shinde, D., Lai, Y., Sun, F., Arnheim, N. (2003). Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis:(CA/GT) n and (A/T) n microsatellites. *Nucleic acids research*, **31** (3), 974-980.

Simonović, P. (2001). Ribe Srbije. NNK, Zavod za zaštitu prirode Srbije i Biološki fakultet, Beograd, 247 pp.

Simonović, P., Nikolić, V., Marić, S. (2003). Srednjeročni program upravljanja na delu ribarskog područja «SRBIJA ISTOK» za period od 2003-2007. godine. Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet. 45 pp.

Simonović, P., Marić, S., Nikolić, V. (2008). Srednjeročni program upravljanja na delu ribarskog područja «SRBIJA ISTOK» za period od 2008-2012. Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet.

Simonović P. (2010). Uvod u ihtiologiju. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu. Beograd. 316 pp.

Simonović, P., Nikolić, V., Tošić, A. (2011). Godišnji program upravljanja na delu ribarskog područja «SRBIJA ISTOK» za period 2011-2012. godine. Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet. 61 pp

Simonović, P., Tošić, A., Škraba, D., Mrdak, D., Grujić, S., Nikolić, V. (2014). Effects of stocking with brood fish to manage resident stream dwelling brown trout *Salmo cf. trutta* L. stock. *Journal of Fisheries Sciences. com*, **8** (2), 139.

Simonović, P., Vidovic, Z., Tošić, A., Škraba, D., Čanak-Atlagić, J., Nikolić, V. (2015). Risks to stocks of native trout of the genus *Salmo* (Actinopterygii: Salmoniformes: Salmonidae) of Serbia and management for their recovery. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, **45** (2), 161.

Slettan, A., Olsaker, I., Lie, Ø., (1995). Atlantic salmon, *Salmo salar*, microsatellites at the SSOSL25, SSOSL85, SSOSL311, SSOSL417 loci. *Animal Genetic*, **26**, 281–282.

Snoj, A., Jug, T., Melkić, E., Susnik, S., Pohar, J., Dovc, P., ... Budihna, N. (2000). Mitochondrial and microsatellite DNA analysis of marble trout in Slovenia. *Journal of Freshwater Biology. Quaderni ETP*, **29**, 5-11.

Snoj, A., Melkić, E., Sušnik, S., Muhamedagić, S., Dovč, P. (2002). DNA phylogeny supports revised classification of *Salmothymus obtusirostris*. *Biological Journal of the Linnean Society*, **77**, 399-411.

Snoj, A. (2004). Filogenetska struktura postrvi (*Salmo trutta* L.) v Sloveniji. *Ribič, Glasilo Slovenskog ribištva. Ribiška sveza Slovenije*, **10**, 239-243.;

- Sømme, I. D. (1941). *Ørretboka. Jakob Dybwads Forlag, Oslo.*
- Stanisavljević, B., Ćosić, N., Jelić, I. (2012). Vodič kroz biološku i kulturnu raznovrsnost NP „Đerdap“. Ekološko društvo Endemit. Beograd. pp. 180.
- Stanković, S. (2002). The Djerdap National Park–The Polyfunctional Center of the Danube Basin. *Geographica Pannonica*, **6**, 38-44.
- Stanković, D., Crivelli, A. J., Snoj, A. (2015). Rainbow trout in Europe: introduction, naturalization, and impacts. *Rev. Fisher. Sci. Aquacult.*, **23**, 39–71.
- Stearley, R. F., Smith, G. R. (1993). Phylogeny of the Pacific trouts and salmon (*Oncorhynchus*) and genera of the family Salmonidae. Transactions of the American Fisheries Society, **122**, 122 - 133.
- StatSoft, I. N. C. (2001). STATISTICA (data analysis software system), version 6. *Tulsa, USA, 150.*
- Stefanović, D. (1948). Rasna i ekološka ispitivanja na ohridskim salmonidima. Posebna izdanja SAN, knj. 38, Beograd.
- Steindachner, F. (1892). *Über einige neue und seltene Fischarten* usw. Denkschriften der Akademie der Wissenschaften Wien, Mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse. *Abteilung* **59**: 357–384.
- Steingrímsson, S. Ó., Gíslason, G. M. (2002). Body size, diet and growth of landlocked brown trout, *Salmo trutta*, in the subarctic River Laxá, North-East Iceland. *Environmental Biology of Fishes*, **63** (4), 417-426.
- Stojković, B., Tucić, N. (2012). Evolucionarna genetika čoveka. Elektronsko izdanje. 149 pp
- Streelman, J. T., Kocher, T. D. (2002). Microsatellite variation associated with prolactin expression and growth of salt-challenged tilapia. *Physiological genomics*, **9** (1), 1-4.

Suárez J., Bautista J. M., Almodóvar A., Machordom A. (2001). Evolution of mitochondrial control region in Palaearctic brown trout (*Salmo trutta*) populations: the biogeographical role of the Iberian Peninsula. *Heredity*, 87: 198-206. Sušnik, S., Schöffman, J., Snoj, A. 2004. Phylogenetic position of *Salmo (Platisalmo) platicephalus* Behnke 1968 from south – central Turkey, evidenced by genetic data. *Journal of Fish Biology*, **64**, 947-960.

Sušnik, S., Snoj A., Wilson, I., F., Mrdak, D., Weiss, S. (2007). Historical demography of brown trout (*Salmo trutta*) in the Adriatic drainage including the putative *S. letnica* endemic to Lake Ohrid. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, **44**, 63-76.

Svärdsson, G. (1945). Chromosome studies on Salmonidae. *Rep.Inst. Freshw. Res. Drottningholm* **23**, 1–151.

Sægrov, H., Hindar, K., Urdal, K. (1996). Natural reproduction of anadromous rainbow trout in Norway. *Journal of fish biology*, **48** (2), 292-294.

Taggart, J. B., Ferguson, A. (1986). Electrophoretic evaluation of a supplemental stocking programme for brown trout, *Salmo trutta* L. *Aquaculture Research*, **17** (2), 155-162.

Taler, Z. (1950). Koji salmonidi žive u Jugoslaviji i koji se uzgajaju. *Ribarstvo Jugoslavije*. **5** (3-4): 58 – 60.

Tošić, A., Nikolić, V., Mrdak, D., Simonović, P. (2014). New mitochondrial DNA haplotype of brown trout *Salmo trutta* L. from Crni Timok drainage area in Serbia. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **14** (1): 37-42.

Tošić, A., Škraba, D., Nikolić, V., Atlagić, J. Č., Mrdak, D., Simonović, P. (2016). Haplotype diversity of brown trout *Salmo trutta* (L.) in the broader Iron Gate area. *Turkish Journal of Zoology*, **40**.

Tóth, G., Gáspári, Z., Jurka, J. (2000). Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome research*, **10** (7), 967-981.

Tucić, N. (2003). Evolucionarna biologija. *II dopunjeno i promenjeno izdanje*. NNK International, Beograd.

Turan, D., Kottelat, M., Bektas, Y. (2011). *Salmo tigridis*, a new species of trout from the Tigris River, Turkey (Teleostei: Salmonidae). *Zootaxa*, **2993**, 23-33.

Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P., Shipley, P. (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, **4** (3), 535-538.

Vera, M., Cortey, M., Sanz, N., García-Marín, J. L. (2010a). Maintenance of an endemic lineage of brown trout (*Salmo trutta*) within the Duero river basin. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, **48** (2), 181-187.

Vera, M., Sanz, N., Hansen, M. M., Almodóvar, A., García-Marín, J. L. (2010b). Population and family structure of brown trout, *Salmo trutta*, in a Mediterranean stream. *Marine and Freshwater Research*, **61** (6), 672-681.

Vladykov, V. D. (1963). A review of salmonid genera and their broad geographical distribution. *Transaction of the Royal Society of Canada, Series IV, Section III*, **1**, 459-504.

Hoeh, W. R., Blakley, H., Wesley, M. (1991). Heteroplasmy suggests limited biparental inheritance of *Mytilus* mitochondrial DNA. *Science* **251**, 1488-1490.

Wan, Q. H., Wu, H., Fujihara, T., Fang, S. G. (2004). Which genetic marker for which conservation genetics issue? *Electrophoresis*, **25** (14), 2165-2176.

Weber, J. L. (1990). Informativeness of human (dC-dA) n-(dG-dT) n polymorphisms. *Genomics*, **7** (4), 524-530.

Weir, B. S., Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *evolution*, 1358-1370.

Weiss, S., Schlötterer, C., Waidbacher, H., Jungwirth, M. (2001). Haplotype (mtDNA) diversity of brown trout *Salmo trutta* in tributaries of the Austrian Danube:

massive introgression of Atlantic basin fish—by man or nature?. *Molecular Ecology*, **10** (5), 1241-1246.

WenHsiung, L. (1997). *Molecular evolution*. Sinauer Associates Incorporated. Sunderland, MA, pp. 177–213.

Wilson, M. V. H. (1977). Middle eocene freshwater fishes from British Columbia. *Life Sciences Contributions of the Royal Ontario Museum* **113**, 1–61.

Woese, C. R., Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **74** (11), 5088-5090.

Wootton, R. J., Elvira, B., Baker, J. A. (2000). Life-history evolution, biology and conservation of stream fish: introductory note. *Ecology of Freshwater Fish*, **9** (1), 90-91.

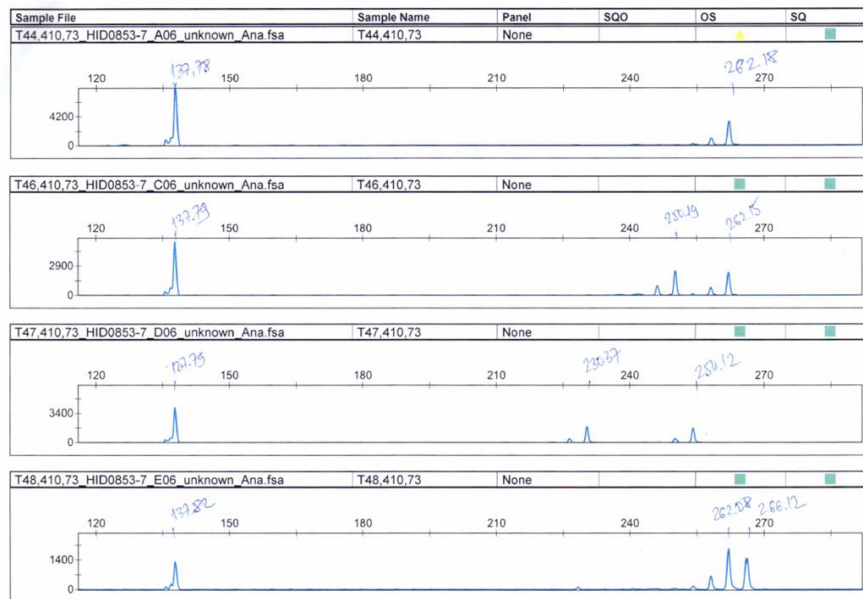
Wright, S. (1950). Genetical structure of populations. *Nature*, **166**, 247-49.

Zardoya, R., Garrido-Pertierra, A., Bautista, J. M. (1995). The complete nucleotide sequence of the mitochondrial DNA genome of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Molecular Evolution*, **41** (6), 942-951.

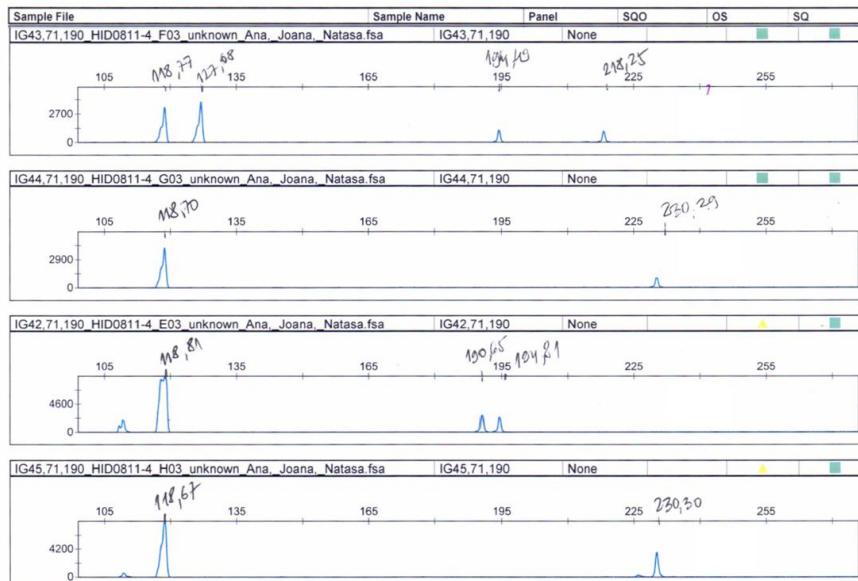
Zhang, D. X., Hewitt, G. M. (2003). Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular ecology*, **12** (3), 563-584.

7. Prilozi

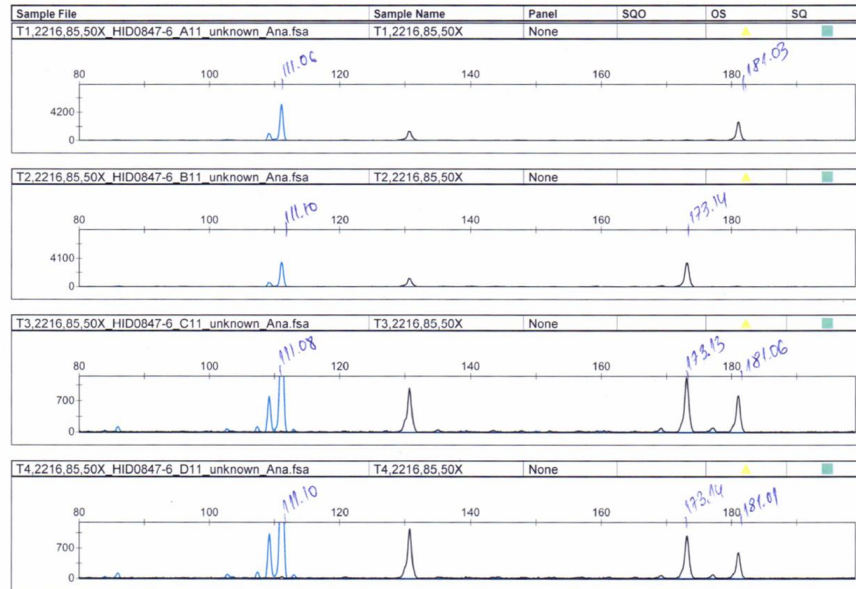
Prilog 1. Hromatogram prve dupleks reakcije



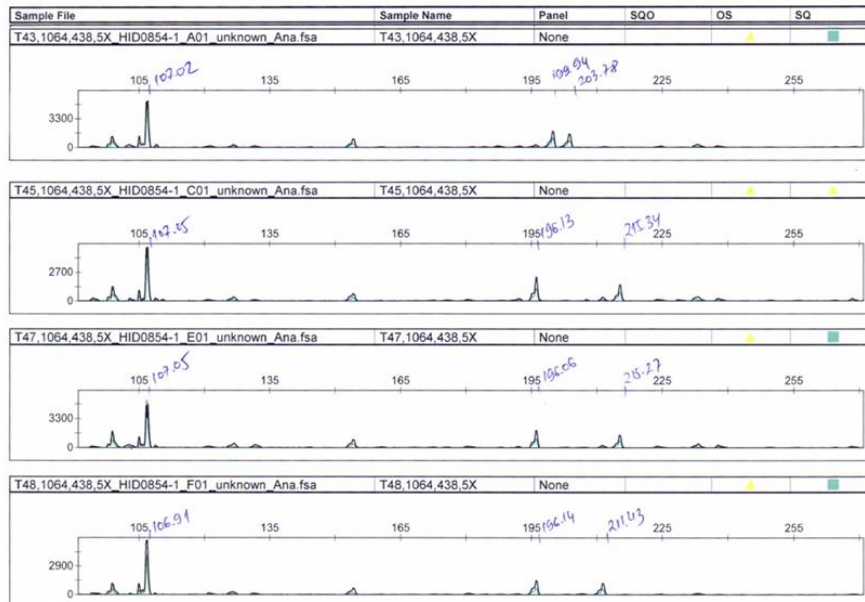
Prilog 2. Hromatogram druge dupleks reakcije



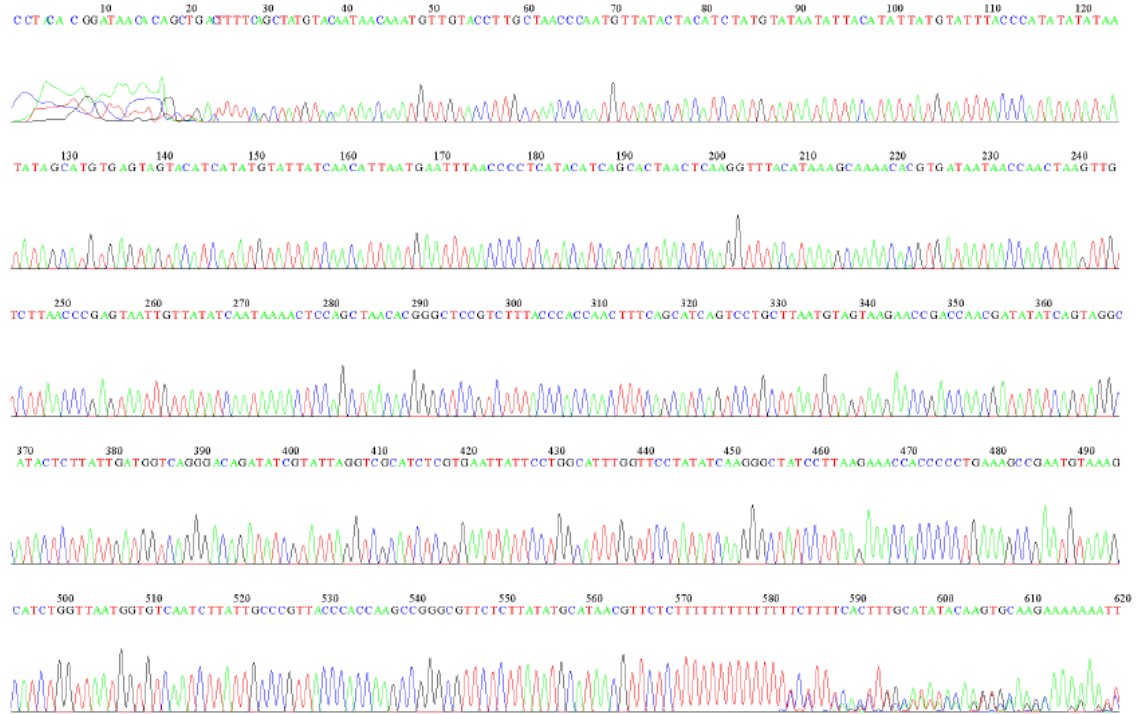
Prilog 3. Hromatogram treće dupleks reakcije



Prilog 4. Hromatogram četvrte dupleks reakcije



Prilog 5. Hromatogram sekvence CR mtDNK (560 bp) haplotipa Da23c



Biografija autora

Ana D. Tošić rođena je 10. januara 1985. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu školu i Treću beogradsku gimnaziju sa odličnim uspehom. Godine 2003. upisuje Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, smer Ekologija i zaštita životne sredine. Diplomirala je 2010. godine sa prosečnom ocenom 8.94, a diplomski rad pod naslovom “Amazonska vrsta *Pterygoplichthys pardalis* (Castelnau, 1855) (Loricariidae, Siluriformes), otkrivena u srpskom delu reke Dunav” odbranila je sa ocenom 10. Iste godine upisuje doktorske studije na Biološkom fakultetu na smeru Morfologija, sistematika i filogenija životinja.

U junu 2010. godine zasniva radni odnos na Katedri za morfologiju, sistematiku i filogeniju životinja na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu i stiče zvanje istraživač-pripravnik, dok u novembru 2011. biva izabrana u zvanje istraživač-saradnik. Od zasnivanja radnog odnosa do danas učestvuje u izvođenju nastave na predmetu Uvod u ihtiologiju, a od 2014. i na predmetu Zoologija kičmenjaka na osnovnim studijama. Učestvovala je u realizaciji dva nacionalna projekta Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj (br. 143040) odnosno Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja (br. 173025) i dva međunarodna projekta pod nazivom: “GLOBAQUA (Managing the Effects of Multiple Stressors on Aquatic Ecosystems Under Water Scarcity)” i “Inventarizacija lipljena i pastrmke u Bosni i Hercegovini i Republici Srbiji”. U toku svog istraživačkog rada objavila je 12 naučnih radova i osam saopštenja sa naučnih skupova.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана Ана Д. Тошић

Број индекса Б3013/2010

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Филогеографски статус и генетичка структура популација комплекса
поточне пастрмке (*Salmo cf. trutta*) Ђердапа и Тимочке крајине**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 9.10.2016.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ана Д. Тошић
Број индекса Б3013/2010
Студијски програм Морфологија, систематика и филогенија животиња
Наслов рада **Филогеографски статус и генетичка структура
популација комплекса поточне пастрмке (*Salmo cf. trutta*) Ђердапа и
Тимочке крајине**
Ментор професор др Предраг Симоновић
Потписани Ана Тошић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла да буде похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 9.10.2016.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**Филогеографски статус и генетичка структура популација комплекса
поточне пастрмке (*Salmo cf. trutta*) Ђердапа и Тимочке крајине**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис аутора

У Београду, 9.10.2016.

