Stanje i filogenetska analiza populacije lipljena (Thymallus thymallus) na području N.P. "Risnjak"

Marušić, Daria

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:521838

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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



Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

STANJE I FILOGENETSKA ANALIZA POPULACIJE LIPLJENA (*THYMALLUS THYMALLUS*) NA PODRUČJU N.P.“RISNJAK“

DIPLOMSKI RAD

Daria Marušić

Zagreb, 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:
Ribarstvo i lovstvo

STANJE I FILOGENETSKA ANALIZA POPULACIJE LIPLJENA (*THYMALLUS THYMALLUS*) NA PODRUČJU N.P.“RISNJAK“

DIPLOMSKI RAD

Daria Marušić

Mentor: Izv.prof.dr.sc. Tea Tomljanović

Zagreb, 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Daria Marušić**, JMBAG 0178074546, rođen/a 31.03.1991. u Rijeci, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

Stanje i filogenetska analiza populacije lipljena (*Thymallus thymallus*) na području N.P.“Risnjak“

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____ _____

Potpis studenta / studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice **Darie Marušić** , JMBAG **0178074546**, naslova

STANJE I FILOGENETSKA ANALIZA POPULACIJE LIPLJENA (*THYMALLUS THYMALLUS*) NA PODRUČJU N.P.“RISNJAK“

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo: potpisi:

1. Izv.prof. dr.sc. Tea Tomljanović mentor _____
2. Prof.dr.sc. Marina Piria član _____
3. Doc. dr.sc. Daniel Matulić član _____

Sažetak

Ovaj rad pod nazivom „Stanje i filogenetska analiza populacije lipljena (*Thymallus thymallus*) na području N.P.Risnjak“ opisuje i analizira filogenetsko mjesto populacije lipljena gornjeg toka rijeke Kupe u području N.P.“Risnjak“. Podaci obrađeni u ovom radu su prikupljeni dana 29. listopada 2014. godine na dvije lokacije rijeke Kupe, Kupari i Ušće, te su obrađeni i prikupljeni uzorci peraja lipljena na terenu i laboratoriju Zavoda za ribarstvo, pčelarstvo, lovstvo i specijalnu zoologiju Agronomskog fakulteta u Zagrebu. Utvrđeni su pripadajući haplotipovi lipljena usporedbom svih dobivenih sekvenci DNK lanaca duljine 1089 bp. Analizirani uzorci na ovom području svrstavaju se u četiri različita haplotipa (Da25cs, Da27cs, Thy1, Thy2) koji su uspoređeni sa bazom podataka GenBank. Stanje populacije lipljena u gornjem toku rijeke Kupe pokazuje kako područje ima optimalne uvjete za njegov rast i razvoj. Od ukupno 52 primjerka koja su uzorkovana, lipljen dominira sa 43 jedinke, što je dobar indikator čistoće i kvalitete rijeke Kupe (osjetljiv je na onečišćenje voda).

Ključne riječi: lipljen, N.P.Risnjak, haplotip, GenBank, filogenija

Abstract

Graduate thesis under topic „The status and phylogenetic analysis of grayling (*Thymallus thymallus*) population in National park „Risnjak““ describes and analyzes phylogenetic place of grayling population in the upper flow of Kupa river in National park „Risnjak“. The data was collected on 29th October 2014 on two locations of river Kupa (Kupari and Ušće). Collected data (weight (W), length (TL)) and grayling fin samples were processed on the field and in laboratory of the Department of Fishery, Beekeeping, Hunting and Special Zoology of Faculty of Agriculture in Zagreb. By combining all gathered data of sequenced DNA chains with the length of 1089 bp it was established four haplothypes of grayling for this area (Da25cs, Da27cs, Thy1, Thy2). Analyzed haplotypes were compared with GenBank database. Population state of grayling in upper flow of Kupa river shows that this territory has optimal conditions for their growth and development. Out of the 52 caught samples, grayling dominates with the number of 43 samples.

Key words: grayling, N.P.Risnjak, haplotype, GenBank, phylogeny

Sadržaj

1 Uvod ... 1
2 Nacionalni park Risnjak ... 2
2.1 Biološka raznolikost N.P.“Risnjak“ ... 3
2.2 Lipljen (*Thymallus thymallus*) ... 4
2.3 Morfologija i biologija ... 4
2.4 Rasprostranjenost ... 5
3 Materijali i metode ... 7
3.1 Izolacija DNK molekule ... 8
3.2 Provjera uspješnosti izolacije DNK ... 8
3.3 Lančana reakcija polimerazom (PCR) ... 9
3.4 Pročišćavanje PCR-produkata ... 9
3.5 Određivanje primarne strukture DNK (sekvenciranje) ... 10
4 Rezultati i rasprava ... 11
4.1 Provjera uspješnosti izolacije DNK ... 13
4.2 Provjera PCR-produkata ... 14
4.3 Sekvenciranje DNK lanaca ... 15
5 Zaključak ... 17
6 Literatura ... 18

1 Uvod

Područje jadranskog sliva je svjetski poznato kao prostor bogat endemskim vrstama riba (Vuković i Ivanović, 1971; Economidis i Banarescu, 1991; Kottelat i Freyhof, 2007), koje čine izrazito vrijedan i važan dio europske kao i svjetske bioraznolikosti, među kojima su pripadnici Thymallidae (lipljeni).

Mitohondrijska DNK (mtDNK) je izuzetno vrijedan genetski marker u populacijskoj i evolucijskoj biologiji. Razlog tome je, što je relativno lako izolirati čiste homologne sekvence, budući da je prisutna sa velikim brojem kopija – do 1000 po stanici. Jednostavna organizacija, materinsko nasljeđivanje i odsutnost rekombinacija uz visoki stupanj mutacija, čine mtDNK idealnim markerom za istraživanje strukture populacija, kao i za proučavanje evolucije, uključujući migracije, introdukcije i „uska grla“ populacija. Pri promatranju strukture neke populacije, mtDNK je vrlo korisna, bilo da se radi o razlikama između različitih vrsta (interspecifična divergenca) ili unutar pojedine vrste (intraspecifična divergenca). MtDNK kao molekularnim markerom moguće je razlučiti strukturu populacije i pratiti intraspecifične varijacije pojedinih, geografski odvojenih populacija.

2 Nacionalni park Risnjak

Nacionalni park Risnjak dobio je ime po životinji risu (*Lynx lynx*), a nacionalnim parkom je proglašen 1953. godine, na prijedlog botaničara Ive Horvata i danas se prostire na 6350 hektara. Smješten je na sjeverozapadu Republike Hrvatske u Primorsko-goranskoj županiji uz granicu sa Slovenijom, te geografski obuhvaća šumovito područje Gorskog Kotara. Nalazi se u blizini Jadranskog mora, otprilike 15 km sjeveroistočno od grada Rijeke, te osim središnjeg dijela masiva Risnjaka, obuhvaća i planinski masiv Snježnika, te izvor rijeke Kupe s njezinim gornjim tokom, koji od 1963. godine ima status zaštićenog područja (https://www.parkovihrvatske.hr/nacionalni-park-risnjak).

Područje Nacionalnog parka Risnjak pripada dinarskom planinskom sustavu i predstavlja vezu između Alpa i dinarskih planina. Velika migracija alpskih, arktičkih i sjeverno-europskih vrsta prema jugoistoku Europe koja se dogodila nakon ledenog doba, prešla je preko planina Risnjak i Snježnik i rezultirala različitom vegetacijom ovog područja od one koja se može naći u okolici. Raznolikost klimatskih, geoloških, petrografskih i ostalih čimbenika imala je za posljedicu raznoliku floru i faunu, kao i blizina Jadranskog mora koja je razlog pojave temperaturne inverzije (te se iste vrste flore i vegetacije nalaze i uz planinske vrhove i u dolinama Nacionalnog Parka).

Bitniji dio Nacionalnog parka nalazi se na vapnenačkoj i dolomitnoj geološkoj podlozi s izraženim krškim obilježjima, zbog čega u tom području ima tek nekoliko povremenih izvora, te samo tri stalna oko planinske livade Leske koji tvore mali potok, koji ponire u podzemlje i ponovno izvire na samom izvoru rijeke Kupe u sjevero-istočnom dijelu Nacionalnog parka, te predstavlja glavno hidrološko obilježje područja (http://np-risnjak.hr/wp-content/uploads/2009/08/Np-Risnjak-HR-lowres-mapa.pdf).



Slika 1: Položaj N.p. „Risnjak“ (Izvor: www.parkovihrvatske.hr/nacionalni-park-risnjak)

2.1 Biološka raznolikost N.P.“Risnjak“

Na malom prostoru Nacionalnog parka postoji više od 30 različitih biljnih zajednica, od kojih su 14 šumske zajednice, što je posljedica spajanja različitih vegetacijskih zajednica s obalnog, kontinentalnog, alpskog i dinarskog područja. Raznolikost same flore ujedno pospješuje i različitost životinjskih vrsta koje obitavaju na području Nacionalnog parka, kao što je smeđi medvjed, vuk, te ris po kojem je prostor i dobio ime. Brojne su i ostale skupine životinja, kao što su ptice, gmazovi, kukci, od kojih su iznimno važni leptiri (zbog njihove brojnosti dolinu rijeke Kupe ponekad nazivaju i „Dolina leptira“), dok u samoj rijeci Kupi nema velike raznolikosti, ali u njoj obitavaju neke specifične riblje vrste (http://np-risnjak.hr/wp-content/uploads/2009/08/Np-Risnjak-HR-lowres-mapa.pdf).

A to su:

- u salmonidnom gornjem dijelu: potočna i kalifornijska pastrva, lipljen i mladica
- u srednjem toku: podust, mrena, klen, plotica i mladica
- donjem toku: šaran, som, štuka, grgeč, deverika, jez, te ostale ciprinidne vrste nizinskih voda dunavskog sliva (http://ribolovni-savez.hr/ribolovne-vode/kupa/).

2.2 Lipljen (Thymallus thymallus)

Taksonomski položaj lipljena:

Razred: Actinopterygii (zrakoperke)

Nadred: Teleostei (prave koštunjače)

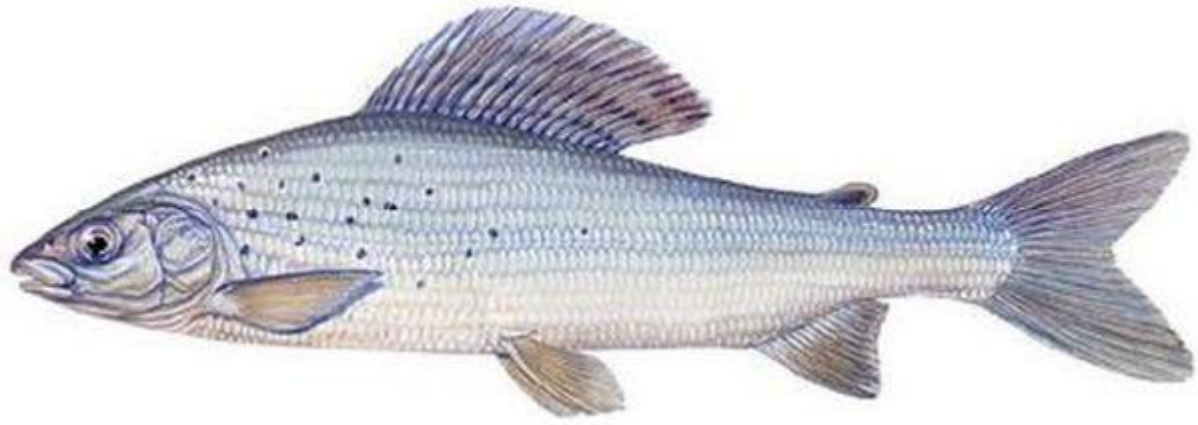
Red: Salmoniformes (pastrvke)

Porodica: Thymallidae (lipljeni)

2.3 Morfologija i biologija

Lipljen (*Thymallus thymallus*, Linnaeus 1758) ima malu, šiljatu glavu, mala usta s kukastim zubima. Leđna peraja je dugačka, svjetloljubičasta s 3 – 4 niza tamnih pjega. Leđa su sivosmeđa, najčešće pokrivena tamnim pjegama, dok su bokovi srebrnobijeli ili svijetložuti, a trbuh je bijeli (Slika 2).

Na području Hrvatske lipljen je kratkoživuća riblja vrsta, obično doživi dob od 5 do 8 godina i naraste od 25 do 50 cm, težine od 1,5 kg, dok je najveća zabilježena totalna dužina lipljena 60 cm, a masa 6,7 kg (Šprem i sur, 2005).



Slika 2: Lipljen (http://www.usrvitez.ba/index.php/ribolov-zona/ribe/item/137-lipljen)

Lipljen najčešće dijeli stanište sa potočnom pastrvom (*Salmo trutta*) i nastanjuje tzv. pastrvske vode, brze, čiste i hladne rijeke u manjim jatima. (http://www.ribolovci.rs/ribe/lipljen-lipen-lipljan-lipan.html)

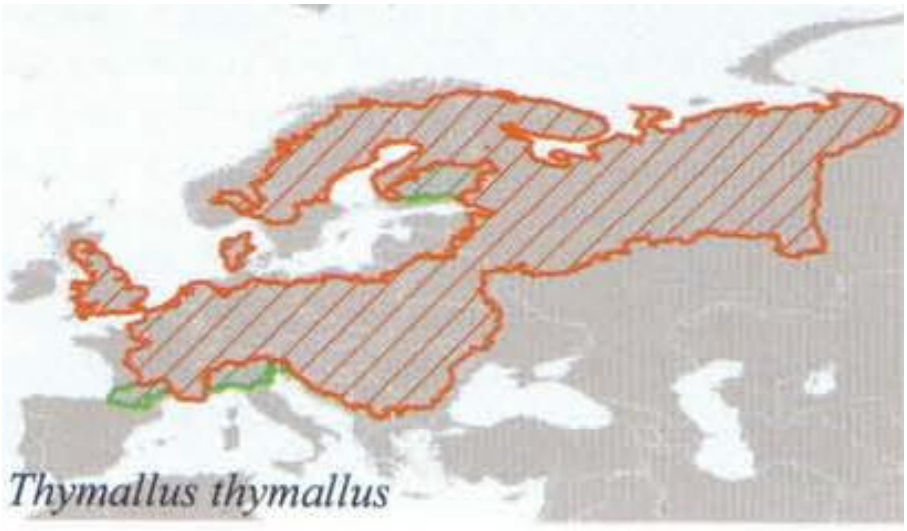
Vrijeme mrijesta lipljena počinje u proljeće, sredinom travnja, kad dosegnu spolnu zrelost u dobi od 2 – 3 godine za mužjaka, odnosno 3 – 5 za ženku, što ovisi o vodenom sustavu u kojem obitava (toplije temperature vode potiču raniju spolnu zrelost, dok hladnije temperature produžuju spolno sazrijevanje). Samo mjesto mriješćenja lipljen pažljivo bira. To je mjesto dubine do 50 cm, gdje strujanje vode nije prebrzo i ima zaklona, a dno je prekriveno pijeskom. Mužjaci agresivno čuvaju odabrana mjesta za mrijest od drugih mužjaka, dok ženke biraju najpogodnijeg partnera za oplodnju jajašca (http://www.musicar.rs/lipljan-prikaz-vrste/).

Populacija lipljena u autohtonom staništu ima fundamentalni, kao i aplikativni značaj, napose jer je riječ o ribljoj vrsti s velikom ekonomskom i športsko-ribolovnom važnošću, pogotovo jer je osjetljiva na razne negativne utjecaje, kao što su pretjerani ribolov, onečišćenje vode, promjene u staništu (regulacija, pregrađivanje vodotoka), te unošenje drugih vrsta riba koje konkuriraju lipljenu (Šprem i sur, 2005).

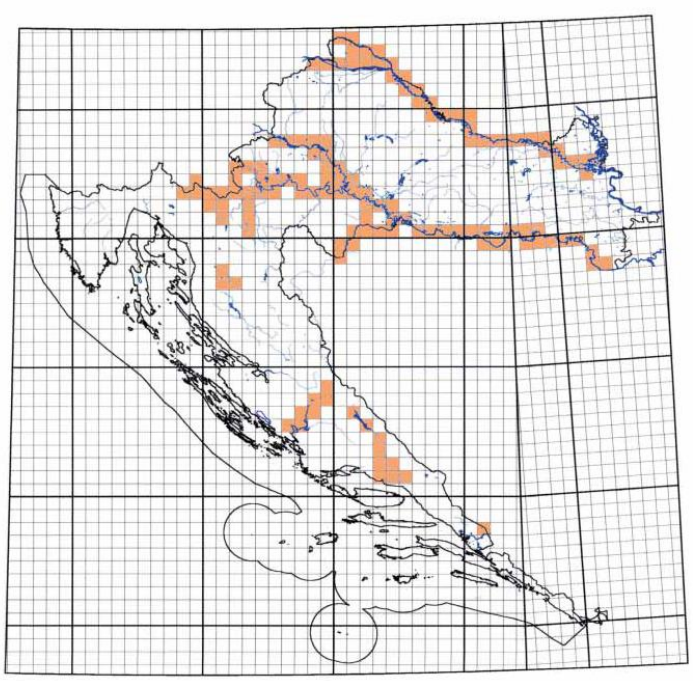
Lipljen (*Thymallus thymallus,* Lennaeus 1758) je osjetljiva (VU) u dunavskom slijevu, dok se u jadranskom slijevu ne smatra ugroženom, te je međunarodno zaštićena (Bernskom konvencijom, Europskom direktivom o zaštiti staništa). Uzroci ugroženosti: lipljen je vrlo osjetljiv na onečišćenje vode. Ugrožava ga regulacija i pregrađivanje vodotoka, onečišćenje, prekomjeran izlov te unos alohtonih vrsta (Mrakovčić i sur, 2006).

2.4 Rasprostranjenost

Lipljen naseljava vodotoke u Velikoj Britaniji, Irskoj, južnoj Skandinaviji, rijeke koje utječu u Sjeverno more, pritoke rijeke Volge, a ima ga i u jugozapadnoj Europi, Francuskoj, Njemačkoj, sjevernoj Italiji i u porječju Dunava. U Hrvatskoj živi u rijekama Savi, Kupi, Uni, Dravi, Muri, Cetini i Neretvi, a postoje podaci da je nađen i u Krki (Šprem i sur, 2005).



Slika 3: Područje obitavanja lipljena (Izvor: Kottelat i Freyhof, 2007)



Slika 4: Područje obitavanja lipljena u Hrvatskoj (Izvor: Mrakovčić i sur, 2006)

3 Materijali i metode

Uzorkovanje ihtiofaune su proveli djelatnici Zavoda za ribarstvo, pčelarstvo, lovstvo i specijalnu zoologiju Agronomskog fakulteta u Zagrebu, koje je obavljeno 29.10.2014. godine i obrađene su dvije lokacije na rijeci Kupi na području Nacionalnog parka, Kupari (L1) i Ušće (L2), a prikupljeni su uzorci peraja lipljena za DNK analize. Nakon mjerenja ribe su žive vraćene u rijeku Kupu.



Slika 5: Lokacija uzorkovanja na rijeci Kupi

Ribe su lovljene elektroagregatom Agronomskog fakulteta, i obuhvaćeno je oko 200 m na svakoj lokaciji, te su izmjerene mase, dužina, spol i odrezan je komadić podrepne peraje svakoj jedinki, koji je pohranjen u 96%-tnom etanolu, u prethodno pripremljenim, zasebnim epicama.



Slika 6: lovljenje elektroagregatom na rijeci Kupi

3.1 Izolacija DNK molekule

DNK molekula izolirana je s Qiagen DNeasy Bloodand & tissue kompletom kemikalija. Izolacija je izvršena prema uputama proizvođača (Qiagen GmbH Germany). Za izdvajanje DNK kompletima uzeto je oko 25 mg tkiva. Izolirana DNK pohranjena je na 4 °C. Izolirani uzorci označeni su brojevima: 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 24, 25, 26, 31, 32, 33, 34, 36, 38, 39, 40, 42 i 43.

3.2 Provjera uspješnosti izolacije DNK

Kvaliteta dobivene DNK provjerena je elektroforezom u gelu agaroze. Agarozni gel od 1,5 % pripreman je zagrijavanjem agaroze u TBE puferu. Nakon hlađenja do približno 37 °C dodao se etidijev bromid (konačna koncentracija EtBr u gelu agaroze je 10 mg/ml) te se u prije pripremljen kalup s češljićima za jažice (za nanošenje uzoraka) izlio gel i ostavio na sobnoj temperaturi oko 30 minuta da se hlađenjem skrutnjava.

Gel agaroze se stavio u kadicu za elektroforezu (Sub-cell, GT, BIORAD) napunjenu s TBE puferom, i u jažice se nanijelo 10 µl (100 ng DNK) uzorka koji se prethodno pomiješao s 2 µl pufera za nanošenje uzorka (boja bromfenol plava) na parafilmu. U jednu od jažica dodalo se 2 µl standarda za određivanje dužine odsječka DNK, a u drugu pufer za eluciju uzoraka kao negativna kontrola, zatim u slijedeću pozitivna kontrola prethodno izdvojene DNK poznate koncentracije i odgovarajuće kvalitete.

Elektroforeza se obavljala pod naponom od 60 V u trajanju od 45 minuta. Razdvojena DNK u gelu agaroze vizualizirana je izlaganjem UV svjetlu na transiluminatoru (Uvitec) svjetlom valne dužine 302 nm (Slika 4).

3.3 Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Za lančanu reakciju polimerazom, koristile su se početnice LRBT-25 i LRBT-1195 (Uiblin i sur, 2001) s kojima je umnožen gen mtDNK na duljine 1089 bp. Reakcija se odvijala u tri stupnja na različitim temperaturama. U prvom stupnju pri visokoj temperaturi došlo je do denaturacije dvolančane molekule DNK. Pri snižavanju temperature začetni nukleotidi su prilegli uz komplementarna mjesta na molekuli, a uz prisustvo enzima polimeraze došlo je do sinteze komplementarnog lanca DNK.

Reakcija umnažanja izvođena je u ukupnom volumenu od 25 µl. U svaku reakcijsku smjesu se dodalo oko 100 ng DNK. Reakcija se odvijala u uređaju za lančanu reakciju polimerazom Mastercycler personal (Eppendorf), a umnažanje odsječaka odvijalo se u 32 ciklusa.

3.4 Pročišćavanje PCR-produkata

Uklanjanje početnica, nukleotida, enzima PCR-produkata i ostalih nečistoća iz smjese obavljeno je komercijalno dostupnim kompletom QIA quick PCR Purification Kit (Qiagen) prema uputama proizvođača.

3.5 Određivanje primarne strukture DNK (sekvenciranje)

Uzorci za sekvenciranje pripremljeni su s kompletom Big Dye Terminator Ready Reaction Mix (Applied Biosystems) prema uputama proizvođača. Reakcija sekvenciranja oba lanca 5' kraja kontrolne regije mtDNK se odvijala na ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystem) DNK sekvenatoru koristeći prethodno navedene početnice. Za analizu odsječaka korišten je kompjuterski program CLC Sequence viewer 7.

Sravnjivanje sekvenci izrađeno je u programu Bio Edit Sequence Aligment Editor, verzija 7.0.9.0. (6/27/07) (Hall, 1999) uz vizualnu provjeru. Utvrđeni haplotipovi analiziranih uzoraka DNK uspoređeni su sa haplotipovima iz baze podataka GenBank. Programom BLAST određivala se razlika unutar samih haplotipova.

4 Rezultati i rasprava

Uzorkovanjem na dvije lokacije rijeke Kupe (Kupari (L1) i Ušće (L2)) unutar Nacionalnog parka „Risnjak“ ulovljeno je sveukupno 52 jedinke, od toga je 43 lipljena (*Thymallus thymallus*), 8 potočnih pastrva (*Salmo trutta*) i 1 peš (*Cottus gobio*) (Tablica 1).

Na lokaciji L1 (Kupari) ulovljeno i uzorkovano je 23 jedinke, od toga 18 lipljena, 4 potočne pastrve i jedan peš (mase 16,23 g i totalne dužine 10.5 cm).

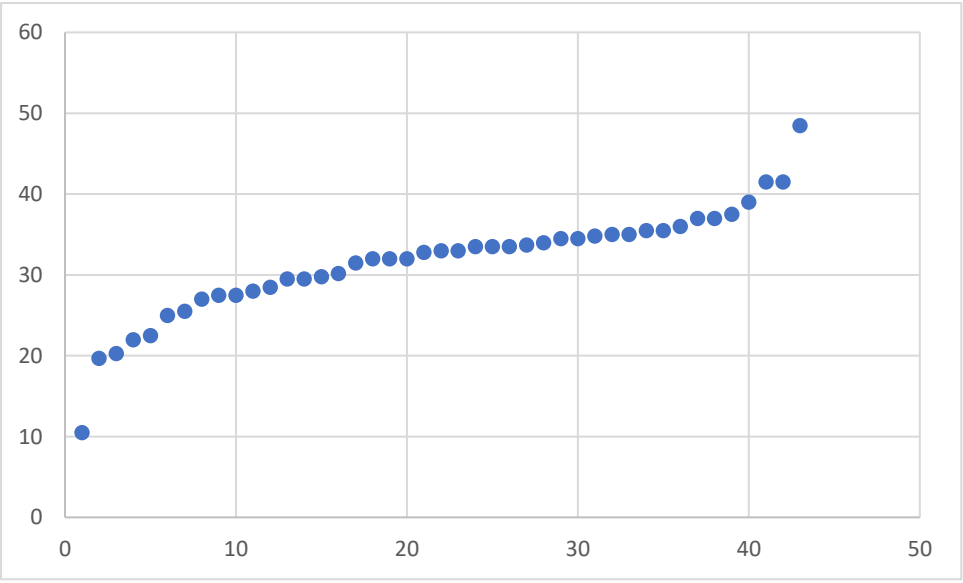
Na lokaciji L2 (Ušće) sveukupno je ulovljeno i uzorkovano 29 jedinki, od toga 25 lipljena i 4 potočne pastrve.

Tablica 1: Prikupljeni uzorci riba, njihove pripadajuće mase, dužine i spol

Datum	DNK oznaka na eppendorf tubici	Lokacija	Vrsta	w	TL	Spol
29.10.2014.	1	Kupari (L1)	lipljen	410	48,5	
29.10.2014.	2	Kupari (L1)	lipljen	152,8	27,5	
29.10.2014.	3	Kupari (L1)	lipljen	288,7	35,5	
29.10.2014.	4	Kupari (L1)	lipljen	344,8	39	
29.10.2014.	5	Kupari (L1)	lipljen	274,8	32	M
29.10.2014.	6	Kupari (L1)	lipljen	274,54	32	M
29.10.2014.		Kupari (L1)	Cottus gobio	16,23	10,5	
29.10.2014.		Kupari (L1)	Salmo trutta	19,4	13,5	
29.10.2014.		Kupari (L1)	Salmo trutta	3,85	9,1	
29.10.2014.		Kupari (L1)	Salmo trutta	103,89	21	
29.10.2014.		Kupari (L1)	Salmo trutta	10,67	10	
29.10.2014.	7	Kupari (L1)	lipljen		41,5	F
29.10.2014.	8	Kupari (L1)	lipljen	463	37	
29.10.2014.	9	Kupari (L1)	lipljen	116	25	
29.10.2014.	10	Kupari (L1)	lipljen	255	31,5	
29.10.2014.	11	Kupari (L1)	lipljen		34	
29.10.2014.	12	Kupari (L1)	lipljen		41,5	M
29.10.2014.	13	Kupari (L1)	lipljen		32,8	F
29.10.2014.	14	Kupari (L1)	lipljen	330	35	F
29.10.2014.	15	Kupari (L1)	lipljen		33	M
29.10.2014.	16	Kupari (L1)	lipljen		35	F
29.10.2014.	17	Kupari (L1)	lipljen		34,8	F
29.10.2014.	18	Kupari (L1)	lipljen		35,5	F
29.10.2014.	19	Ušće (L2)	lipljen		27,5	F
29.10.2014.	20	Ušće (L2)	lipljen		28,5	M
29.10.2014.	21	Ušće (L2)	lipljen		30,2	F
29.10.2014.	22	Ušće (L2)	lipljen		27	M
29.10.2014.	23	Ušće (L2)	lipljen		34,5	F

29.10.2014.	24	Ušće (L2)	lipljen	20,3	M
29.10.2014.	25	Ušće (L2)	lipljen	22,5	M
29.10.2014.	26	Ušće (L2)	lipljen	25,5	M
29.10.2014.	27	Ušće (L2)	lipljen	19,7	M
29.10.2014.	28	Ušće (L2)	lipljen	37,5	M
29.10.2014.	29	Ušće (L2)	lipljen	28	F
29.10.2014.	30	Ušće (L2)	lipljen	10,5	-
29.10.2014.	31	Ušće (L2)	lipljen	36	F
29.10.2014.	32	Ušće (L2)	lipljen	22	F
29.10.2014.	33	Ušće (L2)	lipljen	37	F
29.10.2014.	34	Ušće (L2)	lipljen	34,5	M
29.10.2014.	35	Ušće (L2)	lipljen	29,5	F
29.10.2014.		Ušće (L2)	Salmo trutta	27	F
29.10.2014.	36	Ušće (L2)	lipljen	29,5	F
29.10.2014.	37	Ušće (L2)	lipljen	33,5	F
29.10.2014.	38	Ušće (L2)	lipljen	33	F
29.10.2014.	39	Ušće (L2)	lipljen	33,5	M
29.10.2014.	40	Ušće (L2)	lipljen	32	F
29.10.2014.	41	Ušće (L2)	lipljen	33,5	F
29.10.2014.	42	Ušće (L2)	lipljen	33,7	M
29.10.2014.	43	Ušće (L2)	lipljen	29,8	M
29.10.2014.		Ušće (L2)	Salmo trutta	22	F
29.10.2014.		Ušće (L2)	Salmo trutta	18,1	F
29.10.2014.		Ušće (L2)	Salmo trutta	22,5	

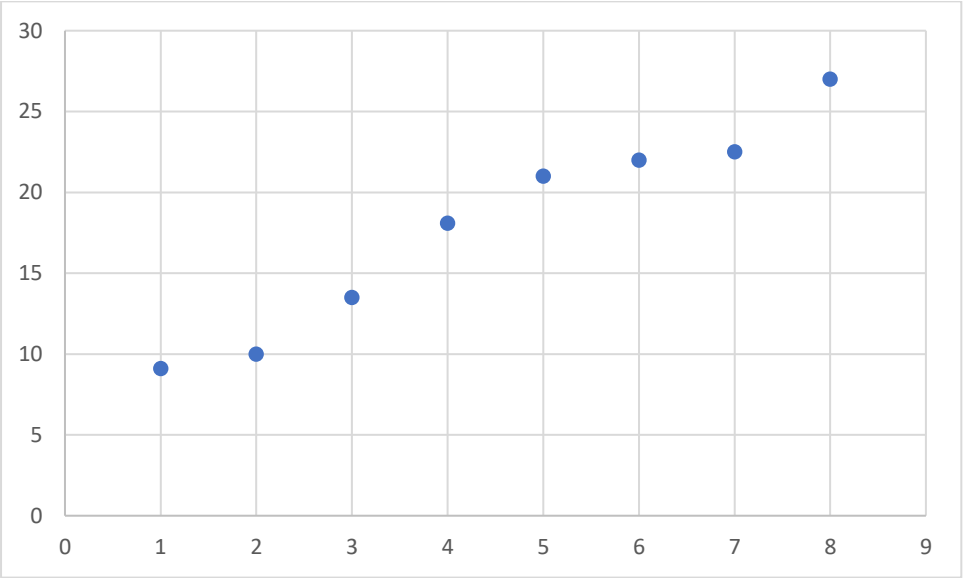
Prosječna izmjerena totalna dužina lipljena je 31,63 cm. Na lokaciji 1 (Kupari) izmjerena je maksimalna totalna dužina od 48,5 cm, a minimalna na lokaciji 2 (Ušće) od 10,5 cm (Graf 1). Što se tiče mase izmjereno je 10 jedinki lipljena na lokaciji 1. Maksimalna zabilježena masa tijela iznosila je 463 g, a minimalna je iznosila 116 g. Prosječna masa tijela izmjerenih jedinki iznosila je 290,96 g.



Graf 1: Dužinski raspon lipljena (*Thymallus thymallus*)

Iz podataka koje su obradili Šprem i sur (2005.) o dužinskom rastu, lipljenske populacije sa sjevera Europe mnogo slabije rastu u dužinu zbog činjenice da na sjevernijim dijelovima Europe zima ranije nastupa, a rijeke su dulje razdoblje pod ledom, radi toga najbrže rastu u prvoj godini, dok smanjenje dužinskog rasta nastupa u petoj godini. Također je utvrđeno da ribe rastu brže u dužinu nego u masu, što se može povezati sa manjom količinom raspoložive hrane u rijeci Kupi.

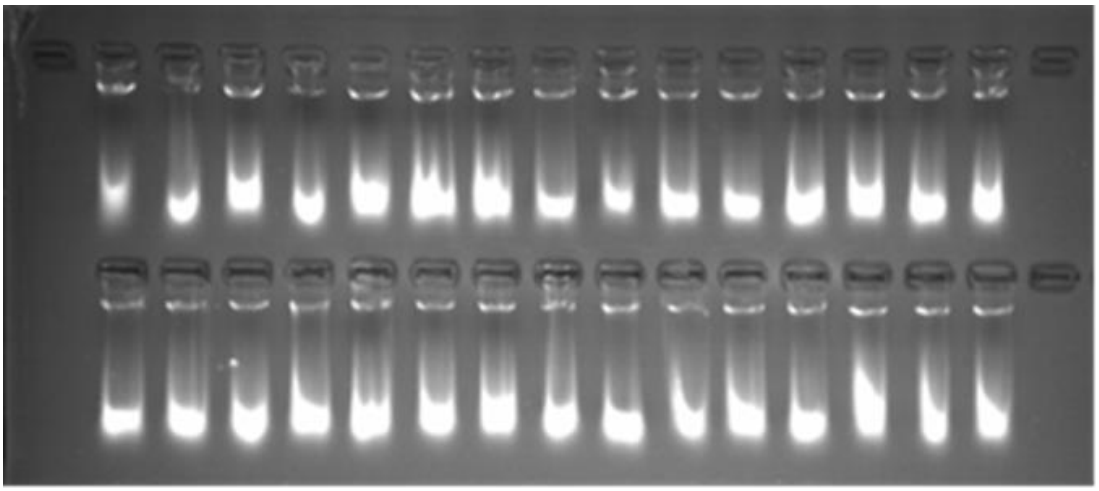
Kod potočne pastrve izmjerena je totalna dužina na obje lokacije, dok je masa izmjerena samo na lokaciji 1 i prosječna vrijednost mase je iznosila 34,45 g (minimalna 3,85 g, maksimalna 103,89 g). Prosječna totalna dužina na obje lokacije iznosila je 17,9 cm, od toga minimalna 9,1 cm, a maksimalna 27 cm.



Graf 2: Dužinski raspon potočne pastrve (*Salmo trutta*)

4.1 Provjera uspješnosti izolacije DNK

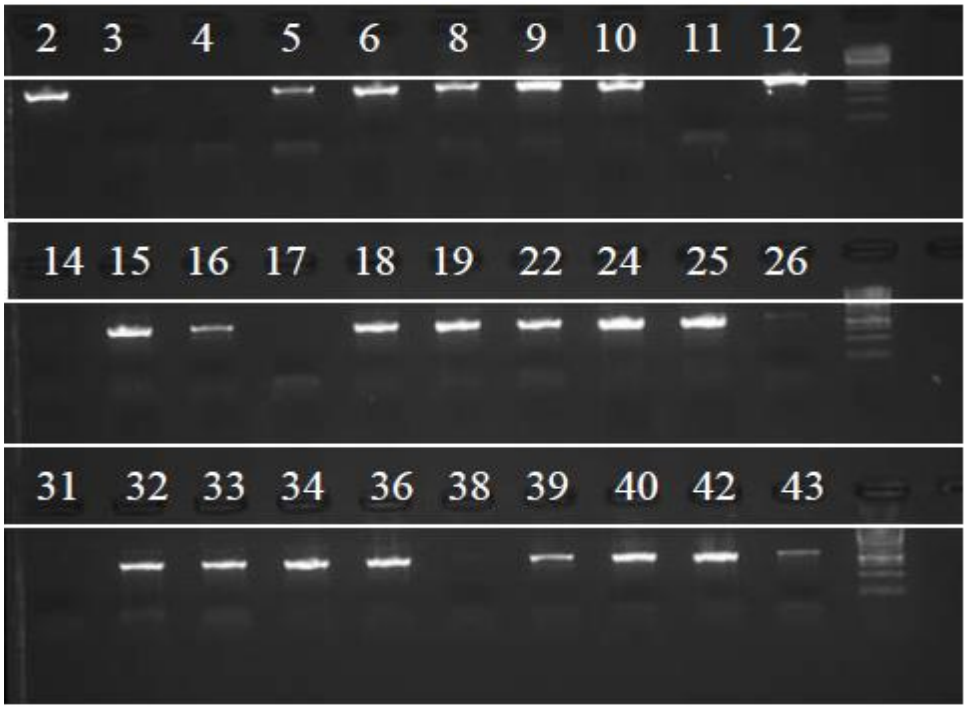
Kvaliteta dobivene DNK provjerena je elektroforazom u gelu agaroze. Razdvojena DNK vizualizirana je izlaganjem UV svjetlu na transiluminatoru (Uvitec) svjetlom valne dužine 302 nm. Na Slici 7 prikazana je uspješno izolirana DNK pri čemu je 2 µl uzorka DNK provučeno kroz 1,5% agarozni gel.



Slika 7: Uzorci DNK nakon elektorforeze na agaroznom gelu

4.2 Provjera PCR-produkata

Provjera rezultata umnažanja lančanom reakcijom polimerazom napravljena je elektroforezom na 0,7%-tnom agaroznom gelu. Rezultati su se očitali pod ultraljubičastim svjetlom, a gel se fotografirao ili pohranio kao digitalna slika u računalu (Slika 8).



Slika 8: Provjera PCR-produkata kontrolne regije mtDNK na agaroznom gelu

Ponovljen je PCR sa primjenom različitih DNK otopina, dodatkom DMSO, ponovna izolacija DNK pomoću Qiagen izolacijskog kita na osam uzoraka (br.: 3, 4, 11, 14, 17, 26, 31 i 38) nisu se uspjeli amplificirati ili su dali slab PCR signal koji nije rezultirao pozitivnim PCR-om. Stoga je provedena izolacija dodatnih osam uzoraka (br.: 1, 7, 20, 21, 23, 27, 28 i 29), gdje je ponovljen postupak izolacije i amplifikacije.

4.3 Sekvenciranje DNK lanaca

Usporedbom svih dobivenih sekvenci duljine 1089 bp, utvrđeno je da se analizirani uzorci svrstavaju u četiri različita haplotipa (Da25cs, Da27cs, Thy1, Thy2). U usporedbi sa bazom podataka GenBank utvrđeno je da dva haplotipa postoje u bazi podataka (Da25cs, Da27cs), (Marić i sur, 2012) (Tablica 2).

Tablica 2: pregled analiziranih uzoraka po haplotipovima

Naziv haplotipa	Prisutnost u GenBank	Oznaka uzorka	Ukupan broj uzoraka
Da25cs	Da, (Marić i sur, 2012)	10, 36, 39	3
Da27cs	Da, (Marić i sur, 2012)	2, 5, 6, 7, 8, 15, 16, 18, 22, 24, 27, 29, 34, 40, 42, 43	16
Thy1	Ne	19, 20, 21, 33	4
Thy2	Ne	9, 12, 25, 28, 32	5

Prema Meraner i Gandolfiu (2012.) genetska istraživanja su utvrdila raznolikost između mtDNK s obzirom na veliku rasprostranjenost lipljena na području Europe. Izdvojili su nekoliko genetskih grupa, među kojima se jadranska linija najviše razlikovala od ostalih grupa haplotipova. Također i morfološke razlike su uočene kao bitni faktori raspoznavanja ribljih fondova dunavskih i jadranskih lipljena.

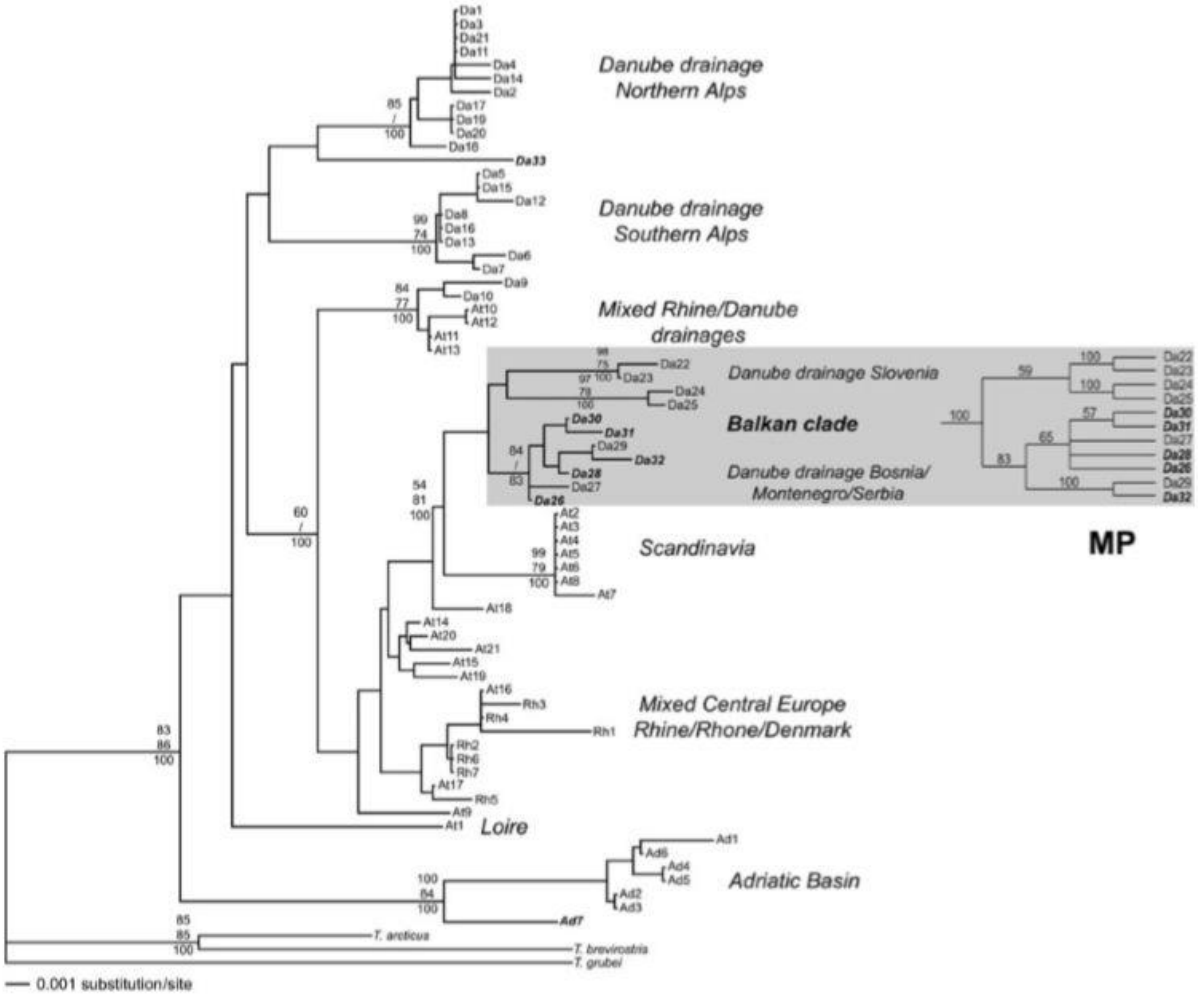
Haplotip Da27cs je izoliran kod lipljena koji naseljavaju rijeke dunavskog slijeva Ljuču (Crna Gora), Drinu (Bosna i Hercegovina) i jadranskog slijeva Tolmiku, Soča (Slovenija) (Slika). Haplotip Da25cs je izoliran kod lipljenja jadranskog slijeva iz rijeke Neretve (Bosna i hercegovina) i dunavskog slijeva Obrh, Unec i Sava (Slovenija). Programom BLAST utvrđeno je da su novoutvrđeni haplotipovi (Thy1 i Thy2) najsličniji haplotipu Da27cs, između njih je utvrđena razlika od 2 bp.

Analizirana populacija lipljena na području Nacionalnog parka Risnjak na temelju mtDNK pokazuje značajnu genetičku raznolikost (4 različita haplotipa, od čega su dva

novoutvrđena). Uspoređujući tu genetičku raznolikost sa ranije proučavanim populacijama, sekvencirani dijelovi mtDNK lipljena na ovom području, predstavljaju značajan dio *genetskog pool-a* lipljena. Raspodjela rezultata genetskih varijacija kod proučavanih lipljena ukazuje na dvije jasno odvojene evolucijske skupine, koje zastupa lipljen porijeklom iz jadranskog slijeva u Sloveniji (Slika 9) i lipljen iz dunavskog slijeva (rijeke Save). Ovo je očekivana opservacija budući da su populacije jadranskog i dunavskog slijeva podijeljene prije 4 milijuna godina, te su genetski znatno udaljene, kao što su utvrdili Meraner i Gandolfi (2012.).

Analizirana populacija lipljena iz područja Nacionalnog parka Risnjak genetski je slična populaciji haplotipa Da27cs koji je pronađen u rijeci Tolminki u jadranskom slijevu.

Populacije lipljena dunavskog slijeva, koje se nalaze od Slovenije do Crne Gore, međusobno su genetski bliske, što ukazuje na to da su u davnoj prošlosti dijelile ili zajedničkog pretka ili riječni sustav, ili oboje (Marić i sur, 2012). Genetske varijacije istraživanih populacija lipljena su geografski lokalizirane na određene riječne sustave ili čak odvojene rijeke što je u skladu s stacionarnim načinom života lipljena. Visoka razina ukupne genetske varijacije i genetske posebnosti lokalnih populacija također se podudara s opsežnim morfološkim varijacijama uočenih između populacija lipljena iz različitih rijeka, ali i unutar susjednih populacija istih riječkih sustava.



Slika 9: Filogram mtDNK kontrolnog područja haplotipova (Izvor: Marić i sur, 2012)

5 Zaključak

Lipljen je na području jadranskog slijeva alohtona vrsta pa se ne smatra ugroženom, a međunarodno je zaštićena. Na području Nacionalnog parka dozvoljeno je sportskim ribolovom lovit, ali svaki primjerak se vraća živ u rijeku.

Sekvenciranjem dijela mtDNK duljine 1089 bp, utvrđeni su pripadajući haplotipovi lipljena na području Nacionalnog parka Risnjak, na gornjem toku rijeke Kupe. Od 4 haplotipa, dva su novoutvrđena Thy1 i Thy2, a genetski su najsličnija Da27cs koji je pronađen u rijeci Tolminki (Slovenija) u jadranskom slijevu.

S obzirom na podjelu populacije prije 4 milijuna godina i na veliku rasprostranjenost, mogu se na području od Slovenije do Crne Gore, linije lipljena povezati porijeklom sa dvije – iz jadranskog slijeva i dunavskog. A s obzirom na stacionarni način života lipljena, u svakom njegovom staništu moguće su mutacije gena, te nastanak novih lokaliziranih haplotipova.

6 Literatura

1. Economidis, P. S., Banarescu, P. M. (1991): The distribution and origins of freshwater fishes in the Balkan peninsula, especially in Grece. International Revue gesamten Hydrobiologie 76, (2), 257-283.
2. Hrvatski športsko ribolovni savez: http://ribolovni-savez.hr/ribolovne-vode/kupa/ (pristupljeno kolovoz 2018.)
3. Kottelat, M., Freyhof, J. (2007): Handbook of European Freshwater Fishes. Kottelat, Cornol, Switzerland and Freyhof, Berlin, Germany.
4. Marić, Saša, Kalamujić, Belma, Snoj, Aleš, Razpet, Andrej, Lukić-Bilela, Lada, Pojskić, Naris, Sušnik Bajec, Simona (2012): Genetic variation of European grayling (*Thymallus thymallus*) populations in the Western Balkans. Hydrobiologia, 691, 1, 225-237.
5. Meraner A., Gandolfi A. (2012): Phylogeography of European grayling, *Thymallus thymallus* (*Actinopterygii*, *Salmonidae*), within the Northern Adriatic basin: evidence for native and exotic mitochondrial DNA lineages. Hydrobiologia 693: 205-221
6. Mrakovčić, M., Brigić, A., Buj, I., Ćaleta, M., Mustafić, P. i Zanella, D. (2006): Crvena knjiga slatkovodnih riba Hrvatske. Ministarstvo kulture i Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb
7. Mušičar, flyfishing magazin:Lipljan, prikaz vrste. http://www.musicar.rs/lipljan-prikaz-vrste/ (pristupljeno kolovoz 2018.)
8. Nacionalni park Risnjak: Plan upravljanja (2007). Crni lug: http://np-risnjak.hr/wp-content/uploads/2009/08/Np-Risnjak-HR-lowres-mapa.pdf (pristupljeno srpanj 2018.)
9. Parkovi Hrvatske: http://np-risnjak.hr/wp-content/uploads/2009/08/Np-Risnjak-HR-lowres-mapa.pdf (pristupljeno srpanj 2018.)
10. Ribolovci.rs: Lipljen. http://www.ribolovci.rs/ribe/lipljen-lipen-lipljan-lipan.html (pritupljeno srpanj 2018.)
11. Šprem N., Tomljanović, M., Piria M., Treer, T.,Safner R., Ančić I. (2005): Rast lipljena (*Thymallus thymallus* L.) u rijeci Kupi. Ribarstvo 63 (2): 32-46
12. Treer T., (2008.): Ihtiologija II (procjena ribljeg stoka), Zagreb, S 45-S56.
13. Uiblein, F., A. Jagsch, W. Honsig-Erlenburg & S. Weiss, 2001. Status, habitat use, and vulnerability of the European grayling in Austrian waters. Journal of Fish Biology 59: 223–247.
14. USR Vitez: Lipljen (*Thymallus thymallus*): http://www.usrvitez.ba/index.php/ribolov-zona/ribe/item/137-lipljen (pristupljeno srpanj 2018.)
15. Vuković, T., Ivanović, B. (1971): Freshwater Fishes of Yugoslavia (Slatkovodne ribe Jugoslavije). Zemaljski muzej BIH, Sarajevo, 268 pp.

Životopis

Daria Marušić rođena je 31. ožujka 1990. godine u Rijeci, gdje završava osnovnu školu, te upisuje Kemijsko-grafičku školu (Prirodoslovna i grafička škola). Godine 2008. upisuje Agronomski fakultet u Zagrebu, smjer Animalne znanosti. Po završetku preddiplomskog studija, daljnje školovanje nastavlja 2014. godine upisom na diplomski studij Ribarstva i lovstva na Agronomskom fakultetu u Zagrebu.