



INSTITUT ZA OCEANOGRAFIJU I RIBARSTVO SPLIT

Izviješće o projektu:

Određivanje genetske strukture izvornih prirodnih populacija vrsta od interesa za športsko - rekreacijski ribolov i marikulturu duž istočne obale

Jadrana (gof, zubatac, lubina i komarča)



Split, 2013.

Institut za oceanografiju i ribarstvo – Split

Projekt:

Određivanje genetske strukture izvornih prirodnih populacija vrsta od interesa za športsko - rekreacijski ribolov i marikulturu duž istočne obale Jadrana (gof, zubatac, lubina i komarča)

Voditelj projekta: prof. dr. sc. *Ivan Katavić*

Suradnici na projektu:

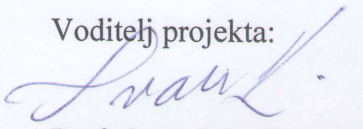
dr.sc. Tanja Šegvić Bubić

dr.sc. Grubišić Leon

dr.sc. Jasna Maršić-Lučić

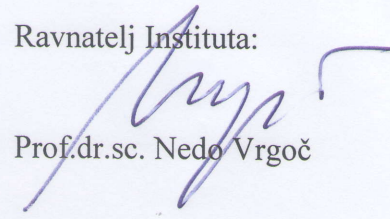
dipl. ing. Igor Talijančić

Voditelj projekta:


Prof. dr.sc. Ivan Katavić



Ravnatelj Instituta:


Prof.dr.sc. Nedo Vrgoč

SADRŽAJ

Predgovor

1. UVOD	1
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	9
3. MATERIJALI I METODE	9
3.1. Sakupljanje uzoraka	9
3.2. Izdvajanje DNK	14
3.3. Genotipizacija mikrosatelitnih lokusa	14
3.3.1. Statistička obrada molekularnih podataka	18
3.4. Citokrom C oksidaza podjedinice 1 (COI) mtDNK	20
3.4.1. Analiza rezultata sekvencioniranja i izrada filogenetskog stabla	20
3.5. Morfometrijska analiza uzgojne i divlje komarče, <i>Sparus aurata</i>	21
3.5.1. Statistička analiza	22
4. REZULTATI I RASPRAVA	26
5. ZAKLJUČCI	57
6. LITERATURA	62

Predgovor

U skladu s Ugovoru br. 57-2010/2 sklopljenim dana 02. studenog 2011. s Hrvatskim savezom za športski ribolov na moru (HŠSRM), izrađeno je Završno izvješće projekta pod nazivom '**Određivanje genetske strukture izvornih prirodnih populacija vrsta od interesa za športsko - rekreacijski ribolov i marikulturu duž istočne obale Jadrana (gof, zubatac, lubina i komarča)**', pod voditeljstvom prof.dr.sc. Ivana Katavića.

Napominje se da je ovom izvješću prethodile Javne prezentacije dobivenih rezultata u sklopu (1) edukativnog seminara održanog u hotelu Le Meridien Lav pod organizacijom športskog ribolovnog kluba **„Big Game Croatia“ iz Splita** (<http://www.ribolovnjadranu.hr/#!/seminar/c1bht>), kao i prezentacija br. (2) tijekom simpozija Instituta za oceanografiju i ribarstvo organiziranog u prostorijama MedILS-a (2013), a u sklopu predavanja '**Risks evaluation and management in marine aquaculture practices**' dr.sc. Tanje Šegvić Bubić, te naposljetku (3) u radijskoj emisiji '**Jutro mijenja sve**' (ur. Jadran Marinković, <http://radio.hrt.hr/ep/jutro-mijenja-sve/29795/>).

1. UVOD

Tijekom nekoliko posljednjih desetljeća, ljudski utjecaj na prirodne populacije riba dramatično se povećao kroz intenzivni razvoj industrije uzgoja ribe i drugih morskih organizama, te eksploataciju prirodnih populacija za ljudsku konzumaciju, te naposljetku i od čovjeka izazvane promjene okoliša. Spomenute aktivnosti mogu utjecati na genetsku raznolikost i strukturu ciljanih vrsta, te je održavanje i očuvanje genetske raznolikosti postao međunarodni dugoročni cilj u upravljanju prirodnim (nativnim) ribljim populacijama. Saznanja o genetskoj raznolikosti vrsta i/ili populacija omogućuju nam uvid u način adaptacije genetskih varijacija s ciljem povećanja preživljavanja ili razmnožavanja određene vrste, pozicioniranje populacija po geografskom podrijetlu te evaluaciju evolucijskog potencijala vrste/populacije da se nosi s novonastalim okolišnim promjenama (Koljonen, 2001; Laikre i sur., 2005). Stoga su informacije o genetskoj strukturi komercijalno važnih ribljih vrsta neophodne zbog prevencije ekoloških šteta i zbog osiguranja održivog i učinkovitog upravljanja eksploatiranih stokova i morskog ekosustava u cjelini.

Gen kao dio genetskog koda odgovoran je za stvaranje određenih osobina. Četiri slova (A, T, G, C) genetskog koda nalaze se u šezdeset i četiri kombinacije, iako postoje samo dvadeset različitih tipova aminokiselina. Različite kombinacije koda mogu proizvesti istu aminokiselinu unatoč razlikama u kodu. Međutim, promjene u genetskom kodu mogu dovesti do stvaranja različitih proteina te potencijalno stvoriti razlike u performansama ponašanja jedinke ili izmjenjenim fizičkim osobinama koje mogu biti nasljedne (fenotip/genotip). Takve alternativne varijante određenog gena nazivaju se aleli. Broj različitih alela je mjera genetske varijabilnosti ili raznolikosti. Prosječan učinak supstitucije jednog alela u drugi naziva se "aditivna genetske varijanica." Genetska varijabilnost vrste distribuira se unutar populacije (izražena kao razlika između jedinki) i između populacija (izražena kao razlika u prisutnosti i frekvencije alela). Kada postoje različite populacije iste vrste s malo ili nimalo veze među njima, kao posljedica npr. geografske barijere, one postaju genetski različite i udaljene jedna od druge. Gubitak takvih izoliranih populacija može dovesti do gubitka genetske raznolikosti unutar vrste. Upravljanje populacijama vrsta od gospodarskog značaja u vremenu i prostoru, uvažavajući unutar i među - populacijske varijacije, važno je za njihovu održivost kako bi se izbjegle negativne genetske posljedice (Altukhov i Salmnekova, 1994).

U cilju smanjenja gubitka genetske raznolikosti, upravljanje se mora temeljiti na saznanjima genetskog integriteta određenih populacija. Moderne molekularne metode, koje se intenzivno razvijaju zadnjih godina, omogućavaju određivanje genetske strukture populacija,

te njihova aplikacija može u konačnici olakšati lokalno upravljanje ribljim stokovima i povećati izlov pod održivim ribolovnim režimom.

Molekularne metode u ribarstvu i akvakulturi

Kao posljedica brzog razvoja molekularne genetike u posljednjih 20 godina, danas postoji nekoliko razvijenih laboratorijskih tehnika koje se koriste za prikupljanje genetskih podataka o populacijama vrsta u sustavu uzgoja (komarče, lubina), kao i vrsta od komercijalnog interesa. Naime, upotreba molekularnih metoda praćena je razvojem molekularne sistematike koja istražuje strukture makromolekula, te na osnovi dobivenih rezultata rekonstruira evoluciju gena i organizama, a samim tim i objašnjava genetsku raznolikost (Moritz i Hillis, 1996). Genetska raznolikost populacija može se utvrditi korištenjem molekularnih markera koji predstavljaju sekvencu na molekuli DNA ili proteinu koja se može lako uočiti i čije je nasljeđivanje moguće pratiti (Ford-Lloyd, 1996). Polimorfizam na molekuli DNA javlja se kao posljedica mutacija koje se očituju kao supstitucije, a rjeđe kao insercije ili delecije, ili pak kao greška prilikom replikacije. Proučavanje polimorfizma omogućeno je otkrićem DNA tehnika, na prvom mjestu lančane reakcije polimeraze, a nakon toga primjene restrikcionijskih endonukleaza koje sijeku molekulu DNA na fragmente određene dužine (Ryman i Utter, 1987). Najčešće korištene metode molekularne biologije u ispitivanju varijabilnosti ribljih populacija su alozimi i suvremeniji genetski markeri kao što su ponavljajuće sekvence nuklearne DNA – *mikrosateliti* i *mitohondrijska DNA*. Upotrebom različitih genetskih markera, kako mitohondrijskih tako i nuklearnih, selektivno neutralnih lokusa (mikrosatelita), kao i lokusa koji su pod uticajem selekcije (pojedini alozimi), možemo utvrditi genetsku strukturu populacije. Što je više markera u upotrebi, slika genetskih polimorfizama je potpunija.

Mikrosateliti

Mikrosateliti ili ponavljajuće jednostavne sekvence (SSR) najčešći su oblik ponavljajuće DNK u eukariotskom genomu. Mikrosatelitnu sekvencu čini motiv od dva do šest parova baza koje se ponavljaju nekoliko desetaka puta, kao npr. (TG)_n ili (AAT)_n, čineći sekvencu DNK duljine od nekoliko desetaka do nekoliko stotina nukleotida. Prisutne su u kodirajućim i nekodirajućim regijama DNK i zapremaju veliki udio genetskog materijala. Mikrosateliti su vrlo korisni kod istraživanja genetske varijacije u populacijskoj genetici, jer se lako otkrivaju pomoću PCR tehnike, te se razlika u alelima od samo 1 bp može uočiti na visoko rezolucijskim gelovima (Hansen i sur. 2001). Lančanu reakciju polimerazom moguće je dobro optimizirati pa se u jednom procesu može amplificirati više različitih lokusa. Mikrosateliti se često koriste pri određivanju roditeljstva, srodnosti i identifikaciji jedinki.

Radi velikog polimorfizma, mnogi mikrosateliti omogućuju uspješnu identifikaciju jedinki i odnosa unutar porodica. To uključuje veliki broj mikrosatelita (engl. DNA fingerprinting) koji predstavljaju različite genotipove. Ti biljezi omogućuju identifikaciju srodstva i veze ne samo u prvoj, već i u daljnjim generacijama, pa su istraživači u stanju analizirati reprodukcijski uspjeh i „fitness” pojedine jedinke (Crivelli i sur. 2000).

Mikrosateliti kao genski biljezi imaju niz prednosti, kao što su kodominantnost, pouzdanost, visoka razina ponovljivosti, a tipičan lokus može sadržavati desetke alela. Nedostatak je visoka razina specifičnosti za jednu vrstu ili svega nekoliko usko srodnih vrsta i to što izrada PCR početnica zahtijeva visoku razinu laboratorijske stručnosti i uzima puno vremena. Nakon što se jednom konstruiraju PCR početnice, mikrosatelitne regije jednostavno se umnožavaju lančanom reakcijom polimerazom.

Mitohondrijska DNA

U gotovo svih višestaničnih životinja mitohondrijski genom predstavlja kružna dvolančana DNK molekula veličine od 15,7 do 19,5 kb (kilobaza). Za razliku od replikacije nuklearne DNK koja je simetrična, dvosmjerna i diskontinuirana, replikacija mitohondrijskog genoma je asimetrična, jednosmjerna i kontinuirana, te zahtijeva mnogo manje enzima za replikaciju. Mitohondrijski genomi svih životinja, uz par iznimaka, sadrže istih 37 gena: dva za ribosomalnu RNK (rRNK), 13 za proteine i 22 za transfer RNK (tRNK). Proizvodi tih gena, zajedno s RNK molekulama i proteinima koji dolaze iz citoplazme, omogućuju mitohondrijima posjedovanje vlastitih sustava za provođenje replikacije DNK i transkripcije, te za procesiranje mRNK i translaciju (Boore, 1999). Replikacija i transkripcija započinju u ne-kodirajućoj kontrolnoj regiji. Majčinsko nasljeđivanje mtDNK koje ima za posljedicu haploidno nasljeđivanje čini mtDNK izvrsnim genskim biljekom za populacijska istraživanja.

Ukupna brzina supstitucija u mitohondrijskom genomu procjenjuje se 5-10 puta većom od supstitucija u nuklearnoj DNK, premda se brzine promjena sljedova razlikuju u različitim dijelovima mitohondrijskog genoma (Hoelzel i sur. 1991). Najmanju brzinu supstitucije u mitohondrijskom genomu imaju geni za tRNK i rRNK. Geni koji kodiraju proteine evoluiraju otprilike dvostruko brže od ribosomalnih gena, što je do dva reda veličine brže od brzine evolucije odgovarajućih nuklearnih gena.

Brzine evolucije značajno variraju između gena različitih proteina, a i između različitih vrsta ako se proučava određeni protein. I u mitohondrijskom genomu postoje ne-kodirajući sljedovi, ali proporcionalno ih je mnogo manje nego u nuklearnom genomu (Hoelzel i Dover 1991). Mitohondrijska DNK zbog svog malog genoma jednostavne strukture i organizacije, haploidnosti, majčinskog nasljeđivanja (uz neke iznimke), nedostatka

rekombinacije i introna predstavlja vrlo koristan molekularni biljeg. Uz to mtDNK posjeduje regije koje evoluiraju različitim brzinama, što omogućava dizajniranje konzerviranih početnica i rješavanje filogenetskih problema na različitim taksonomskim razinama (Zhang i Hewitt 1996). Zbog velike brzine mutacije mtDNK varijabilna je unutar prirodne populacije, zbog čega je vrlo korisna pri istraživanjima kraćih razdoblja povijesti populacije (Galtier i sur. 2009).

Za filogenetska istraživanja koja se protežu od razine vrste do razine roda koriste se varijabilniji dijelovi mtDNK, i to dijelovi gena za citokrom b (Lynch i Jarrell 1993), kontrolna regija mtDNK (Galtier i sur. 2009) i dijelovi gena za citokrom C oksidaza podjedinica 1 (Folmer i sur. 1994). Gen citokrom C oksidaza podjedinica 1 (COI) identificiran je kao dobar genetski biljeg za razlikovanje vrsta zbog dvije činjenice – univerzalne početnice umnažaju segmente gotovo svih životinjskih vrsta (Folmer i sur. 1994), a brzina evolucijskih promjena ovog gena omogućava razlikovanje srodnih vrsta, te filogeografskih skupina unutar iste vrste (Cox i Hebert 2001). Enzim citokrom C oksidaza veliki je transmembranski protein prokariotskih stanica i mitohondrija, a sudjeluje u prijenosu elektrona u procesu staničnog disanja.

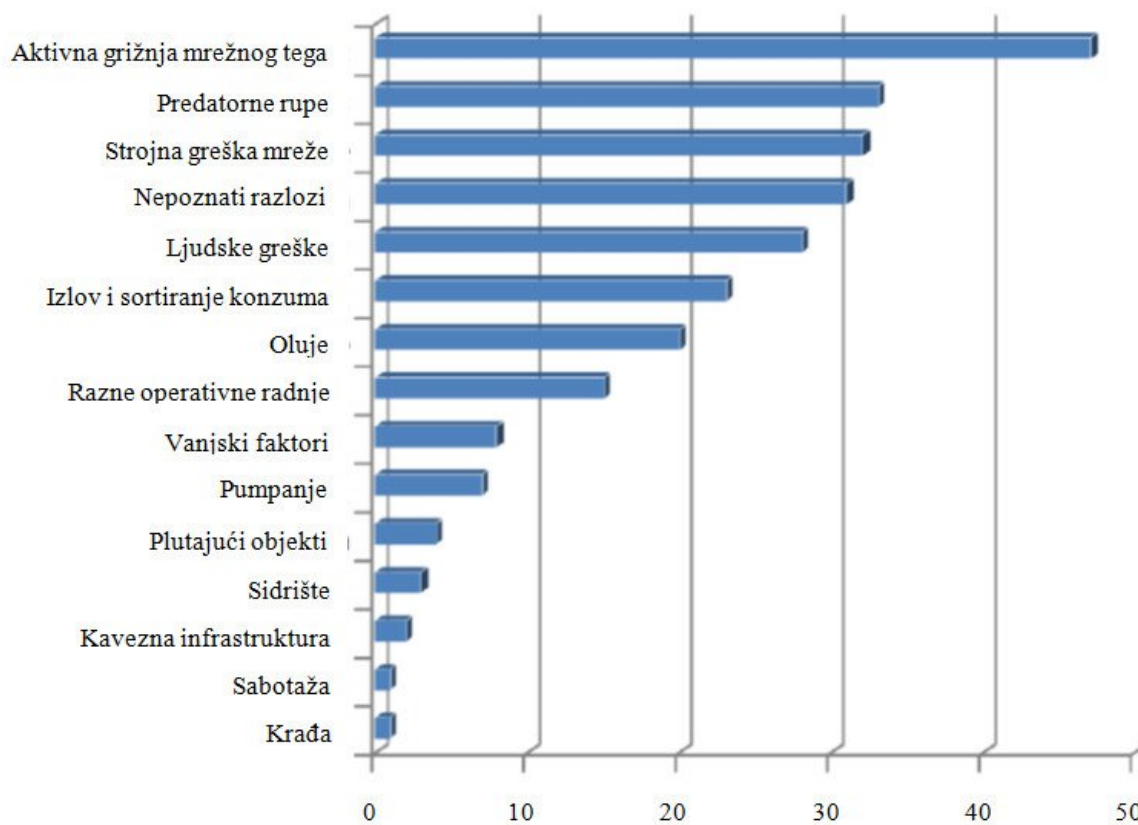
Važnost određivanja autohtone populacijske strukture

U Hrvatskoj do danas nisu provedena genetska istraživanja komercijalno i sportsko-rekreativno važnih ribljih vrsta kao što su gof, zubatac, lubin i komarča, a koji su već uvedeni u kontrolirani komercijalni uzgoj. Njihova intenzivna eksploatacija može posljedično dovesti do opadanja broja prirodne populacije u okolišu što izravno utječe na izvornost genetske raznolikosti vrsta. Također, takva situacija može rezultirati smanjenjem inter-populacijskog i intra-populacijskog polimorfizma, mutacija, hibridizacija te povećano prisustvo recesivnih alela što u konačnici utječe na smanjenu sposobnost preživljavanja vrsta. Poznavanje izvornih genetskih struktura gofa, zubataca, lubina i komarči je nužno da bi očuvali lokalnu bioraznolikost te pružili osnove za praćenje potencijalne genetske 'erozije' kao rezultat intenzivne eksploatacije.

S druge strane, i utjecaj marikulture na prirodne populacije je neizostavan. Među osnovne opasnosti po okoliš vezane za marikulturu spadaju potencijalni genetski međudnosi odbjeglih i/ili namjerno puštenih uzgojnih organizama i prirodne populacije (Grigorakis, 2010). Odnedavno i drugi oblik prebjega dolazi u središte pozornosti, a to su takozvani „zbjegovi putem mrijesta”. Naime, posljedica spontanog mrijesta uzgajanih riba u zatočeništvu jest otpuštanje velikog broja oplođenih i jajnih stanica. Moguće je da će

ovakove jedinke genetski kontaminirati autohtone populacije (Dimitriou i sur. 2007; Jensen i sur. 2010).

Riblji prebjeci neizbježna su pojava u marikulturnoj praksi, a proizlaze iz ljudske pogreške pri rutinskom rukovanju kaveznim mrežama, mehaničkih kvarova i šteta uzrokovanih nepovoljnim vremenskim uvjetima ili predatorima poput dupina, koji znaju trgati mrežni teg (Jackson i sur., 2012) (Slika 1).



Slika 1. Pregled najčešćih čimbenika i razloga zbog kojih dolazi do prebjega (Jackson i sur., 2012).

O masovnosti zbjegova malo se zna, osim za uzgajanog lososa *Salmo salar* (Linnaeus, 1758), dužičastu pastrvu *Oncorhynchus mykissu* (Walbaum, 1792) i bakalara *Gadus morhua* (Linnaeus, 1758) u Norveškoj, gdje postoji zakonska regulativa o prijavljivanju tih događaja. Analizom prijavljenih nezgoda uočilo se da je aktivna grižnja mrežnog tega glavni uzrok (> 50%) nastanka zbjegova (Jackson i sur., 2012). Tako se zbjegovi atlantskog lososa i bakalara, zbog izuzetne komercijalne važnosti vrsta i očite genetske prijetnje prirodnim populacijama već niz godina proučavaju i bilježe, dok je o zbjegovima uzgojnih vrsta u Sredozemlju malo toga poznato.

Uzgojne populacije znatno se genetski razlikuju od prirodnih populacija. Za uspostavljanje matičnjaka iz veliki prirodnih populacija uzima se mali broj jedinki, što može dovesti do promjena u genetskoj strukturi i smanjenja genetske varijabilnosti potomaka (tzv. Founderov efekt). Nadalje, matična jata domesticiranjem prolaze kroz proces fenotipske selekcije komercijalno važnih svojstva kao što su brži rast, otpornost na bolesti, tolerancija na visoke nasadne gustoće i veći jestivi dio ribe, što izravno utječe na gubitak genotipske raznolikosti tijekom generacija uzgoja. Smanjenje varijabilnosti i prosječnog broja alela po lokusu i višak homozigota, predstavlja čest scenarij u matičnom jatu (Navarro i sur. 2009). Također, mali broj fertilnih ženki u kontroliranoj reprodukciji zbog visokog fekunditeta može dovesti do križanja u bliskom srodstvu (engl. inbreeding). Suprotno scenariju koji pogađa matičnjake, u prirodi su populacije podložne raznim promjenama kao što su migracije, mutacije, selekcija i genetski drift, što omogućava održavanje visoke genetske varijabilnosti.

Zbog brzog razvoja kaveznog uzgoja, danas je u mrjestilištima diljem Sredozemlja uobičajen uzgoj matičnjaka komarči podrijetlom iz Atlantskog oceana, jer te populacije imaju bolji rast u usporedbi s lokalnim populacijama (Miggiano i sur. 2005). Potomci nastali križanjem prebjega različitog geografskog podrijetla s prirodnim populacijama mogu imati problem oslabljene sposobnosti preživljavanja zbog inkompatibilne adaptacije (engl. outbreeding depression) i/ili problem slabljenja srođivanjem (engl. inbreeding depression) odnosno povećanje homozignosti u populaciji (Ward, 2006).

Prebjezi su često okarakterizirani lošijom kondicijom i preživljavanjem u usporedbi s prirodnim populacijama iste vrste. Ipak, prebjezi koji prežive u okolišu mogu se uspješno križati s prirodnim jedinkama, što je zabilježeno kod lososa uzgajanog u Norveškoj (Skaala i sur. 2006). Brojna istraživanja provedena u Norveškoj i Irskoj potvrdila su slabije preživljavanje i kraći životni vijek lososa iz uzgoja i hibrida (prebjezi križani s prirodnim populacijama) u odnosu na jedinke iz lokalnih populacija (McGinnity i sur. 2003; Fleming i sur. 2000). Relativna procjena preživljavanja bila je najniža za potomstvo iz uzgoja, najviša za lokalno, prirodno potomstvo, a u sredini su bili potomci hibrida. Međutim, potomci iz uzgoja i hibridi u interakciji s lokalnom mlađi i kompeticiji za hranu i stanište općenito su agresivniji i imaju brži potencijal rasta zbog selekcije, što im osigurava prednost u odnosu na lokalne jedinke (Fleming i sur. 2000).

Prebjege karakterizira potencijalno negativno genetičko i ekološko djelovanje na divlje populacije kroz kompeticiju za resurse, predaciju, transmisiju štetnih patogena i alternaciju genetičke strukture prirodnih ihtionaselja kroz međusobno križanje. Faktori prebjega koji najviše djeluju na ihtipopulacije u blizini kaveza su prema Forrest i sur. (2007):

- stopa prebjega;
- opseg selekcije osobina uzgojnog stoka;
- veličina izlova i njena koreliranost sa spolnom zrelošću;
- sposobnost preživljavanja i reprodukcije prebjega u prirodnoj okolini koja je određena ishranom i međusobnim križanjem sa divljim jedinkama;
- veličina, distribucija i zdravstveni status ihtiopopulacija.

Prve tri navedene stavke mogu se kontrolirati preko bolje prakse upravljanja („Best Management Practices“). Odabiranjem ranih razvojnih stadija od matičnjaka koji se stalno obnavljaju divljim jedinkama, izbjegava se križanje u bliskom srodstvu i time smanjuje mogućnost ispoljavanja recesivnih osobina. Rizici posljednje dvije stavke su određeni lokalitetom i vrstom koja se uzgaja budući da njihovi učinci variraju u ovisnosti o abundanciji, distribuciji i ponašanju okolne ihtiopopulacije.

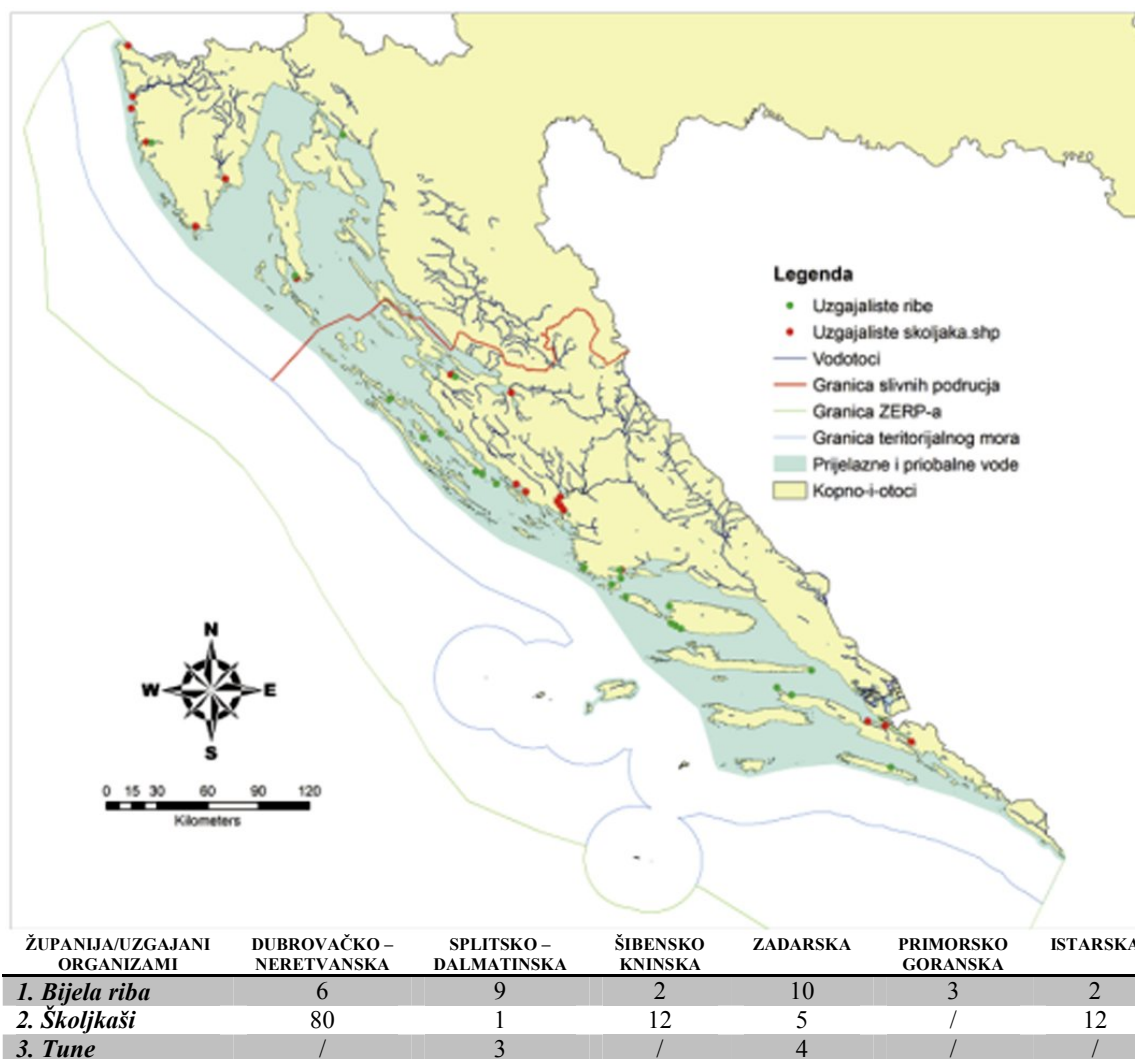
U Hrvatskoj, razvitkom kaveznog uzgoja lubina i komarče (Slika 2, Tablica 1) prisutna je sve veća zabrinutost o potencijalnom utjecaju zbjegova na autohtone populacije tzv. *genetskom onečišćenju*.

Tablica 1. Proizvodnja uzgojnih morskih organizama u Republici Hrvatskoj za razdoblje 2000.– 2011.(MRRR).

GODINA	BIJELA RIBA (t)	ŠKOLJKAŠI (t)	TUNE (t)	UKUPNO (t)	RIBLJA MLAĐ		UKUPNO (komadi)
					Komarča	Lubin	
2000	2 100	1 111	1 167	4 378			
2002	2 500	2 500	3 971	8 971	300 000	4 500 000	4 800 000
2005	3 000	3 000	3 425	9 425	5 725 000	6 551 000	12 276 000
2006	3 500	3 500	6 700	13 700	4 769 000	9 191 000	13 960 000
2007	4 000	3 500	4 180	11 680	5 836 000	9 044 000	14 880 000
2008	4 500	3 000	3 711	11 211	8 920 420	11 566 480	20 486 900
2009	5 000	2 000	4 200	11 200	5 670 000	8 550 000	14 220 000
2010	5 200	2 000	3 368	10 568	3 574 710	11 531 710	15 106 420
2011	4533	420	2 312	7 268	6 562 750	8 262 240	14 824 990

U proizvodnoj praksi, mrjestilišta koriste matičnjake od svega nekoliko dobro provjerenih spolno zrelih jedinki koje su prethodno selekcionirane na poželjni fenotip koji kroz generacijski 'inbreeding' rezultira posve nepoželjnom promjenom genotipa, što s

vremenom može voditi eroziji genetske raznolikosti novonastalih populacija. Nadalje, za potrebe uzgoja velike količine mladi lubina i komarče nabavljaju se iz inozemstva (uglavnom iz Italije i Francuske), čiji dio prebjezima dopijeva u otvoreno more i dobiva mogućnost križanja s autohtonim, nativnim populacijama. Stoga genetsko onečišćenje, odnosno gubitak izvornih genetskih obilježja autohtonih populacija zbog križanja s prethodno selekcioniranim uzgajanim jedinkama koje nisu lišene ni križanja u bliskom srodstvu nije moguće isključiti.



Slika 2. Prikaz registriranih uzgajivača morskih organizama po županijama u Republici Hrvatskoj (IZOR, 2011; Pavlović, 2010).

Nadalje, približavanje odnosno otpuštanje uzgojnih populacija lubina i komarče u more s ciljem očuvanja njihove brojnosti u morskom okolišu, također može utjecati na genetsku raznolikost autohtonih populacija. Uspostavljeni znanstveni konsenzus izriče da

namjerno ili/i nenamjerno puštanje uzgojnih riba u more posjeduje ozbiljan rizik na genetski identitet divljih populacija (Ruzzante i sur., 2004). Uzgajane jedinke različite genetske strukture te različitog geografskog porijekla od autohtonih populacija, te prethodno selektirane na određeno svojstvo kao npr. brzi rast, mogu uzrokovati slom lokalne i adaptirane genetske strukture, povećati stopu križanja u srodstvu i /ili smanjiti genetsku raznolikost divljih populacija (McGinnity i sur., 2003). Svjetska iskustva potvrdila su da poribljavanje (popularno nazvano „vraćanje moru oduzetog“) može biti samo privremeno rješenje problema intenzivne eksploatacije s izvjesnim negativnim utjecajem na genetsku strukturu potomstva.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj projekta jest po prvi puta odrediti genetsku strukturu autohtonih populacija gofa, zubaca, lubina i komarče u istočnom dijelu Jadrana, koji su izvanredno značajni i atraktivni predmeti rekreacijskog i napose športskog ribolova, korištenjem molekularnih genetskih markera, te utvrditi stupanj genetske raznolikosti kao pouzdanog indikatora "zdravlja" prirodnih populacija. Planiranim projektom daje se doprinos metodologiji za provođenje sličnih istraživanja i na drugim vrstama od potencijalnog interesa za športski ribolov i marikulturu. Polazna osnova za sve ovo jest dobivanje uvida u genetsku izvornost nekontaminiranih stokova, što sugerira potrebu poduzimanja pravovremenog istraživanja prije uzgojne ekspanzije dotične vrste i moguće genetske erozije.

3. MATERIJALI I METODE

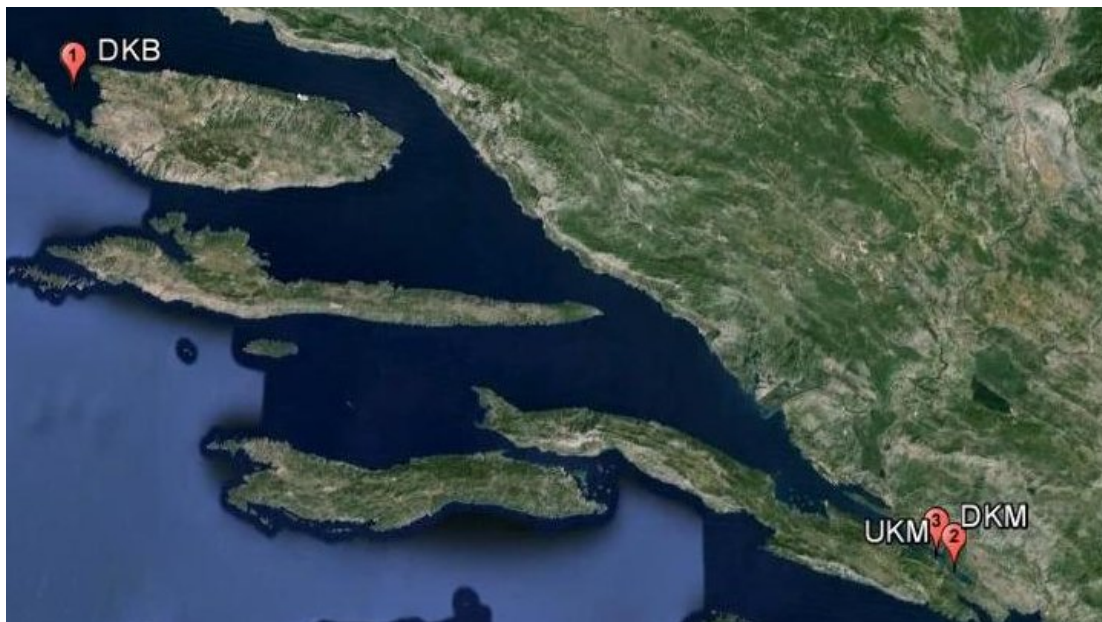
3.1. Sakupljanje uzoraka

Komarča (Sparus aurata)

Za potrebe predmetnog istraživanja sakupljene je 168 jedinki komarče u razdoblju od svibnja do listopada 2012. godine. Uzorak je obuhvaćao jedinke različitog geografskog podrijetla i populacijskog karaktera, odnosno jedinke iz prirodnih populacija i uzgojnih populacija, pokrivajući područje srednjeg i južnog Jadrana (Slika 3). U srednjem dijelu Jadrana (otok Brač i Splitski kanal) uzorkovano je 30 divljih jedinki, a u južnom dijelu Jadrana (Malostonski zaljev) uzorkovane su 44 uzgojne jedinke francuskog podrijetla i 94 prirodne jedinke. Uzorci su analizirani korištenjem dvije znanstveno utvrđene metode:

- a) mikrosatelitnom genotipizacijom kako bi se odredila genetska struktura ispitivanih populacija, te

- b) morfometrijskom, odnosno klasičnom metodom odnosa i metodom vezanih mreža kako bi se utvrdile fenotipske različitosti ili sličnosti divlje i uzgojne komarče.

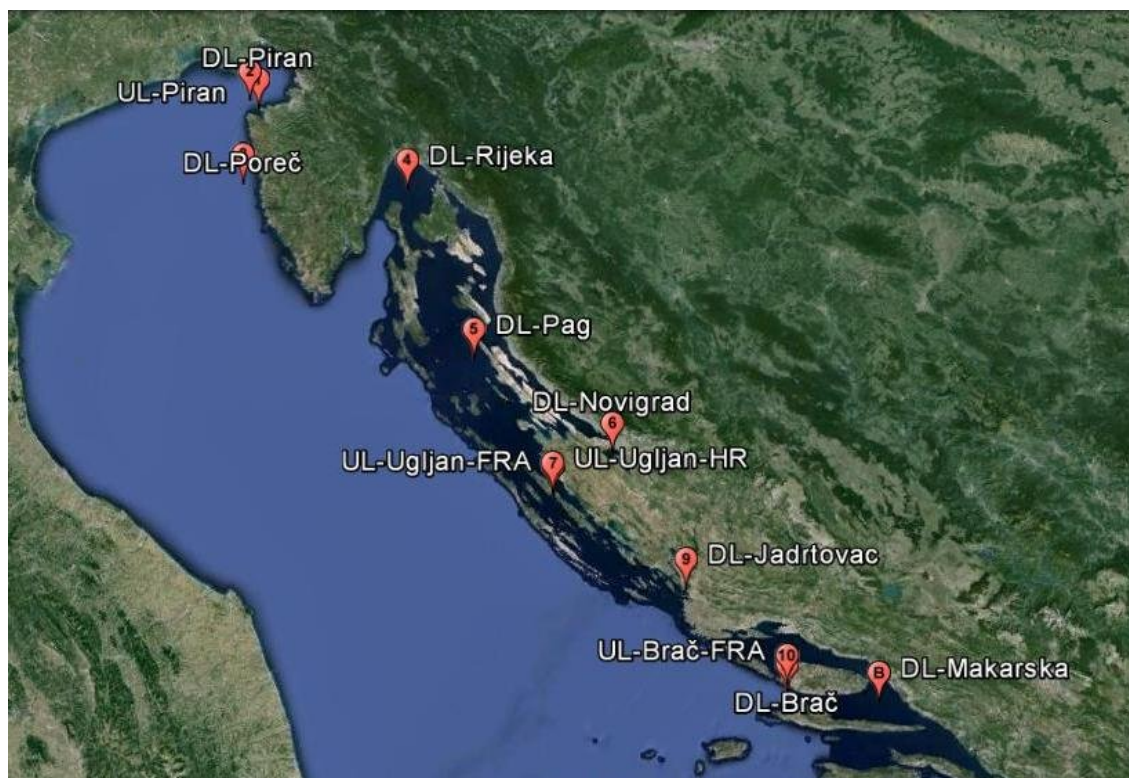


Slika 3. Geografski položaj uzorkovanih populacija komarče *Sparus aurata*: DKB, divlje komarče sjeverozapadne strane otoka Brača; DKM, divlje komarče Malostonskog zaljeva; UKM, uzgojne komarče Malostonskog zaljeva.

Lubin (*Dicentrarchus labrax*)

Za potrebe predmetnog istraživanja sakupljeno je 380 jedinki lubina u razdoblju od siječnja 2012. do svibnja 2013. godine. Uzorak je obuhvaćao jedinke različitog geografskog podrijetla i populacijskog karaktera, odnosno jedinke iz prirodnih populacija, uzgojnih populacija, te iz mrjestilišta, pokrivajući tako područje sjevernog i srednjeg Jadrana (Slika 4). Unutar svakog geografskog područja, istovremeno je izvršeno uzorkovanje prirodnih i uzgojnih populacija. U sjevernom dijelu Jadrana uzorkovano je 30 uzgojnih i 40 divljih jedinki u području Piranskog zaljeva, 30 divljih jedinki u području oko Poreča, 20 divljih jedinki u akvatoriju Rijeke i otoka Cresa te 27 divljih jedinki u akvatoriju otoka Paga. U srednjem dijelu Jadrana uzorkovano je 25 divljih jedinki u području Novigradskog i Karinskog mora, 43 uzgojne jedinke francuskog podrijetla i 47 uzgojnih jedinki jadranskog porijekla u akvatoriju otoka Ugljana, 20 divljih jedinki u području Jadrtoveca, 25 divljih jedinki i 48 uzgojnih jedinki u akvatoriju otoka Brača, te 25 divljih jedinki u širem akvatoriju Makarske (Tablica 2).

Uzorci su analizirani mikrosatelitnom genotipizacijom kako bi se odredila genetska struktura ispitivanih populacija.



Slika 4. Geografski položaj uzorkovanih populacija lubina *Dicentrarchus labrax*: DL, divlji lubin; UL, uzgojni lubin.

Tablica 2. Podaci o uzorcima korištenim u ovom istraživanju.

Populacije oznake	Područje	Lokacija	Populacijski tip	Zemlja podrijetla	<i>N</i>
DL-Piran	Sjeverni Jadran	Piranski zaljev	Prirodni	Slovenija	40
UL-Piran	Sjeverni Jadran	Piranski zaljev	Uzgojni	Italija	30
DL-Poreč	Sjeverni Jadran	Poreč-Umag	Prirodni	Hrvatska	30
DL-Rijeka	Sjeverni Jadran	Rijeka-Cres	Prirodni	Hrvatska	20
DL-Pag	Sjeverni Jadran	Novalja	Prirodni	Hrvatska	27
DL-Novigrad	Srednji Jadran	Novigradsko-Karinsko more	Prirodni	Hrvatska	25
UL-Ugljan-HR	Srednji Jadran	Ugljan-u. Lamljana	Uzgojni	Hrvatska	47
UL-Ugljan-FRA	Srednji Jadran	Ugljan-u. Lamljana	Uzgojni	Francuska	43
DL-Jadrtovac	Srednji Jadran	Jadrtovac-Šibenik	Prirodni	Hrvatska	20
DL-Brač	Srednji Jadran	Brač	Prirodni	Hrvatska	25

UL-Brač-FRA	Srednji Jadran	Brač	Uzgojni	Francuska	48
DL-Makarska	Srednji Jadran	Makarska	Prirodni	Hrvatska	25

Gof (*Seriola dumerili*)

U predmetnom istraživanju sakupljeno je 174 jedinki gofa u razdoblju od siječnja 2012. do svibnja 2013. godine. Uzorak je obuhvaćao jedinke različitog geografskog podrijetla pokrivajući područja sjevernog, srednjeg i južnog Jadrana. Budući da je gof pelagična i migratorna vrsta, uzorkovanje je prošireno na Jonsko i Balearsko more, kako bi se odredila što preciznija genetska struktura ispitivanih populacija (Slika 5). U sjevernom dijelu Jadrana uzorkovano je 29 jedinki u području Dugog otoka i otoka Paga, u srednjem dijelu Jadrana uzorkovana je 31 jedinka u području otoka Drvenika, Visa i Hvara, dok je u južnom Jadranu uzorkovano 26 jedinki u širem području Molunata. U Jonskom moru uzorkovano je 36 jedinki u području Catanie i Sirakuze, dok su u Balearskom moru uzorkovane 52 jedinke u području Alicantea.



Slika 5. Geografski položaj uzorkovanih populacija gofa *Seriola dumerili*: SJEV_JAD, populacija sjevernog Jadrana; SR_JAD, populacija srednjeg Jadrana; JUŽ_JAD, populacija južnog Jadrana; ITA, populacija Jonskog mora, SPA, populacija Balearskog mora.

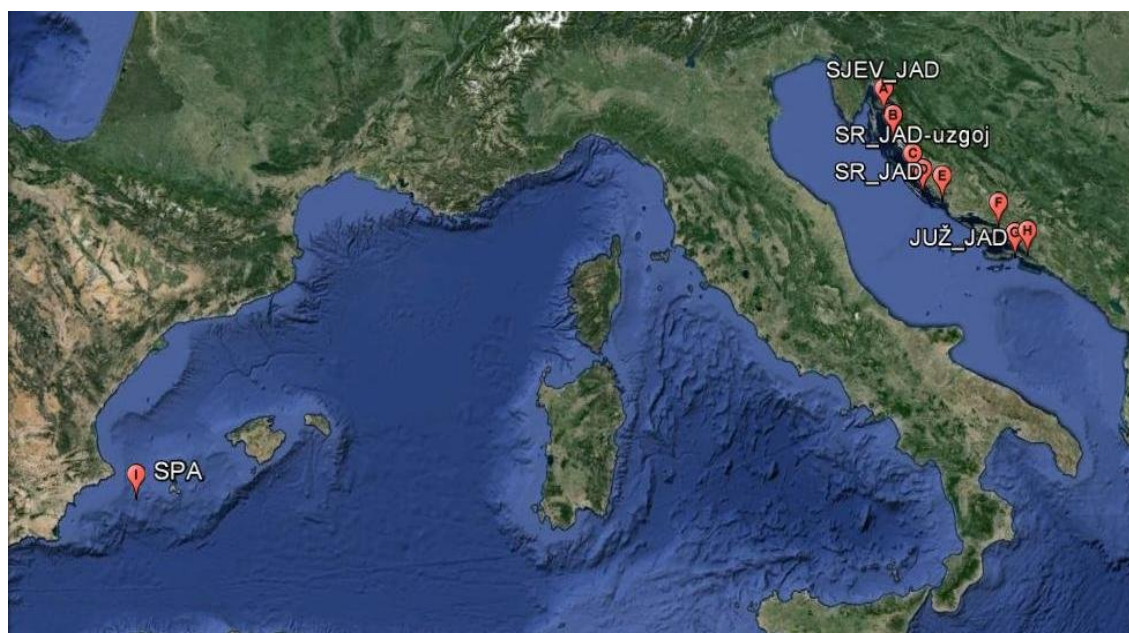
Uzorci su analizirani metodama

- a) mikrosatelitne genotipizacije i
- b) sekvencioniranjem gena citokrom C oksidaze podjedinice 1 (COI) mitohondrijske DNK (mtDNK) kako bi se odredila genetska struktura ispitivanih populacija.

Zubatac (*Dentex dentex*)

U predmetnom istraživanju sakupljena je 151 jedinka zubaca u razdoblju od siječnja 2012. do svibnja 2013. godine. Uzorak je obuhvaćao jedinke različitog geografskog podrijetla pokrivajući područja sjevernog, srednjeg i južnog Jadrana. Također, uzorkovana je populacija iz Balearskog mora, kako bi se odredila što preciznija genetska struktura ispitivanih populacija (Slika 6). U sjevernom dijelu Jadrana uzorkovano je 36 jedinki u području otoka Paga i Krka, u srednjem dijelu Jadrana uzorkovano je 35 jedinki u području Baške vode, otočja Kornati i otoka Prvića, dok je u južnom Jadranu uzorkovano 15 jedinki u području Malog mora i poluotoka Pelješca. U Balearskom moru uzorkovano je 30 jedinki u području Alicantea.

Uzorci su analizirani sekvencioniranjem gena citokrom C oksidaze podjedinice 1 (COI) mitohondrijske DNK (mtDNK) kako bi se odredila genetska struktura ispitivanih populacija.



Slika 6. Geografski položaj uzorkovanih populacija zubaca *Dentex dentex*: SJEV_JAD, populacija sjevernog Jadrana; SR_JAD, populacija srednjeg Jadrana; SR_JAD-uzgoj, populacije iz uzgoja srednjeg Jadrana; JUŽ_JAD, populacija južnog Jadrana; SPA, populacija Balearskog mora.

3.2. Izdvajanje DNK

Izdvajanje ukupne DNK kod svih ispitivanih vrsta vršilo se po prilagođenom protokolu Laird i sur. (1991) za izolaciju DNK iz sisavaca korištenjem izopropanola. U plastične epruvete (Eppendorf, 2 ml) dodano je 200 μ l lizirajućeg pufera (engl. Lysis buffer) (1M Tris-HCl, 5M NaCl, 0.5M EDTA, 10% SDS, pH 7.5). Za svaki uzorak, škarama je usitnjeno oko 20 mg peraje i dodano u epruvetu s lizirajućim puferom gdje je naknadno stavljeno 4 μ l proteinaze K, koncentracije 20 mg/ml. Uslijedila je inkubacija od 12h na 55°C dok se tkivo potpuno ne razgradi. Nakon inkubacije, epruvete su centrifugirane 10 minuta na 2500 okretaja/minuti u mikrocentrifugi (Centrifuge 5415, Eppendorf). U novu epruvetu preneseno je 180 μ l supernatanta pazeći da se ne uzme talog te je dodano 200 μ L izopropanola. Nakon kratkog miješanja epruvete su ponovno centrifugirane 10 minuta na 2500 okretaja/minuti. Izopropanol je pažljivo izlijevan iz epruveta, a talog s DNK ispran je s 400 μ L 70% etanola. Nakon ručnog okretanja epruveta 2 do 3 puta, uslijedila je treća centrifuga od 10 minuta na 2500 okretaja/minuti. Konačno je cijeli etanol izliven, a epruvete okrenute naopačke i ostavljene da se suše sat vremena. Nakon sušenja DNK, dodano je 50 μ l TE pufera (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0), te su izolati ostavljeni preko noći na 4 °C radi otapanja DNK. Otopljena DNK pohranila se na -20 °C. Prije smrzavanja, koncentracija DNK izmjerena je spektrofotometrom (Eppendorf, Quiagen, Ilden, Germany) pri čemu je svakom uzorku određena potrebna količina DNK i TE pufera zbog ostvarenja radne koncentracije uzoraka potrebnu za PCR reakciju.

3.3. Genotipizacija mikrosatelitnih lokusa

U ovom istraživanju korištena su tri različita seta parova mikrosatelitnih početnica dizajniranih za vrste iz porodice Sparidae, Moronidae te Carangidae, optimizirana u združenu reakciju za svaku ispitivanu vrstu. Odabrane su iz različitih literaturnih navoda, pazeći na dužinski raspon svakog lokusa zbog mogućeg međusobnog preklapanja u združenoj reakciji i pazeći da svi lokusi imaju optimalno umnažanje na istoj temperaturi. Korišteni lokusi te svojstva parova početnica za svaku ispitivanu vrstu prikazani su u Tablicama 3,4 i 5.

F (forward) označava početnice koje se vežu na 5' kraju matrice lanca DNK, a R (reverse) označava početnice koje se vežu na 3' kraju lanca. Jedna od početnica za svaki lokus označena je fluorescentnom bojom koja se kovalentno veže na 5' kraju početnice. Upotrijebljeno je pet boja (najviše moguće): 6-FAM (plava), VIC (zelen), NED (žuta), PET

(crvena) i LIZ (narančasta). Dužinski standard GS500-Liz (Applied Biosystems) koji se dodaje PCR produktima, označen je s LIZ. Sve su početnice otapane u TE puferu (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) da bi se dobile „stock“ otopine koncentracije od 100 μ M, koje su čuvane na -20° C. Od „stock“ otopina naknadno se radila „radna“ otopina početnica (engl. primer mix), koja je sadržavala 16 ili 20 početnica ovisno o ispitivanoj vrsti u koncentraciji od 2 μ M.

Tablica 3. Popis istraživanih mikrosatelitnih lokusa za vrstu *Sparus aurata*

Lokus	Boja	Uzvodna i nizvodna početnica	Veličina alela (bp)	Izvor
SauK140INRA	5' 6-FAM	(F) CATGGCAACGGGGTAGGT (R) GTATGCTTGCAAGTGTATGTGTGTC	66-100	Launey i sur. 2003
SauD182INRA	5' 6-FAM	(F) GTCTCACACCAGATTCAAGACAGTA (R) GTTTACTTCTGTGTTTCATCTTCATCTCG	250-270	Launey i sur. 2003
SauH98INRA	5*NED	(F) AACTTAGCAGGGGGAGGCTA (R)GTTTCACAAGTGTGCTGAAAGATTACTGT	108-122	Launey i sur. 2003
PbMS2	5*VIC	(F) CTCGCGGTAGTTGTTTCACAGAGC (R) GCAACAATGGAGGGTTCGTCATC	126-165	Stockley i sur. 2000
SauI47INRA	5*VIC	(F) GCCAGCCAGGGTACGTC (R) GTTCCATATCATTACACTGTGGCTA	88-106	Launey i sur. 2003
Sal12	5*NED	(F) GTAACAATGGTAACGGGGAGTG (R) GTTTACCAGACAGCAAAACTGGAT	220-264	Brown i sur. 2005
PaGA2a	5*PET	(F) GACAGAGAGGGAGTGGATGTG (R) GTTTATCATCATCATCATCAGTCAGAGC	114-142	Adcock i sur. 2000
SauG46INRA	5' 6-FAM	(F) CAAGGTGTCGCCGTGTCT (R) GTTACTGCCAAGGTCAGAGTCACA	110-134	Launey i sur. 2003

Tablica 4. Popis istraživanih mikrosatelitnih lokusa za vrstu *Dicentrarchus labrax*

Lokus	Boja	Uzvodna i nizvodna početnica	Veličina alela (bp)	Izvor
Dla 0007	5' 6-FAM	(F) AGAAACTGAACTGACTGCTGC (R) CATTGTGTGTTTAGTGTAAATC	127-149	Tsigenopoulos i sur. 2003
Dla 12	5' 6-FAM	(F) GTATGTTGCCAGAGCCAAAGC (R) CAGACAAACTGTATGCCTGC	218-250	Ciftci i sur. 2002
Dla 0011	5' 6-FAM	(F) TCGGAGCTGATATTGTGCAG (R) CCCATTGTAACAGCAAGTTC	167-213	Tsigenopoulos i sur. 2003
Dla 0016	5*NED	(F) GTGACCGCAGATGAAGAAC (R) GTGTGGAGAGCTTTCTGAG	87-131	Chistiakov i sur. 2004

Dla 0020	5*VIC	(F) GTCTAATGAGCAGTGGAGCAG (R) GCATGTTAGATCCACCTCTTC	144-174	Chistiakov i sur. 2004
Dla 0008	5*VIC	(F) AAGCTATCTGATCTCGCTTG (R) ACGTGATTAAGTGTTTGAG	218-310	Tsigenopoulos i sur. 2003
Dla 0116	5*VIC	(F) CACAGCCGAAAATAATCCAG (R) AGACCGTAACACCTGCCAAC	202-210	Chistiakov i sur. 2004
Dla 0004	5*PET	(F) TCCTCCGTGAACTGAGAGC (R) CTGGCATCACAGGACACTGC	167-195	Tsigenopoulos i sur. 2003
Dla 0009	5*PET	(F) CAGGAAAGTCAGTCAAGCACA (R) TACACAACCATGGTCCATCC	219-261	Tsigenopoulos i sur. 2003
Dla 0119	5*PET	(F) GCAGGTTCAAATATTTTTGCTC (R) TCCTCCTTTTGCTTGCTAGG	112-138	Chistiakov i sur. 2004

Tablica 5. Popis istraživanih mikrosatelitnih lokusa za vrstu *Seriola dumerili*

Lokus	Boja	Uzvodna i nizvodna početnica	Veličina alela (bp)	Izvor
Sdu31	5' 6-FAM	(F) CACATTTGGACGGATTCTTC (R) GCTGTTATCCTCCAGTGCT	84-98	Renshaw i sur. 2007
Sdu36	5' 6-FAM	(F) CTGTTATGAAGCAGTGAAGAGG (R) GGACCATCCTGCTCTGACA	200-226	Renshaw i sur. 2007
Sdu41	5*NED	(F) AGCGTGGACAGTTTATGG (R) GTCTGTTTACTGGTCGCA	96-130	Renshaw i sur. 2007
Sdu46	5*NED	(F) GCAGTGTGAGCCATACATTAC (R) CTACAGGACAAAAGCCATT	217-259	Renshaw i sur. 2007
Sdu44	5*PET	(F) GGTAATGGGAGGTGTGAGTGT (R) CCTTCTCCTGTTAATCCATCTCC	114-124	Renshaw i sur. 2007
Sdu39	5*PET	(F) AGTGGCTTCTGCTGCTGT (R) CGTGTGCGTGCTTGTA	154-180	Renshaw i sur. 2007
Sdu 19	5*PET	(F) GCATTCTGGCATTAGCAT (R) GGTACTCTAGTTAGCCCTAC	236-272	Renshaw i sur. 2006
Sdu 10	5*PET	(F) CCAAGTCCTCCTGCTACTACCAT (R) CCTTGTGGATGACCTGTTG	295-346	Renshaw i sur. 2006

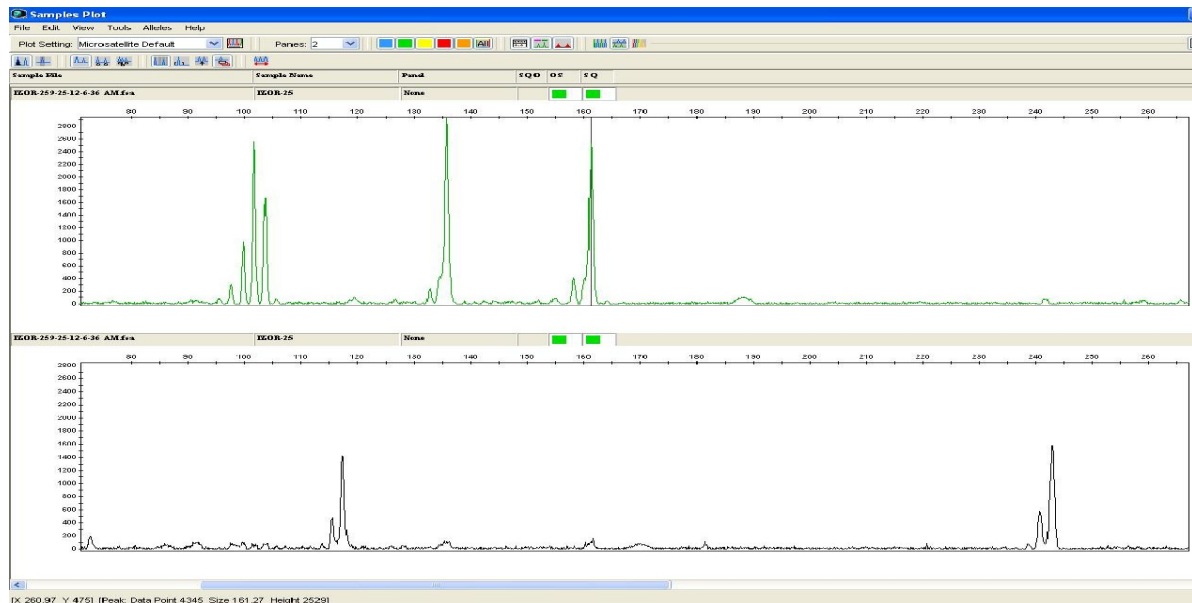
Lančana reakcija polimerazom. Združeno umnožavanje mikrosatelitnih regija provedeno je na uređaju GeneAmp 2700 Applied Biosystems. Sastav PCR otopine za umnožavanje mikrosatelita i volumeni sastojaka prikazani su u Tablici 6.

Tablica 6. Koncentracija i sastav PCR otopine za umnožavanje mikrosatelitnog motiva ukupnog volumena 12,5 µl. Sve otopine su od proizvođača „Qiagen“.

Reakcijska smjesa	Koncentracije u reakciji	Volumen u reakciji (µl)
dd H ₂ O		4
2xType-it Multiplex PCR Master mix	1 X	6,25
10xPrimer mix , 2 µM svake početnice	0.2 mM	1,25
DNK (5ng/µl)	20ng	1,00
Ukupno		12,5

Združena lančana reakcija polimerazom (engl. Multiplex Polymerase Chain Reaction, multiplex PCR) odvijala se prema sljedećim uvjetima: početna denaturacija 5 min na 95°C, 26 ciklusa umnažanja (svaki se sastoji od vremensko-temperaturnog profila: denaturacija 30 sec na 95°C, sparivanje početnica s kalupom 90 sec na 58°C za komarču i gofa te 60°C za lubina, produžavanje početnica 30 sec na 72°C) te završno produžavanje 30 min na 60°C. Nakon završetka PCR reakcije, uzorci su pohranjeni na 4°C do daljnje analize PCR proizvoda. Desetak nasumično odabranih PCR proizvoda provjereno je gel elektroforezom na 2.5%-tnom agaroznom gelu obojenom SyBr Sefe-om, da bi se vidjelo je li došlo do umnažanja fragmenata.

Genotipizacija. Ukupno 1 µl PCR produkta svakog uzorka pomiješano je s 9 µl mješavine formamida (deionizirani formamid denaturira DNK) (Applied Biosystems) i dužinskog standarda GeneScan 500-250 Liz (Applied Biosystems). Uzorci su podvrgnuti denaturaciji u uređaju Eppendorf MasterCycler EP Gradient tijekom 4 minute na 95° C i potom su se hladili na ledu. Denaturacijom se osiguralo da su svi PCR produkti u obliku jednolančanih molekula. Dužine alela mikrosatelitnih lokusa određene su pomoću 36-kapilarnog sekvenatora ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Program GeneMapper (Applied Biosystems) korišten je za analizu elektroferograma (ispis sekvenatora). Svaki elektroferogram (Slika 7) pregledalo je više osoba, radi izbjegavanja greške.



Slika 7. Detektirani fragmenti lokusa PbMS2, SauI47INRA, SauH98INRA i Sal12 u *Gene Mapper 4.0* softverskom paketu nakon elektroforeze u ABI Prism 310 genetičkom analizatoru

3.3.1. Statistička obrada molekularnih podataka

Ukupni broj alela (N), prosječan broj alela po lokusu (A), te zapažena heterozigotnost (H_o), očekivana heterozigotnost ili genetska raznolikost (H_E), izračunati su korištenjem računalnog programa POPGENE (Yeh i sur. 2000).

Postojanje nul-alela testirano je pomoću programa Micro-Checker version 2.2.3 (Van Oosterhout i sur. 2004), a u slučaju signifikantnog rezultata procijenjena je učestalost nul-alela. GENEPOP 4.0 (Raymond & Rousset 1992) je korišten za testiranje signifikantnosti odstupanja od Hardy-Weinbergove (HW) ravnoteže po svakom lokusu pojedinačno, kao i za sve lokuse zajedno (multilokusni test) pomoću metode Markovljevih lanaca (Guo & Thompson 1992). S obzirom da kromosomske lokacije korištenih mikrosatelitnih lokusa nisu poznate, a vezani geni imaju smanjenu upotrebljivost za neka populacijsko-genetska istraživanja, u gore navedenom programu testirana je procjena neravnoteže vezanosti gena (engl. linkage disequilibrium) pomoću Fisherovog egzaktnog testa algoritmom Markovljevog lanca (Guo & Thompson 1992).

Računalni program Fstat (Goudet, 2002) koristio se za izračun alelnog bogatstva (engl. allelic richness; A_r), kao mjera broja alela po lokusu neovisno o veličini uzorka, te za izračun koeficijenta križanja u bliskom srodstvu odnosno fiksacijskog indeksa (F_{IS}).

Protok gena između populacija određen je putem F_{ST} vrijednosti za ukupni set podataka i za sve parove populacija (Weir i Cockerham 1984), korištenjem programa Arlequin, ver. 3.1. Vrijednost testa kreće se u rasponu od 0 do 1; vrijednost bliža gornjoj granici raspona predstavlja populacije s visokim stupanjem genetske različitosti. Razdioba genetske varijacije između i unutar uzorkovanih populacija istražena je analizom molekularne varijance (AMOVA) i procjenom fiksacijskog indeksa (F_{ST}), korištenjem programa Arlequin, ver. 3.1. Statistička značajnost procijenjena je korištenjem 10 000 permutacija.

Procjena postojanja subpopulacija (postojanje strukturiranja unutar populacije) testirana je pomoću programa Structure 2.2 (Pritchard i sur. 2000). Model korišten u programu pretpostavlja postojanje određenog broja subpopulacija (K) koje karakterizira određena skupina frekvencije alela, no pri tome ne može sam odrediti koliko subpopulacija postoji već je potrebno postaviti preduvjete za različiti broj subpopulacija. Vrijednosti parametara korištenih u programu bile su 10 000 za „Length of Burnin Period” i 100 000 za „Number of MCMC Reps after Burnin”, s 20 ponavljanja svake K subpopulacije. Za procjenu postojanja subpopulacija u svim analiziranim populacijama, korišten je model „Admixture” s pretpostavkom postojanja od 1 do 4 subpopulacija za komarču, od 1 do 15 subpopulacija za lubina te od 1 do 6 subpopulacija za gofa. Najvjerojatniji broj subpopulacija (K) odabran je u skladu s *ad hoc* statističkim ΔK , na osnovu omjera promjene u logaritmiranoj vjerojatnosti podataka između uzastopnih K vrijednosti. Vizualizacija subpopulacija provedena je u programu DISTRUCT (Rosenberg, 2004).

Genetska udaljenost (Cavalli-Edwards, 1967), koja pretpostavlja da je glavnina genetskih razlika uzrokovana genetskim driftom između parova jedinki, izračunata je pomoću programa MSA (Dieringer i Schlötterer 2003). Neukorijenjeno filogenetsko stablo konstruirano je na osnovu dobivene matrice udaljenosti pomoću algoritma sparivanja susjeda (engl. Neighbor-Joining (N-J) algorithm), metodom koja se temelji na p -udaljenosti u potprogramu NEIGHBOR programskog paketa PHYLIP ver. 3.6b (Felsenstein, 1993). P -udaljenost predstavlja postotak razlika između populacija. „N-J” metoda proračunava matricu uparenih (engl. pairwise) udaljenosti između populacija, nakon čega konstruira stablo temeljeno na proračunima izvorne udaljenosti (Saitou i Nei 1987). „Bootstrap” poduzorkovanje ($n = 10\ 000$) provedeno je da bi se preciznije procijenila pouzdanost pojedinih skupina na dobivenom stablu, korištenjem konsenzus metode na specifičnim topologijama čija je učestalost pojavljivanja veća od 50%. Vrijednosti „bootstrap” analize koje prelaze 70%, odgovaraju vjerojatnosti većoj od 95% da je pronađena pouzdana filogenija

(Hills & Bull 1993). Neukorijenjeno N-J stablo izgrađeno je i vizualizirano u računalnom programu SEAVIEW 4 (Gouy i sur. 2010).

3.4. Citokrom C oksidaze podjedinice 1 (COI) mtDNK

Za gofa i zubaca, lančanom reakcijom polimerazom (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR) umnožen je fragment veličine 650 parova baza (engl. base pairs, bp) gena citokrom C oksidaze podjedinice 1 (COI) mitohondrijske DNK (mtDNK), uz korištenje početnica iz literature (Ward i sur. 2005) odnosno uzvodne početnice: 5' TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC 3' (FishF1) i nizvodne početnice: 5' TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA 3' (FishR1). Reakcijska smjesa je sadržavala 0,8 µM početnica, 1 x DreamTaq pufera, 2,5 mM MgSO₄, 2 mM dNTP mix-a, 1,25 U/ml DreamTaq DNK polimeraze (Fermentas) i 3 ng/µl DNK kalupa. PCR za dani fragment izveden je na termostatu GeneAmp 2700 Applied Biosystems prema sljedećim uvjetima: početna denaturacija 3 min na 95°C, 35 ciklusa umnažanja (svaki se sastoji od vremensko-temperaturnog profila: denaturacija 30 sec na 95°C, sparivanje početnica s kalupom 30 sec na 54°C, produžavanje početnica 60 sec na 72°C) i završno produžavanje 10 min na 72°C. Rezultati reakcije provjereni su gel elektroforezom na 2%-tnom agaroznom gelu obojanom SyBr Sefe-om, produkti su pročišćeni uz pomoć QIAquick PCR Purification Kit-a (Qiagen) te sekvencirani korištenjem ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit-a na ABI 3100 automatskom DNK sekvenator (Applied Biosystems) u oba smjera.

3.4.1. Analiza rezultata sekvencioniranja i izrada filogenetskog stabla

Dobiveni sljedovi nukleotida (sekvence) uspoređeni su i poravnati (engl. alignment) sa sljedovima nukleotida ostalih vrsta iz razreda Carangidae (*S. lalandi* EF609460.1, *S. dumerili* iz Južnog kineskog mora FJ237927.1, *S. dumerili* iz Egejskog mora KC501452.1) i Sparidae (*D. dentex* iz Egejskog mora KC500472.1, *D. macrophthalmus* iz Egejskog mora KC500492.1) pohranjenih u GenBank bazi podataka (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankSearch.html>), upotrebom programa Clustal X koji je integriran u računalni program za molekularnu genetičku analizu evolucije poravnanjem sekvenci DNK i proteina MEGA 3.1 (engl. Molecular Evolutionary Genetic Analysis, MEGA) (Kumar i sur. 2004), korištenjem zadanih postavki.

Genetska raznolikost je određena u programima DnaSP 5.0 (Librado i Rozas, 2009) i Arlequin 3.5 (Excoffier i sur., 2005) procjenom broja haplotipova (H), polimorfni mjesta (S),

raznolikosti haplotipova (h , genska raznolikost; Nei, 1987), nukleotidne raznolikosti (π ; Nei, 1987) i srednjeg broja razlika između parova slijedova (k , Tajima, 1983). Mjere genetske raznolikosti izračunate su za kompletan uzorak sekvenci i posebno za populacije.

Za potrebe filogenetske analize i rekonstrukcije filogenetskog stabla korištena je Bayesian Inference (BI) analiza (Larget i Simon 1999) koja računa pozadinsku vjerojatnost pojave pojedinog filogenetskog stabla preko simulacije Markovljevog lanca Monte Carlo (MCMC), implementirane u računalnom programu MrBayes v3.1.2. (Huelsenbeck & Ronquist 2001). U Modeltest programu (<http://darwin.uvigo.es/software/modeltest.html>), metodom najveće vjerojatnosti određen je evolucijski model „General Time Reversible” koji najbolje opisuje evolucijske promjene na danim sekvencama. Filogenetsko stablo konstruirano je uz pomoć računalnog programa Treeview (Page, 1996).

Filogenetski odnosi haplotipova vrste *S. dumerili* i *D. dentex* rekonstruirani su mrežom spajanja vrijednosti (*median-joining network*) mutacija u programu Network v4.5.1.6 (<http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>) (Bandelt i sur., 1999). Navedeni program služi za rekonstrukciju najjednostavnijih i najkraćih filogenetskih stabala i mreža iz istraživanog seta sekvenci, te za utvrđivanje pravih i potencijalnih osnivača (predaka), evolucijskih grananja i procjenu povijesnog vremena razdvajanja haplotipova.

3.5. Morfometrijska analiza uzgojne i divlje komarče *Sparus aurata*

Na uzgojnim i divljim populacijama komarče, uzorkovanim u akvatoriju Malostonskog zaljeva, izvršene su morfometrijske analize kako bi se utvrdile fenotipske razlik između danih populacija. Pri analizi morfometrijskih osobina pristupilo se korištenju:

- a) Klasične metode odnosa
- b) Metode vezane mreže (engl. *truss network*).

Klasična metoda odnosa

Klasična metoda odnosa (Tablica 7) temelji se na pravocrtnim udaljenostima među točkama, gdje se mjerene morfometrijske tjelesne osobine uspoređuju s odgovarajućom tjelesnom veličinom radi dobivanja relativnih odnosa (u %). Stoga su one tjelesne osobine mjerene na glavi (predočni prostor, promjer oka, zaočni prostor) izražene u odnosu na dužinu glave, dok su sve ostale tjelesne veličine izražene u odnosu na standardnu dužinu tijela. Opisan je i odnos standardne i ukupne tjelesne dužine (LS/LT). Ukupno je analizirano 18 tjelesnih odnosa.

Klasična metoda odnosa pokazala se posebno prikladnom za utvrđivanje ekoloških utjecaja na morfologiju riba jer može prikazati vrlo malu razliku između dviju udaljenijih vrsta sličnog općeg izgleda koje obitavaju u sličnim ekološkim uvjetima, te znatniju razliku sa srodnom vrstom koja nastanjuje drukčiji biotop.

Metoda vezane mreže

Metodom vezanih mreža (engl. *truss network*) mjere se elementi oblika koji su temeljeni na linearnim mjerenjima između homolognih ključnih anatomskih točaka (Tablica 8). Ona pokriva cijelu ribu u uniformnu mrežu čime se teoretski povećava vjerojatnost ekstrakcije morfometrijskih razlika između genetskih bliskih populacija ili taksona riba. Uniformna mreža morfometrijskih obilježja na dvodimenzionalni obris ribe trebala bi dati mnogo više informacija nego konvencionalni set mjerenja (Treer, 1993, 1995). Analizirano je ukupno 27 dužina pomoću 12 homolognih točaka.

3.5.1. Statistička analiza

Klasična metoda odnosa

Statistička analiza provedena je primjenom računalnih programa Statistica ver. 7 i Gpower ver. 3. Za procjenu statističke značajnosti razlika fenotipskih obilježja između divljih i uzgojnih jedinki odabran je parametrijski nezavisni t – test. Smatra se da je razlika između dviju aritmetičkih sredina statistički značajna ako je dobivena razlika veća od kritične vrijednosti $\pm 1,97$.

Primjenom Cohenovog d indeksa izračunata je veličina učinka (eng. *effect size*) za utvrđene statističke razlike fenotipskih obilježja. To je standardizirana mjera procjene razlika između dviju aritmetičkih sredina i jedinica standardne devijacije. Vrijednost Cohenovog d indeksa određena je sljedećom skalom: 0,2 – mala veličina učinka; 0,5 – srednja veličina učinka; 0,8 – velika veličina učinka.

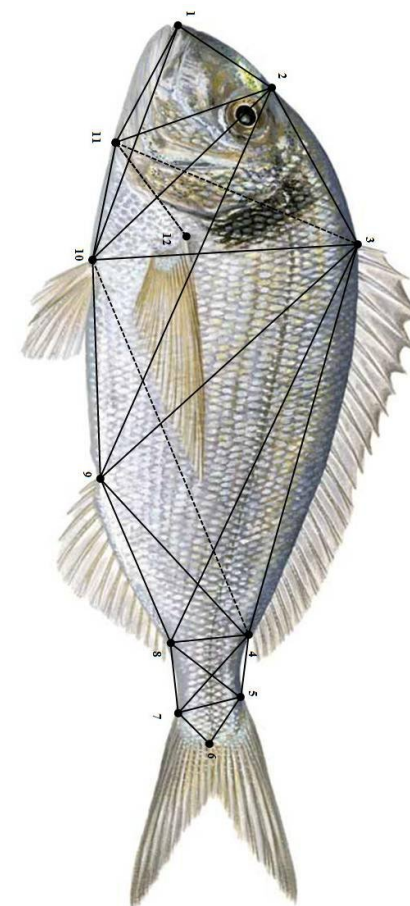
Također, pristupilo se i provedbi statističke snage testa (Gpower ver. 3) kako bi se izbjegla vjerojatnost odluke o odbijanju nul hipoteze kada je ona zapravo istinita. Ona predstavlja mjeru vjerojatnosti da će istraživač u uzorku naći statističku značajnost ako takav učinak postoji u populaciji koju ispituje. Snaga testa je ovisna o veličini uzorka, veličini učinka, razini značajnosti i snazi korištenog testa. Ukoliko je njena vrijednost $\geq 0,80$ onda se za promatrani nezavisni t – test smatra da ima dovoljnu snagu.

Tablica 7. Shematski prikaz tijela komarče *Sparus aurata* s naznačenim tjelesnim veličinama.

KLASNIČNA METODA ODNOSA	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Ukupna dužina tijela (LT) – dužina od vrha gubice do natrag savijene repne peraje; 2. Standardna dužina tijela (LS) – dužina od vrha gubice do kraja tijela; 3. Predpodrepna (preanalna) udaljenost (PA) – udaljenost od vrha gubice do početka podrepne (analne) peraje; 4. Dužina glave (C) – dužina od vrha gubice do kraja škržnog poklopca; 5. Najveća visina tijela (H); 6. Najmanja visina tijela (h) – visina repnoga drška; 7. Dužina trupa (LTR) – udaljenost od kraja škržnog poklopca do analnog otvora; 8. Dužina repa (LCA) – udaljenost od izmetnog otvora do natrag savijene repne peraje; 9. Dužina repne (kaudalne) peraje (LC); 10. Dužina osnovice leđne (dorzalne) peraje (LD); 11. Dužine prsnih (pektoralnih) peraja (LP); 12. Dužine trbušnih (ventralnih) peraja (LV); 13. Dužina osnovice podrepne (analne) peraje (LA); 14. Dužina repnoga drška (PC) – udaljenost od kraja leđne peraje do početka repne peraje; 15. Visina leđne peraje (D1); 16. Visina podrepne (analne) peraje (A1); 17. Predočna (preorbitalna) udaljenost (POC) – udaljenost od vrha gubice do prednjeg ruba oka; 18. Promjer oka (O); 19. Izaočna (postorbitalna) udaljenost (ZOC) – udaljenost od stražnjeg ruba oka do početka leđne peraje 	

Tablica 8. Shematski prikaz tijela komarče *Sparus aurata* s naznačenom mrežom (modificirano prema Arechavala – Lopez i sur, 2011).

METODA VEZANIH MREŽA		
	Kod	Dužina
1. Vrh premaksile;	A1	1 – 2
2. Točka najveće zakrivljenosti u profilnoj regiji glave;	A2	2 – 10
3. Anteriorni dio dorzalne peraje;	A3	10 – 11
4. Posteriorni dio dorzalne peraje;	A4	1 – 11
5. Dorzalna točka početka kaudalne peraje;	A5	1 – 10
6. Posteriorni ekstremitet lateralne linije;	A6	2 – 11
7. Ventralni točka početka kaudalne peraje;	B1	2 – 3
8. Posteriorni dio analne peraje;	B2	3 – 9
9. Anteriorni dio analne peraje;	B3	9 – 10
10. Anteriorni dio trbušne peraje;	B4	2 – 9
11. Operkulum;	B5	3 – 10
12. Dorzalni dio prsne peraje.	B6	3 – 11
	C1	3 – 4
	C2	4 – 8
	C3	8 – 9
	C4	3 – 8
	C5	4 – 9
	C6	4 – 10
	D1	4 – 5
	D2	5 – 7
	D3	7 – 8
	D4	4 – 7
	D5	5 – 8
	E1	5 – 6
	E2	6 – 7
	F1	1 – 12
	F2	11 – 12



Metoda vezanih mreža

Statistička analiza provedena je primjenom računalnog programa SPSS ver. 17. Prije same obrade podataka metodom vezane mreže na podacima je izvršena alometrična transformacija po Reistu (1985), kako bi se uklonio utjecaj različitih veličina tijela u uzorkovanim populacijama na morfometrijske mjere s obzirom da heterogenost veličina standardne dužine tijela uvjetuje i heterogenost u mjerama.

Podaci su nadalje analizirani multivarijatnom metodom odnosno analizom glavnih komponenti (eng. *Principal Component Analysis – PCA*) s ciljem određivanja minimalnog broja latentnih (glavnih komponenti) varijabli koje objašnjavaju maksimalno moguću ukupnu varijancu manifestnih varijabli (eng. *eigenvalue*), komponente opterećenja (eng. *PC loadings*) korelacijske matrice manifestnih varijabli te komponentnih bodova (eng. *PC scores*) manifestnih varijabli.

Prikladnost korelacijske matrice za analizu glavnih komponenti ispitana je pomoću Keiser-Meyer-Olkinovog testa (eng. *KMO of Sampling adequacy*) i Bartettovog testa (eng. *Bartlett's test of Sphericity*). Kako bi se odredio adekvatan broj komponenti koje nose najveći dio informacija sadržanih u polaznom sustavu varijabli, odabran je Kaiserov kriterij prema kojem se uzimaju samo one glavne komponente kojima odgovaraju svojstvene vrijednosti veće od 1. Također, korištena je Kaiserova varimax ortogonalna rotacija, koja teži dati veliko komponentno opterećenje (velike korelacije između komponenti i varijabli) za svaku pojedinu komponentu malom broju polaznih varijabli. U ovom radu uzeta su ona opterećenja polaznih varijabli čija je vrijednost veća od 0,55 (55%).

Diskriminatna analiza, kao multivarijatna metoda, korištena je za identifikaciju fenotipskog karaktera uzgojnih i divljih populacija komarči. Korištena je "Forward Stepwise diskriminatna analiza" upotrebom metode Mahalanobisove uopćene udaljenosti (eng. *Mahalanobis Generalized Distance*) s obzirom da je to jedno od najpouzdanijih mjerila udaljenosti između dvije populacije te se njome rješavaju problemi koreliranih svojstava i ovisnosti o skali mjerenja. Time se nastojalo dobiti set prediktora koji najbolje diskriminiraju divlje i uzgojne jedinke komarče.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Komarča *Sparus aurata*

Za potrebe određivanja genetske strukture divljih i uzgojnih komarči u istočnom dijelu Jadranskog mora, odnosno u području južnog Jadrana (Malostonski zaljev), gdje je pretpostavka da uzgojne populacije imaju znatan utjecaj na autohtonost divljih populacija, uspješno je genotipizirano 30 jedinki iz uzgoja francuskog porijekla, 50 divljih jedinki te 30 divljih jedinki iz područja srednjeg Jadrana, dakle populacija koja u predmetnom istraživanju ima ulogu referentne populacije.

Opisna statistika i testiranje Hardy-Weinbergove ravnoteže

Svi istraživani mikrosatelitni lokusi komarče bili su polimorfni. Na 9 istraženih mikrosatelita utvrđena je prisutnost od 216 alela, odnosno prosječna brojnost alela po populaciji iznosila je 72.6 (± 23.7) dok je po ispitivanim lokusima iznosila 9.5 (± 4.4). Najveći broj alela imao je lokus SauD69 s prosječnom učestalošću od 16.3 \pm 5.5 po populaciji, a najveći broj alela (20) danog lokusa opažen je u divljoj populaciji komarče iz Malostonskog zaljeva. Najmanji broj alela imao je lokus SauH98 s prosječnom učestalošću od 3 \pm 1.7 po populaciji, a najmanji broj alela (2) danog lokusa opažen je kod uzgojne populacije Malostonskog zaljeva te divlje populacije srednjeg Jadrana. Među uzorcima komarči iz uzgoja utvrđena je prisutnost 3 alela koja se nisu javila u ostalim ispitivanim populacijama (*privatni aleli*), u uzorcima divljih komarči iz Malostonskog zaljeva utvrđena je prisutnost čak 14 privatnih alela dok je kod uzoraka divlje komarče iz srednjeg Jadrana pronađeno 8 privatnih alela. Isprekidana odnosno disjunktna distribucija alela uočena je na 7 lokusa, dok je na lokusima SauD182 i PbMS2 distribucija alela bila kontinuirana.

Parametri genetske raznolikosti uzgojnih i divljih komarči prikazani su Tablici 9. Srednja vrijednost zapažene heterogenosti (genetske raznolikosti) svih ispitivanih populacija komarči iznosila je 0.68 \pm 0.2, dok je očekivana heterozigotnost iznosila 0.78 \pm 0.1, slično prethodnim istraživanjima za atlantske i sredozemne populacije (Alarcón i sur. 2004; Karaiskou i sur. 2009, Šegvić-Bubić i sur. 2011). Kod uzgojne populacije uočena je najniža genetska raznolikost. Također, značajno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže je uočeno kod uzgojne populacije i to na lokusima SauD182, PbMS2 i SauD69, te kod divlje populacije iz Malostonskog zaljeva i to na lokusima SauK140, SauG46, SauH98 i SauD69. Svi lokusi kod referentne populacije iz srednjeg Jadrana su bili u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži.

Odstupanja od Hardy-Weinberg ravnoteže mogu biti izravna posljedica nenasumičnog križanja jedinki ili križanja populacija različitog geografskog podrijetla, prirodne

selekcije ili netočno identificiranih genotipova (Ward, 2006). Ne-nasumično križanje nastalo zbog križanja u bliskom srodstvu populacije niske efektivne veličine, tipičan je scenarij u mrjestilištima u kojima ne postoji kontrola matičnih genotipova. Štoviše, problem ne-nasumičnog križanja pogotovo je naglašen u matičnjacima komarče, gdje u kontroliranoj reprodukciji svojstvo protoandričnog hermafroditizma omogućava korištenje iste jedinke prvo kao mužjaka, a kasnije kao ženke (Borrell i sur. 2007; Karaiskou i sur. 2009). Zbog ovakvog obrasca upravljanja matičnjacima komarče, u ovom je istraživanju potvrđen niži prosječni broj alela po lokusu (7.8 ± 3.8) kod uzgojnih populacija u usporedbi s prirodnim populacijama (10.9 ± 4.7 te 10 ± 4.8) te najviši fiksacijski indeks odnosno vrijednost koeficijenta križanja u srodstvu koji je iznosio 0.141 .

Uočeni višak homozigotnosti i posljedično odstupanje od Hardy-Weinberg ravnoteže kod divlje populacije iz Malostonskog zaljeva može se pripisati Wahlund-om učinkom koji nastaje zbog uzorkovanja jedinki različitih subpopulacija i s različitim alelnim frekvencijama (Rosenberg i Calabrese 2004). Takav scenarij moguć je u situaciji kad je genetski međudnos uzgojnih i prirodnih populacija započeo, ali s još nepotpuno ukrižanim genotipovima.

Osim za uočenu i očekivanu heterozigotnost, uzorci iz uzgoja očituju niže vrijednosti za sve ostale istražene mjere genetske raznolikosti - alelnu bogatstvo i broj efektivnih alela po lokusu (Tablica 9).

Tablica 9. Opisna statistika genetske raznolikosti prirodnih i uzgojnih populacija komarče *Sparus aurata* iz istočnog dijela Jadranskog mora

Populacije oznake	Pop. tip	<i>N</i>	Alelna raznolikost			Heterozigotnost		
			<i>A</i>	<i>A_e</i>	<i>A_r</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>F_{IS}</i>
UKM	Uzgoj	58	7.8 ± 3.8	4.8 ± 1.9	7.4 ± 3.5	0.65 ± 0.2	0.75 ± 0.1	0.141
DKM	Prirodni	100	10.9 ± 4.7	5.3 ± 2.9	9.0 ± 3.6	0.69 ± 0.2	0.77 ± 0.1	0.104
DKS	Prirodni	58	10.0 ± 4.8	5.7 ± 3.0	9.5 ± 4.4	0.69 ± 0.3	0.78 ± 0.1	0.122
Ukupno		216	12.8 ± 6.1	5.7 ± 2.9	9.5 ± 3.8	0.68 ± 0.2	0.78 ± 0.1	

UKM, uzgojne komarče iz Malostonskog zaljeva; DKM, divlje komarče iz Malostonskog zaljeva; DKS, divlje komarče iz srednjeg Jadrana. . *N* = ukupan broj alela; *A* = prosječan broj alela po lokusu; *A_e* = broj efektivnih alela po lokusu; *A_r* = alelnu bogatstvo; *H_o* = zapažena heterozigotnost; *H_e* = očekivana heterozigotnost; *F_{IS}* = fiksacijski indeks.

Udaljenost između jedinki i populacija

Fiksacijski indeks F_{ST} , kao mjera protoka gena odnosno genetske diferencijacije populacija komarči, iznosio je 0.017 sa značajnom p -vrijednošću od 0.005, što upućuje na nisku genetsku strukturiranost odnosno na postojanje znatnog protoka gena između ispitivanih populacija. Vrijednost indeksa je ispod prosjeka za skupinu morskih riba (0,062; Ward, 2006). Test usporedbe genetske diferencijacije između parova populacija je potvrdio najveći protok gena između uzgojnih i divljih populacija Malostonskog zaljeva (0.019) te između divljih populacija južnog i srednjeg Jadrana (0.011) (Tablica 10). S obzirom da je protok gena u negativnom korelacijskom odnosu s F_{ST} vrijednošću, za pretpostaviti je da će populacije bez fizičkih i ekoloških barijera u Jadranu kao i na Sredozemlju biti manje heterogene odnosno genetski sličnije. Genetski najudaljeniji par populacija sa značajnom p -vrijednošću bila je populacija iz uzgoja naspram divlje populacije srednjeg Jadrana (0.03). Sličan odnos populacija je potvrđen analizom Cavalla-Sforza i Edwards (1967) chord genetske udaljenosti (Slika 8).

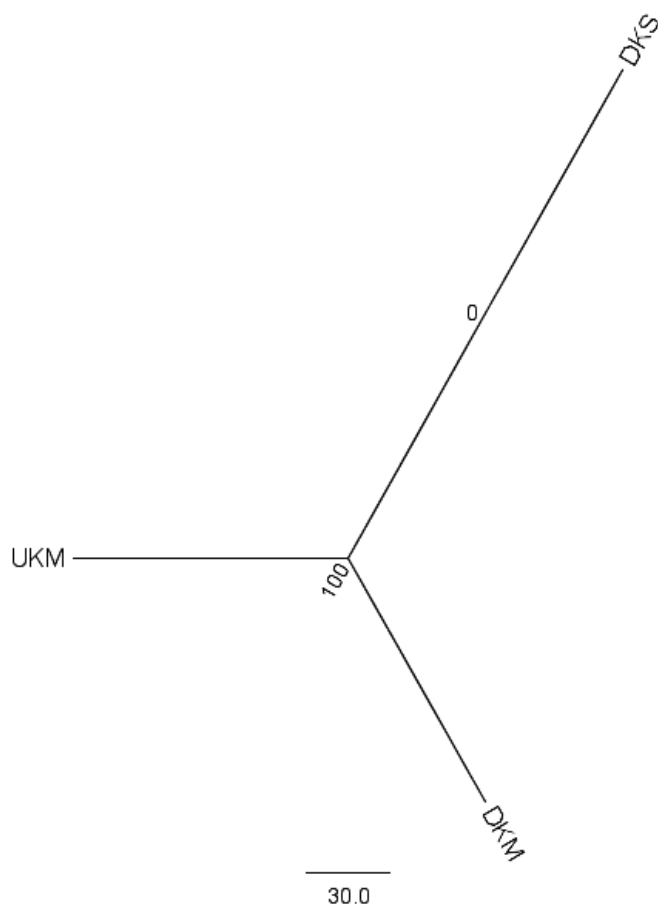
Tablica 10. Vrijednosti F_{ST} parametara (ispod dijagonale) i genetske udaljenosti [Cavalla-Sforza i Edwards (1967) chord udaljenost] između tri populacije komarči iz istočnog dijela Jadrana.

	UKM	DKM	DKS
UKM		0.30	0.33
DKM	0.019		0.26
DKS	0.030*	0.011	

UKM, uzgojne komarče iz Malostonskog zaljeva; DKM, divlje komarče iz Malostonskog zaljeva; DKS, divlje komarče iz srednjeg Jadrana. * = značajna različitost nakon parcijalne Bonferroni korelacije

Rezultate fiksacijskog indeksa između populacija potvrdila je i razdioba genetske varijance utvrđena analizom molekularne varijance (AMOVA, Tablica 11). Iako je fiksacijski indeks F_{ST} između ispitivanih populacija bio značajan, 85.5% varijabilnosti je pripisano razlikama na razini svih jedinki, a svega 1.85% je pripisano razlikama na razini populacije. Ovakva heterogena genetska struktura populacija, koja je rezultat heterogenih genotipskih frekvencija istraživanih lokusa komarče, već je uočena na populacijama iz Sredozemlja i Atlantika (Alarcón i sur. 2004, Karaïskou i sur. 2009). Alarcón i sur. (2004) tvrde da je visoka izmjena migranata, prvenstveno prebjega iz akvakulture, osnovni uzrok niske strukturiranosti populacija, kao i velika efektivna subpopulacijska veličina. Također, takvu

situaciju može potaknuti znatan broj migranata, koji prelazi minimalne procjene potrebne za suprotstavljanje učincima genetskog drifta (Slatkin, 1985), sprječavajući jačanje genetske strukturiranosti populacija.



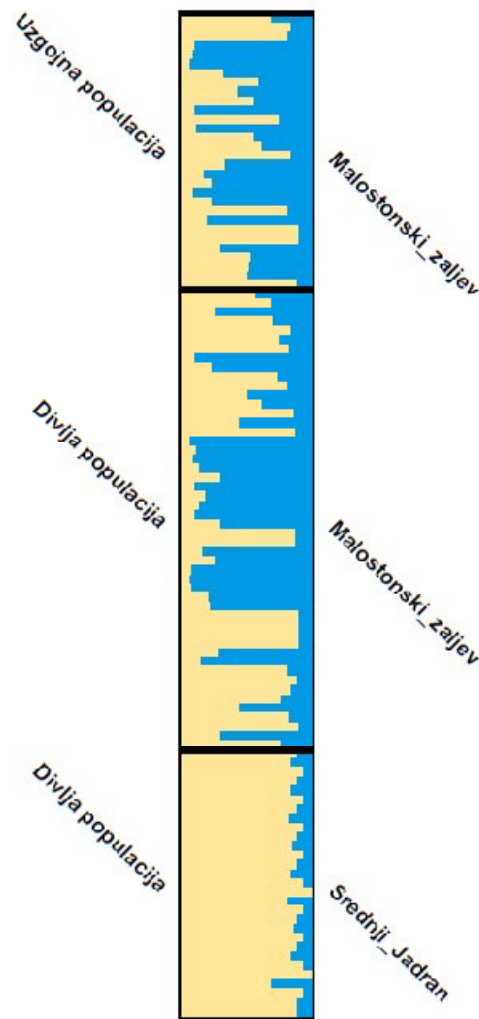
Slika 8. Nezakorijenjeno filogenetičko stablo izrađeno pomoću algoritma sparivanja susjeda na osnovi Cavalla-Sforza i Edwards chord genetske udaljenost populacija komarči *S. aurata*

Tablica 11. Rezultati analize molekularne varijance (AMOVA) prikazuju razdiobu genetičke varijance između ispitivanih populacija komarče

Izvor varijacije	d.f.	% varijacije	<i>P</i> -vrijednost
Između svih populacija	2	1.85 (F_{ST} : 0.017)	0.005
Unutar populacije	106	12.63 (F_{IS} : 0.120)	< 0.001
Između svih jedinki	109	85.52 (F_{IT} : 0.134)	< 0.001

Procjena postojanja subpopulacija

Algoritmom programa STRUCTURE (Pritchard i sur. 2000) koji procjenjuje broj izvornih populacija na temelju kojih su nastale uzorkovane populacije istočnog Jadrana koristeći Bayesijski pristup obrade frekvencija ispitivanih alela, odnosno određuje skupinu genetski sličnih jedinki bez prethodnog znanja o njihovom srodstvu, utvrđeno je postojanje dvije izvorne populacije (Slika 9). Referentnu populaciju iz srednjeg Jadrana je sačinjavala izvorna populacija 1 (žuta boja) i to s 85% genotipova, dok su populaciju iz uzgoja i divlju populaciju Malostonskog zaljeva sačinjavale izvorna populacija 1 (žuta) i 2 (plava) u skoro jednakim omjerima (48:52 za uzgoj, 50:50 za divlje). Izneseni rezultati dokazuju snažan genetski utjecaj prebjega na lokalne-divlje populacije i na njihovo međusobno križanje u prirodnom okolišu.



Slika 9. Posteriorna vjerojatnost pripadanja jedinki iz uzorkovanih populacija komarči *S. avarata* pretpostavljenim izvornim populacijama

Zanimljivo je to što je u posljednjih deset godina primijećen značajan porast populacija divljih komarči u obalnim područjima istočnog Sredozemlja, što se o nedavno povezuje s mrijestom uočenim unutar kaveza za uzgoj, koji posljedično dovodi do većeg novačenja „divljih” stokova komarče. Također, Dimitriou i sur. (2007) uočili su udvostručenje populacija divlje komarči unutar lagune Messolonghi u Grčkoj, te su takvu populacijsku ekspanziju povezali s nedavnom primjenom produženog ciklusa uzgoja (3 godine) koji omogućava spolno sazrijevanje ženki u zatočeništvu. Slično tome, u delti rijeke Neretve uočeno je povećanje ulova komarče na 150 tona godišnje, što potvrđuje hipotezu o međudnosu prebjega i prirodnih populacija, kao i rezultate ovog istraživanja.

Morfometrijska analiza uzgojne i divlje komarče

Za potrebe ovog istraživanja, na uzorcima divlje i uzgojne komarče iz Malostonskog zaljeva osim što je izvršena mikrosatelitna genotipizacija, također je izvršena morfometrijska analiza uzoraka, kako bi se na razini fenotipa i genotipa valorizirao utjecaj prebjega na divlje populacije komarči.

Za morfometrijsku analizu, ukupno je skupljeno i obrađeno 138 jedinki komarče. Broj divljih jedinki uzetih za biometrijska istraživanja putem klasične metode tjelesnih odnosa iznosio je 94 od čega je i za potrebe metode vezane mreže obrađeno njih 75. Broj uzgojnih jedinki za analizu biometrije obiju metoda iznosio je 44.

Klasičnom metodom tjelesnih odnosa ustanovljeno je 13 od 18 statistički značajnih razlika između divljih i uzgojenih komarči Malostonskog zaljeva. Upotrebom statističkih parametara veličine učinka i statističke snage testa utvrđeno je da su se na uzorku od 138 jedinki, od čega je 94 divljih i 44 uzgojne, razlikovne karakteristike kretale od srednjeg do velikog značenja. Gotovo svi odnosi su pokazivali srednje (h/LS, LC/LS, LA/LS, PC/LS) ili velike (PA/LS, H/LS, LP/LS, D1/LS, O/C, LTR/LS) vrijednosti Cohen – ovog indeksa, čime je za te odnose statistička snaga testa bila zadovoljavajuća ($> 0,80$) (Tablica 12, Slika 10).

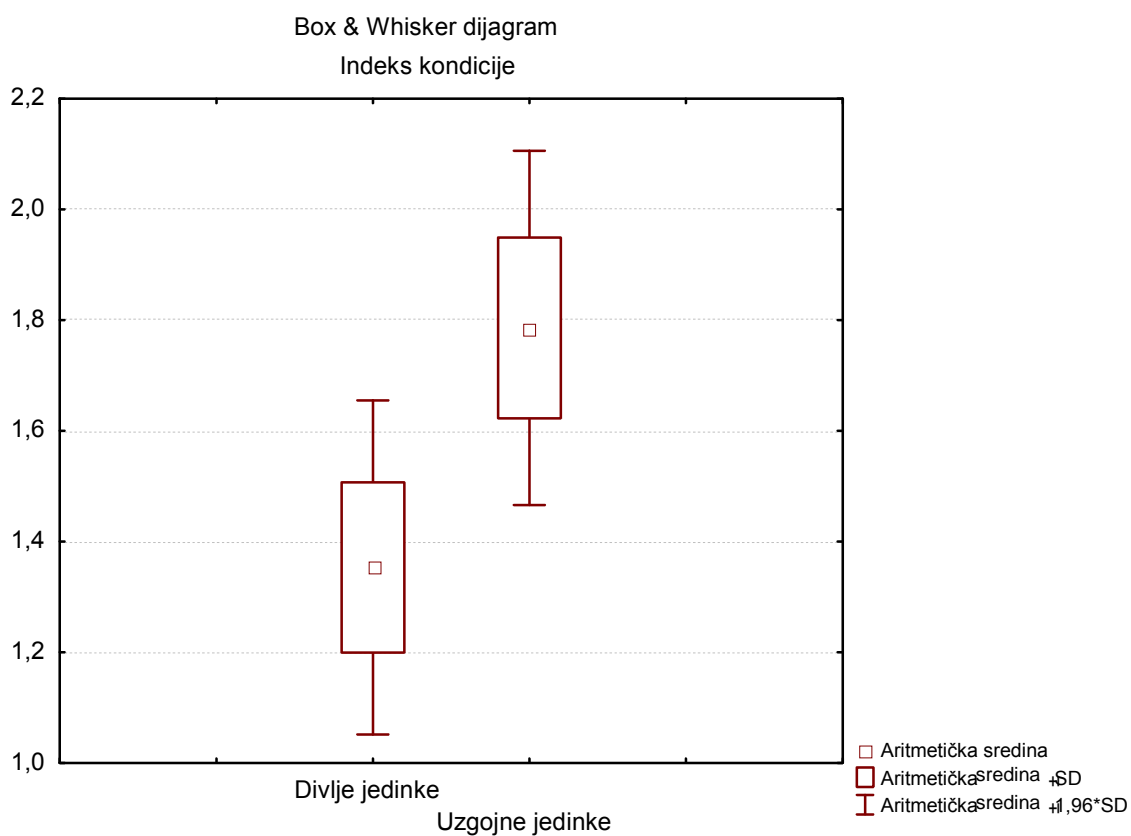
Morfometrijska analiza putem metode vezane mreže ukazuje da je većina razlika locirana uglavnom na anteriornom dijelu tijela, prvenstveno mjerama glave i visine tijela (B5, A2 B6, A5, A6, A3), repnoga drška (E1 i E2) te trupno – repne regije (C4 i B4).

Dakle, tjelesna morfologija uzgojnih jedinki karakterizirana je zdepastim tijelom s plosnatijim profilnim oblikom glave te kraćim perajanim dimenzijama u odnosu na izduženije tijelo divljih jedinki komarči s manjom tjelesnom visinom. Najveće razlike uočene su na prsnim perajama, visini leđne peraje, najvećoj tjelesnoj visini, predreпноj udaljenosti, trupu, promjeru oka i indeksu kondicije

Tablica 12. Zbir tjelesnih odnosa koji su se statistički značajno razlikovali između divljih i uzgojnih komarči Malostonskog zaljeva na osnovi korištenja klasične metode odnosa.

Morfometrijsko obilježje	LP/LS	D1/LS	H/LS	PA/LS	O/C	PC/LS
Veličina učinka	2,35	2,10	1,01	0,98	0,80	0,74
Statistička snaga	1,00	1,00	0,99	0,99	0,99	0,98
	LA/LS	h/LS	LC/LS	A1/LS	LV/LS	LCA/LS
Veličina učinka	0,71	0,66	0,52	0,50	0,50	0,50
Statistička snaga	0,97	0,94	0,80	0,78	0,77	0,77

Puna nazivlja skraćenica vidi u dijelu Materijala i metoda



Slika 10. Prikaz indeksa kondicije divljih i uzgojnih komarči Malostonskog zaljeva koja su se statistički značajno razlikovala ($p < 0.05$).

Prema diskriminativnoj analizi originalnom raspodjelom 86,6 % uzorkovanih jedinki točno je klasificirano u divlje ili uzgojno podrijetlo, dok unakrsna validacija pokazuje da je točnost te raspodjele 84,0 % (Tablica 13). Svrstavanje pojedinih divljih jedinki u uzgojno podrijetlo upućuje na mogućnost da se radi o prebjezima. Genetička bliskost divljih jedinki Malostonskog zaljeva i uzgojnih jedinki francuskog podrijetla vjerojatno je razlog što je originalnom raspodjelom 9 od 75 odnosno 12 od 75 unakrsnom validacijom klasificirano kao jedinke uzgojnog podrijetla. Navedenu hipotezu podupiru rezultati istraživanja Loya i sur. (1999), koji su ustanovili da francuske uzgojne jedinke imaju blago zaokruženi dio posteriorne regije glave (od početka leđne peraje do točke najveće zakrivljenosti u anteriornoj regiji glave), dulji trupni dio i kraće analne peraje u odnosu na španjolske uzgojne jedinke. Ovi rezultati se poklapaju s dobivenim rezultatima u ovom istraživanju, gdje su uzgojne jedinke imale veće mjere trupa (B3), ali manje mjere obilježja glave (A1 i B1). Ako se uzme u obzir da u Malostonskom zaljevu djelatnost kaveznog uzgoja traje više od 20 godina, onda je jasno da je tijekom tog perioda došlo do interakcije prebjega s lokalnim populacijama što je rezultiralo fenotipskom bliskošću divljih i uzgojnih stokova.

Ustanovljene sličnosti u morfološkim obilježjima između divlje i uzgojne komarče dijelom su rezultat i fenotipske plastičnosti riba. Upravo su Rogdakis i sur. (2011) pokazali da je potrebno 6 do 7 mjeseci ribolovno – uzgojnim (poribljavanje) komarčama da poprime većinu morfoloških obilježja divljih jedinki zbog promjene okoline i režima ishrane. Očito je to proces za čiju je prilagodbu potrebno vrijeme te je važno uočiti u kojem je ontogenetskom stadiju došlo do prebjega. Stoga morfološka istraživanja imaju ograničenu aplikaciju za one jedinke koje su prebjegle u različitim fazama ontogenetskog razvoja ili kroz jednu od drugih formi kao kroz mriješćenje uzgojnih jedinki unutar kaveza.

Klasična metoda tjelesnih odnosa pokazala se praktičnijom u raspoznavanju morfoloških razlika. Većina mjera ove metode su pozicionirane u odnosu na uzdužnu tjelesnu os s nekolicinom njih koje pokrivaju i širinu jedinke. Time je lakše bilo ustanoviti razlike između zdepastog i izduženog oblika tijela budući da se mjere izražavaju tjelesnim proporcijama. Međutim, metoda vezane mreže je pokazala kako jednakost tjelesnih proporcija kod divljih i uzgojnih jedinki ne znači da ne postoji morfološka razlika. To je najbolje demonstrirano na području glave gdje klasična metoda nije utvrdila statističke značajne razlike predočne i izaočne udaljenosti, no vezanom mrežom je konstatiran plosniji profil glave uzgojne jedinke u odnosu na divlje.

Upotrebom ovih dviju metoda dobila se potpunija slika morfoloških razlika te se njihova kombinirana upotreba preporučuje samo u daljnja znanstvena istraživanja slične problematike.

Tablica 13. Rezultati klasifikacije populacija komarči na osnovi morfometrijskih mjera korištenjem diskriminantne analize

Podrijetlo jedinki komarče Malostonskog zaljeva			Predviđena grupna pripadnost		Ukupno
			Divlje jedinke	Uzgojne jedinke	
Original	Broj	Divlje jedinke	66	9	75
		Uzgojne jedinke	7	37	44
	%	Divlje jedinke	88,0	12,0	100,0
		Uzgojne jedinke	15,9	84,1	100,0
Unakrsna validacija	Broj	Divlje jedinke	63	12	75
		Uzgojne jedinke	7	37	44
	%	Divlje jedinke	84,0	16,0	100,0
		Uzgojne jedinke	15,9	84,1	100,0

- 86,6% klasificirano originalnom raspodjelom.
- 84,0% klasificirano prema metodi unakrsne validacije.



Slika. Fenotipska raznolikost „divljih“ komarči u Malostonskom zaljevu

Lubin *Dicentrarchus labrax*

Za potrebe određivanja genetske strukture divljih i uzgojnih populacija lubina u istočnom dijelu Jadranskog mora, uspješno je genotipizirano 12 populacija različitog geografskog podrijetla i populacijskog karaktera, odnosno jedinke iz prirodnih populacija, uzgojnih populacija, te iz mrjestilišta, pokrivajući tako područje sjevernog i srednjeg Jadrana (Slika 4, Tablica 2).

Opisna statistika i testiranje Hardy-Weinbergove ravnoteže

Svi su istraživani mikrosatelitni lokusi lubina bili polimorfni. Na 10 istraženih mikrosatelita utvrđena je prisutnost od 675 alela, odnosno prosječna brojnost alela po populaciji je iznosila 111.3 (± 22.4) dok po ispitivanim lokusima je iznosila 11.4 (± 4.1). Najveći broj alela je imao lokus D1a0008 s prosječnom učestalošću od 19.5 ± 3.5 po populaciji, a najveći broj alela (28) danog lokusa je opažen u divljoj populaciji lubina iz Piranskog zaljeva. Najmanji broj alela imao je lokus D1a0116 s prosječnom učestalošću od 5.7 ± 0.6 po populaciji, a najmanji broj alela (5) danog lokusa je opažen u uzgojnoj populaciji Piranskog zaljeva te divljim populacijama srednjeg Jadrana. Unutar populacije lubina iz uzgoja na o. Ugljanu (hrv. porijeklo) utvrđena je prisutnost najvećeg broja alela (5) koja se nisu javila u ostalim ispitivanim populacijama (*privatni aleli*), dok populacije iz Novigradskog mora i o. Paga nisu sadržavali privatne alele. Isprekidana odnosno disjunktna distribucija alela uočena je na 9 lokusa, dok je na lokusu D1a12 distribucija alela bila kontinuirana.

Parametri genetske raznolikosti populacija lubina prikazani su Tablici 14. Srednja vrijednost zapažene heterogenosti (genetske raznolikosti) svih ispitivanih populacija lubina iznosila je 0.76 ± 0.1 , dok je očekivana heterozigotnost iznosila 0.88 ± 0.1 , slično prethodnim istraživanjima za atlantske i sredozemne populacije gdje su korišteni mikrosateliti kao genetski biljeg (Castilho i Ciftci, 2005; Garcia De Leon i sur. 1997, Naciri i sur., 1999). Kod uzgojne populacije je uočena najniža genetska raznolikost i to izrazito kod uzgojnih populacija atlantskog porijekla (UL-Ugljan-FRA, UL-Brač-FRA). Također, značajno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže je uočeno kod dviju spomenutih uzgojnih populacije i to na svim lokusima izuzev D1a12, D1a0020 i D1a0116 lokusa za UL-Ugljan-FRA populaciju, te izuzev D1a0020, D1a0116 i D1a0004 lokusa za UL-Brač-FRA populaciju. Od divljih populacija jedino je populacija iz Novigradskog mora (DL-Novigrad) pokazala značajno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže i to na lokusima D1a0011, D1a0008 i D1a0119. Sve ostale ispitivane populacije su bile u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži (Tablica 14).

Tablica 14. Opisna statistika genetske raznolikosti prirodnih i uzgojnih populacija lubina *Dicentrarchus labrax* iz istočnog dijela Jadranskog mora

Populacije oznake	Pop. tip	N	Alelna raznolikost				Heterozigotnost		
			A	A _e	A _r	A _{pr}	H _o	H _e	F _{IS}
UL-Piran-ITA	Uzgoj	60	9.5 ± 3.0	6.1 ± 2.3	7.2 ± 2.0	1	0.84 ± 0.1	0.82 ± 0.1	-0.017
UL-Ugljan-FRA	Uzgoj	86	11.8 ± 3.6	6.8 ± 3.4	8.1 ± 2.0	3	0.69 ± 0.1	0.82 ± 0.1*	0.161
UL-Ugljan-HR	Uzgoj	94	11.2 ± 3.7	6.6 ± 2.4	7.6 ± 1.8	5	0.80 ± 0.1	0.82 ± 0.1	0.029
UL-Brač-FRA	Uzgoj	96	12.2 ± 4.5	5.9 ± 1.9	7.6 ± 1.8	1	0.69 ± 0.1	0.81 ± 0.1*	0.147
DL-Piran	Prirodni	78	15.0 ± 6.0	8.4 ± 4.5	9.0 ± 2.7	4	0.76 ± 0.1	0.86 ± 0.1	0.113
DL-Poreč	Prirodni	40	11.2 ± 4.3	6.5 ± 3.2	8.5 ± 2.5	3	0.82 ± 0.1	0.83 ± 0.1	0.016
DL-Rijeka	Prirodni	31	12.3 ± 4.5	8.4 ± 3.7	9.9 ± 3.0	2	0.80 ± 0.1	0.88 ± 0.1	0.106
DL-Pag	Prirodni	36	11.0 ± 3.9	7.1 ± 3.2	8.8 ± 2.6	-	0.81 ± 0.1	0.85 ± 0.1	0.056
DL-Novigrad	Prirodni	47	12.2 ± 4.3	7.6 ± 3.5	8.9 ± 2.5	-	0.71 ± 0.2	0.86 ± 0.1*	0.180
DL-Jadrtovac	Prirodni	20	8.8 ± 3.0	6.0 ± 3.0	8.8 ± 3.0	1	0.77 ± 0.1	0.84 ± 0.1	0.091
DL-Brač	Prirodni	46	9.9 ± 3.4	6.2 ± 1.9	7.7 ± 2.1	2	0.79 ± 0.1	0.84 ± 0.1	0.060
DL-Makarska	Prirodni	42	11.7 ± 4.7	7.2 ± 3.5	8.7 ± 2.9	3	0.75 ± 0.1	0.84 ± 0.1	0.116
Ukupno		675	21.1 ± 9.3	11.1 ± 6.3	9.8 ± 2.7		0.76 ± 0.1	0.88 ± 0.1	0.066

Populacijske oznake kao i u Tablici 2. N = ukupan broj alela; A = prosječan broj alela po lokusu; A_e = broj efektivnih alela po lokusu; A_r = alelnog bogatstvo; A_{pr} = privatni aleli; H_o = zapažena heterozigotnost; H_e = očekivana heterozigotnost; F_{IS} = fiksacijski indeks; * značajno odstupanje od Hardy-Weinberg-ove ravnoteže

Za pretpostaviti je da je zbog ne-nasumičnog križanja te križanja jedinki u bliskom srodstvu, što se dešava u komercijalnim mrjestilištima u kojima ne postoji kontrola genotipova, uočeno značajno odstupanje od H-W ravnoteže kod uzgojnih populacija. Opisani obrazac upravljanja matičnjacima dodatno potvrđuje vrijednost koeficijenta križanja u srodstvu (F_{IS}) koji je bio najviši kod spomenutih populacija kao i najniže vrijednosti prosječnog broja efektivnih alela po lokusu (5.9-6.9) te alelnog bogatstva (7.2-8.1) u usporedbi s danim vrijednostima uočenim kod divljih populacija (6.0-8.4 te 7.7-9.0).

Uočeni višak homozigotnosti i posljedično odstupanje od Hardy-Weinberg ravnoteže kod divlje populacije iz Novigradskog mora može se pripisati Wahlund-om učinkom koji nastaje zbog uzorkovanja jedinki različitih subpopulacija i s različitim alelnim frekvencijama (Rosenberg i Calabrese 2004).

Udaljenost između jedinki i populacija

Ukupna vrijednost fiksacijskog indeksa F_{ST} , kao mjera protoka gena odnosno genetske diferencijacije ispitivanih populacija, iznosila je 0.053 sa značajnom p -vrijednošću manjom od 0.001. Relativno visoka vrijednost indeksa upućuje na postojanje genetske strukturiranosti populacija odnosno da je protok gena između ispitivanih populacija ograničen, odbacujući nul-hipotezu da su populacije lubina u Jadranu u panmiksiji. Test usporedbe genetske diferencijacije između parova populacija potvrdio je najveći protok gena između divljih populacija sjevernog Jadrana i to između populacija iz akvatorija Paga, Novigradskog mora, Rijeke i Piranskog zaljeva (-0.001 do 0.022) (Tablica 15). Iako je populacija iz Novigradskog mora prema geografskoj pripadnosti područje srednjeg Jadrana, ona po svojoj genetskoj strukturi pokazuje veću sličnost s divljim populacijama sjevernog Jadrana, sugerirajući na reproduktivnu aktivnost s danim populacijama. Naime, populacije bez fizičkih i ekoloških barijera u Jadranu će biti manje heterogene odnosno genetski sličnije. Slijedom navedenog, genetski najudaljeniji parovi populacija sa značajnom p -vrijednošću bili su parovi populacija iz uzgoja atlantskog porijekla (UL-Ugljan-FRA, UL-Brač-FRA) naspram divljih populacija. Osim što su uzgojne populacije pod stalnim pritiskom selekcije na željeni fenotip, što u konačnici utječe na redukciju genetske raznolikosti i križanja u srodstvu, a to je u ovom istraživanju i potvrđeno, brojne su studije na temelju molekularnih markera utvrdile genetsku razdijeljenost stokova lubina s obzirom na geografsku pripadnost. Populacije su podijeljene u tri genetski različite skupine i to populacije iz sjeverno-istočnog Atlantika, iz zapadnog te iz istočnog Mediterana. Populacije iz Atlantika i zapadnog Mediterana pokazuju homogenu genetsku strukturu, dok su populacije iz istočnog Mediterana okarakterizirane kao heterogene i strukturirane u više subpopulacija s obzirom na različitu geografsku pripadnost (Egejsko, Jadransko i Jonsko more). Stoga uzgoj populacija iz Atlantika dugoročno može utjecati na stabilnost autohtonih i lokalno adaptiranih genotipova divljih jadranskih populacija lubina. Spomenuta razina heterogenosti populacija iz istočnog Mediterana potvrđena je i za Jadranske populacije razdiobom genetske varijance (AMOVA test, Tablica 16), gdje je 5.3% varijabilnosti pripisano razlikama na razini populacije, a 85.9% varijabilnosti je pripisano razlikama na razini svih jedinki. Također, grupiranjem populacija s obzirom na populacijski karakter (uzgojne i divlje), molekularnom analizom varijance utvrđena je značajna razlika između ispitivanih grupa, ukazujući da utjecaj zbjegova lubina iz kaveza nije intenzivan kao što je to slučaj kod komarče (Tablica 17).

Tablica 15. Vrijednosti F_{ST} parametara (ispod dijagonale) i genetske udaljenosti [Cavalla-Sforza i Edwards (1967) chord udaljenost] između populacija lubina iz istočnog dijela Jadrana.

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)
(1) DL-Brač		0.477	0.497	0.473	0.502	0.568	0.533	0.491	0.509	0.572	0.505	0.500
(2)UL-Brač-FRA	0.059*		0.488	0.450	0.485	0.544	0.477	0.464	0.474	0.498	0.450	0.475
(3)DL-Poreč	0.061*	0.061*		0.454	0.462	0.523	0.463	0.414	0.454	0.504	0.412	0.453
(4)UL-Ugljan-FRA	0.076*	0.089*	0.073*		0.543	0.593	0.519	0.495	0.544	0.595	0.488	0.516
(5)UL-Ugljan-HR	0.061*	0.064*	0.059*	0.066*		0.563	0.544	0.455	0.518	0.560	0.489	0.486
(6)UL-Piran-ITA	0.053*	0.039*	0.047*	0.066*	0.047*		0.340	0.531	0.439	0.444	0.451	0.572
(7)DL-Piran	0.069*	0.086*	0.073*	0.018*	0.058*	0.060*		0.484	0.361	0.361	0.363	0.541
(8)DL-Makarska	0.052*	0.044*	0.044*	0.061*	0.039*	0.021	0.054*		0.483	0.505	0.429	0.456
(9)DL-Novigrad	0.059*	0.073*	0.063*	0.029*	0.045*	0.042*	0.016	0.034*		0.357	0.366	0.502
(10)DL-Pag	0.078*	0.095*	0.077*	0.027*	0.067*	0.067*	0.009	0.055*	0.011		0.369	0.538
(11)DL-Rijeka	0.043*	0.046*	0.043*	0.020	0.040*	0.022	0.008	0.022	0.001	-0.001		0.487
(12)DL-Jadrtovac	0.038	0.039*	0.041*	0.066*	0.041*	0.018	0.060*	0.010	0.037	0.063*	0.028	

Populacijske oznake kao i u Tablici 2. * = značajna različitost nakon parcijalne Bonferroni korelacije

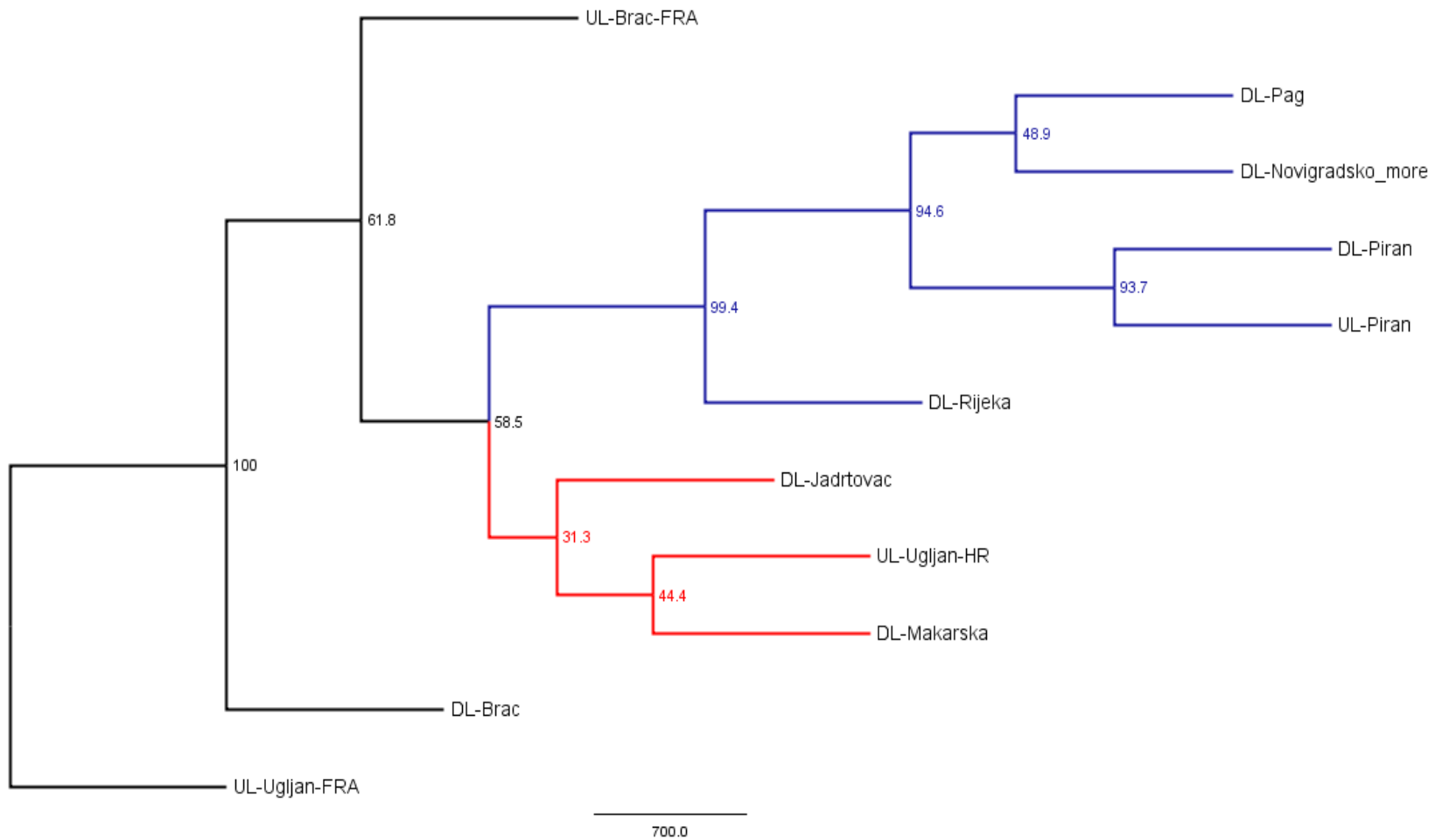
Tablica 16. Rezultati analize molekularne varijance (AMOVA) prikazuju razdiobu genetičke varijance između ispitivanih populacija lubina

Izvor varijacije	d.f.	% varijacije	<i>P</i> -vrijednost
Između svih populacija	11	5.3 (F_{ST} : 0.053)	< 0.001
Unutar populacije	327	8.7 (F_{IS} :0.092)	< 0.001
Između svih jedinki	339	85.9 (F_{IT} : 0.140)	< 0.001

Tablica 17. Rezultati analize molekularne varijance (AMOVA) prikazuju razdiobu genetičke varijance između uzgojnih i divljih populacija lubina

Izvor varijacije	d.f.	% varijacije	<i>P</i> -vrijednost
Između grupa	1	1.65 (F_{ST} : 0.017)	< 0.001
Unutar grupa	676	98.35	

Naime, komarča u uzgoju pokazuje potpuno drukčiji obrazac ponašanja od lubina, hraneći se obraštajem ona kontinuirano grize mrežni teg, što često uzrokuje kidanje mrežnog oka te mogućnost bijega van kaveza. Stoga su zbjegovi komarči puno učestalija pojava od zbjegova lubina u morski okoliš. Prebjezi komarče i lubina kad se nađe u prirodnom okolišu, zadržavaju se u okruženju kaveznih instalacija i do mjesec dana (Arechavala-Lopez i sur. 2011). U tom se periodu komarča, s obzirom na prehrambene navike i strukturu zubala, brzo prilagodi prelasku na prirodnu ishranu, odnosno zamjeni peleta s beskralježnjacima čija je zastupljenost mnogobrojna oko uzgajališta. Međutim, za lubina to nije slučaj. Kao vršni predator, jednom kad se nađe u prirodnom okolišu veoma se sporo prilagođava na novonastale uvjete što u konačnici utječe na nisku stopu preživljavanja i reducirani reproduktivni uspjeh s prirodnim populacijama (Arechavala-Lopez i sur. 2011). Međutim, analizom Cavalla-Sforza i Edwards (1967) chord genetske udaljenosti (Slika 11) samo kod prirodnih populacija lubina Piranskog zaljeva uočena je znatna genetska sličnost s uzgojnim populacijama talijanskog porijekla uzorkovanih također u Piranskom zaljevu, sugerirajući genetske interakcije prebjega s lokalnim populacijama. Uočena genetska sličnost između uzgojne populacije o. Ugljana jadranskog porijekla (matičnjak formiran od jedinki iz Jadrana - UL-Ugljan-HR) s divljom populacijom iz akvatorija Makarske ukazuje na kvalitetno genetsko upravljanje matičnjakom s očuvanom visokom razinom genetske raznolikosti i niskom stopom križanja u srodstvu (Tablica 14).



Slika 11. Nezakorijenjeno filogenetičko stablo izrađeno pomoću algoritma sparivanja susjeda na osnovi Cavalla-Sforza i Edwards chord genetske udaljenost populacija lubina *D. labrax*. Populacijske oznake kao i u Tablici 2.

Također, dendrogram je izgrađen od dva jasno odijeljena sestrinska klastera koji ukazuju na geografsko grupiranje populacija na srednji (crvena boja) i sjeverni Jadran (plava boja), s jasno izdvojenim uzgojnim populacijama atlantskog porijekla. Kao što je F_{ST} analiza ukazala, najveća genetska sličnost uočena je između populacija Rijeke, Paga, Novigradskog mora i Piranskog zaljeva (sjeverni Jadran) te između populacija iz Makarske, Jadrtovcica i uzgojne populacije o. Ugljana Jadranskog porijekla (srednji Jadran). Prirodna populacija lubina uzorkovana na sjeverozapadnoj strani otoka Brača predstavljala je genetski udaljeniju populaciju (DL-Brač). Geografska i ekološka svojstva Splitskog kanala, područja koja ova populacija nastanjuje, vjerojatno su uvjetovala ograničeno miješanje s okolnim populacijama. Topologija prikazanog dendograma ukazuje na reducirani protok gena između populacija srednjeg i sjevernog Jadrana stvarajući jačanje genetske strukturiranosti populacija, što je dodatno potvrđeno molekularnom analizom varijance između dviju grupa (Tablica 18).

Tablica 18. Rezultati analize molekularne varijance (AMOVA) prikazuju razdiobu genetičke varijance između divljih populacija lubina sjevernog i srednjeg Jadrana

Izvor varijacije	d.f.	% varijacije	P -vrijednost
Između grupa	1	2.61 (F_{ST} : 0.026)	< 0.001
Unutar grupa	340	97.39	

Sjeverni Jadran: Piranski zaljev, Zapadna obala Istre, Rijeka, Pag, Novigradsko more;

Srednji Jadran: Jadrtovac - Šibenik, Brač, Makarska

Iako je lubin kao vrsta izvrstan i snažan plivač, sposoban za migraciju od nekoliko stotina kilometara (Pickett i Pawson, 1994), u području istočnog Mediterana pa tako i u Jadranskom moru, lubin pokazuje teritorijalnost prema određenom akvatoriju bilo da je riječ o željenom području za mrijest, rastilištu ili hranilištu što generacijski uvjetuje sprječavanje znatnog protoka gena i formiranje ne-panmiktičnih populacija.



Slika. Prebjezi lubina ulovljeni na jugoistočnoj strani Pašmana

Gof *Seriola dumerili*

Za potrebe određivanja genetske strukture populacije gofa *Seriola dumerili* u istočnom dijelu Jadranskog mora kao i populacija iz Sredozemnog mora, uspješno su genotipizirane 174 jedinke iz sjevernog (n=29), srednjeg (n=31), južnog (n=26) Jadrana, Balearskog mora (n=52) te Ionskog mora (n=36) (Slika 5). Za mitohondrijsku analizu gena citokrom C oksidaze podjedinice 1 (COI), uspješno su sekvencionirani svi uzorci iz Jadranskog mora (n=78) te uzorci iz Balearskog mora (n=28).

(a) Mikrosatelitna genotipizacija

Opisna statistika i testiranje Hardy-Weinbergove ravnoteže

Svi istraživani mikrosatelitni lokusi gofa su bili polimorfni. Na 8 istraženih mikrosatelita utvrđena je prisutnost od 348 alela, odnosno prosječna brojnost alela po populaciji iznosila je 69.6 (± 20.7) dok je po ispitivanim lokusima iznosila 7.5 (± 2.1). Najveći broj alela imao je lokus Sdu10 s prosječnom učestalošću od 9.8 ± 2.3 po populaciji, a najveći broj alela (13) danog lokusa je opažen u populaciji iz Balearskog mora (SPA). Najmanji broj alela je imao lokus Sdu44 s prosječnom učestalošću od 4.2 ± 0.5 po populaciji. Sve su populacije sadržavale privatne alele odnosno alele koji se nisu javljali u ostalim populacijama, osim populacije iz srednjeg Jadrana. Među uzorcima gofa iz Balearskog mora utvrđena je prisutnost najvećeg broja privatnih alela (6) (Tablica 19). Isprekidana odnosno disjunktna distribucija alela uočena je kod svih 8 ispitivanih lokusa.

Parametri genetske raznolikosti populacija gofa prikazani su u Tablici 19. Srednja vrijednost zapažene heterogenosti (genetske raznolikosti) svih ispitivanih populacija iznosila je 0.66 ± 0.2 , dok je očekivana heterozigotnost iznosila 0.68 ± 0.2 . Sve populacije su pokazale sličnu razinu heterogenosti osim populacije južnog Jadrana, čija je heterogenost bila najniža i iznosila je 0.61. Broj efektivnih alela kao mjera koja govori o potrebnom broju jednako frekventnih alela da bi se postigla određena genska raznolikost, odnosno mjera pomoću koje se uspoređuju populacije koje imaju jednaki ukupan broj alela no s različitom distribucijom je također bio najniži kod južno Jadranske populacije što je u korelaciji s dobivenom heterozigotnošću. Što je heterozigotnost veća efektivni broj alela će biti veći, dok je efektivni broj alela najniži kada samo jedan alel dominira frekvencijom dok su svi ostali vrlo rijetki (Weir, 1990).

Kako do sada nisu izvršena nikakva genetsko-populacijska istraživanja gofa u Mediteranu, iako vrsta ima visoki gospodarski značaj te postaje značajan kandidat u akvakulturi Sredozemlja, ovo istraživanje po prvi put pruža uvid u genetsku strukturu populacija gofa. Međutim, mikrosatelitnom genotipizacijom vrste *Seriola lalandi*, koja je

stanovnik Atlantskog i Pacifičkog oceana, populacije iz Australijskih voda su pokazale znatno nižu genetsku raznolikost (0.42-0.48) (Miller i sur., 2011) od one utvrđene u ovom istraživanju za vrstu *S. dumerili* (0.66). Također, vrijednosti fiksacijskog indeksa (F_{IS}), kao mjere križanja u bliskom srodstvu, bile su više kod vrste *S. lalandi* (0.09-0.20) što neizravno upućuje na manju efektivnu veličinu populacija, ne-nasumično križanje odnosno znatnije ribolovno opterećenje nad tim populacijama.

Tablica 19. Opisna statistika genetske raznolikosti populacija gofova *Seriola dumerili* iz istočnog dijela Jadranskog mora te Sredozemlja

Populacije oznake	Geo. lokacija	N	Alelna raznolikost				Heterozigotnost		
			A	A_e	A_r	A_{pr}	H_o	H_e	F_{IS}
ITA	Ionsko m.	72	8.1 ± 2.3	4.0 ± 1.6	7.5 ± 2.0	3	0.67 ± 0.2	0.70 ± 0.2	0.043
SPA	Balearsko m.	104	8.4 ± 2.3	3.8 ± 1.9	7.1 ± 2.4	6	0.65 ± 0.2	0.66 ± 0.2	0.014
SJEV. JAD.	Jadransko m.	56	6.4 ± 1.5	3.5 ± 1.2	6.3 ± 1.5	5	0.68 ± 0.1	0.68 ± 0.1	0.003
SR. JAD.	Jadransko m.	64	7.5 ± 1.9	3.8 ± 1.8	7.1 ± 1.8	-	0.67 ± 0.2	0.68 ± 0.2	0.020
JUŽ. JAD.	Jadransko m.	52	6.9 ± 2.4	3.3 ± 1.4	6.9 ± 2.4	3	0.61 ± 0.2	0.62 ± 0.2	0.023
Ukupno		348	11.1 ± 3.9	3.9 ± 1.8	7.2 ± 1.9		0.66 ± 0.2	0.68 ± 0.2	

N = ukupan broj alela; A = prosječan broj alela po lokusu; A_e = broj efektivnih alela po lokusu; A_r = alelna bogastvo; A_{pr} = privatni aleli; H_o = zapažena heterozigotnost; H_e = očekivana heterozigotnost; F_{IS} = fiksacijski indeks;

U ovom istraživanju svi ispitivani lokusi kao i sve populacije bili su u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži. Odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže ukazuje na prisutnost prirodne ili umjetne selekcije unutar populacija, ne-nasumičnog križanja jedinki ili pak križanja populacija različitog geografskog podrijetla, što nije slučaj za ispitivane populacije gofa u Mediteranu. Također, može se zaključiti da su ispitivane populacije okarakterizirane visokom efektivnom veličinom te da postojeći ribolovni pritisak ne utječe na njihovu stabilnost.

Udaljenost između jedinki i populacija

Ukupna vrijednost fiksacijskog indeksa F_{ST} , kao mjera protoka gena odnosno genetske diferencijacije ispitivanih populacija, iznosila je niskih 0.006 s p -vrijednošću većom od 0.8. Niska vrijednost indeksa upućuje na postojanje znatnog protoka gena između ispitivanih

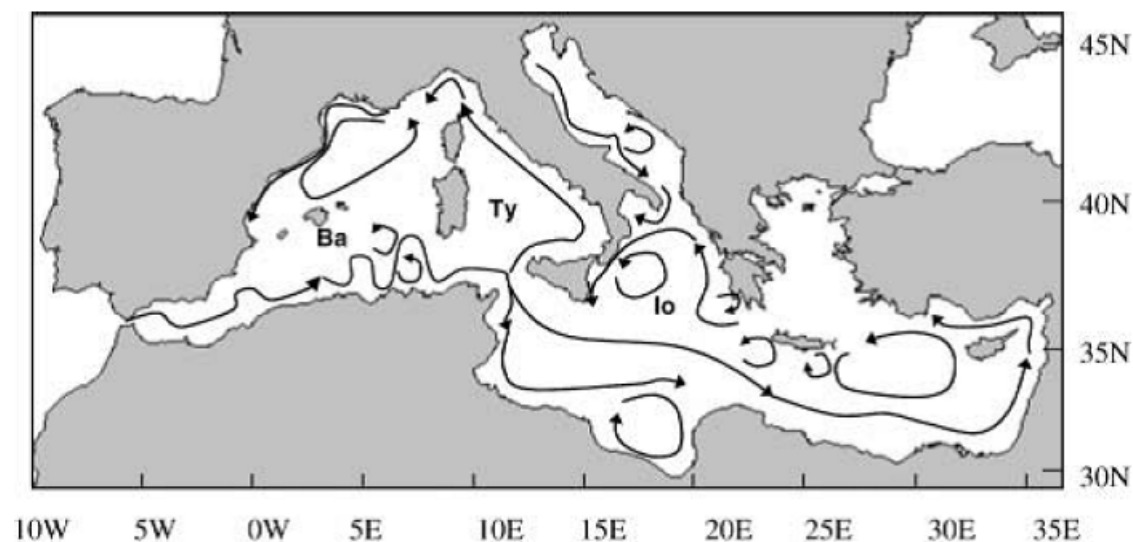
populacija, što onemogućuje jačanje genetske strukturiranosti populacija te se nul-hipoteza o prisutnosti panmiksičnih populacija gofa u Mediteranu ne može odbaciti. Test usporedbe genetske diferencijacije između parova populacija je potvrdio najveći protok gena između populacija Ionskog i Balearskog mora, između populacija Balearskog mora i sjevernog Jadrana te između populacija Ionskog mora i sjevernog Jadrana (0.0005-0.004) (Tablica 20). Jedino je kod populacije južnog Jadrana uočena slaba genetska strukturiranost i to u odnosu na populacije srednjeg Jadrana, iz Balearskog i Ionskog mora.

Tablica 20. Vrijednosti F_{ST} parametara (ispod dijagonale) i genetske udaljenosti [Cavalla-Sforza i Edwards (1967) chord udaljenost] između populacija gofova iz istočnog dijela Jadrana i Sredozemlja.

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
(1) ITA		0.0169	0.0209	0.0318	0.0257
(2) SPA	0.0032		0.0142	0.0253	0.0202
(3) SJEV. JAD.	0.0045	0.0005		0.0333	0.0216
(4) SR. JAD.	0.0052	0.0074	0.0056		0.0372
(5) JUŽ. JAD.	0.0097*	0.0093*	0.0066	0.0162*	

Nažalost, zastupljenost literaturnih navoda o ekologiji i distribuciji različitih životnih stadija ispitivane vrste u Mediteranu je neznatna (Piptone i Andaloro, 1995), ali zbog sve većeg akvakulturnog značaja, reproduktivna biologija i kontrolirana ishrana ranih razvojnih stadija detaljno je istražena (Mylonas i sur. 2004, Kožul i sur. 2001), te je ova vrsta već prisutna diljem Sredozemlja u komercijalnim mrjestilištima zbog visoke tržišne vrijednosti, visokog potencijala rasta i visoke stope preživljavanja (Porrello i sur. 1993; Mazzola i sur. 1996). Za oba spola, prvu spolnu zrelost gof dostiže sa starošću od 4 godine dok period mrijesta traje od kasnog proljeća do ranog ljeta (svibanj-lipanj) u Mediteranu (Lazzari i Barbera 1988, 1989; Grau 1992). Mnogi su autori ukazali da se glavno područje mrijesta gofa nalazi u centralnom Mediteranu, između južne obale Sicilije i obale Tunisa, izvan Pelagijskih otoka (*Isole Pelagie*) (Lazzari i Barbera, 1988, 1989; Andaloro i sur. 1992) dok su prepoznata rastilišta nedoraslih jedinki smještene u južnom Jadranu (Benović, 1980), uz obalu južne i istočne Sicilije te u području Liparskog otočja (Giovanardi i sur. 1984; Lazzari i Barbera 1989, Greco i sur. 1991, Porrello i sur. 1993). Jednom oplođena jaja raznose se površinskim strujama po Sredozemlju (Slika 12), a pelagična faza u kojoj se ličinke isključivo hrane zooplanktonom u

morskom stupcu može potrajati i do 3 mjeseca (Badalamenti i sur. 1995), što omogućava dovoljan vremenski period za ličinačku disperziju.



Slika 12. Prikaz dominantnih površinskih struja u Sredozemlju. Ba, Balearsko more; Ty, tirensko more; Io, Ionsko more.

Tendencija okupljanja spolno zrelih jedinki iz cijelog Mediterana, uključujući jedinke iz Jadrana, oko istog područja mrijesta i u istom vremenskom periodu omogućava razmjenu genetskog materijala i uspostavlja protok gena između različitih populacija, što je potvrđeno niskom vrijednošću fiksacijskog indeksa F_{ST} kao i rezultatima molekularne analize varijance (AMOVA test, Tablica 21), gdje je 0.57% varijabilnosti pripisano razlikama na razini populacije, dok je 97.36% varijabilnosti pripisano razlikama na razini svih jedinki.

Tablica 21. Rezultati analize molekularne varijance (AMOVA) prikazuju razdiobu genetičke varijance između populacija gofa iz istočnog dijela Jadrana, Ionskog i Balearskog mora

Izvor varijacije	d.f.	% varijacije	P -vrijednost
Između svih populacija	4	0.57 (F_{ST} : 0.006)	0.80
Unutar populacije	169	2.06 (F_{IS} : 0.021)	0.09
Između svih jedinki	174	97.36 (F_{IT} : 0.026)	0.05

Izostanak genetske strukturiranosti u Mediteranu opažen je i kod drugih visoko migratornih, kosmopolitnih vrsta kao što su iglun *Xiphias gladius* (Pujolar i sur. 2002) te žutoperajni tunj *Thunnus alalunga* (Pujolar i sur. 2003). Međutim, opažena slaba ali statistički

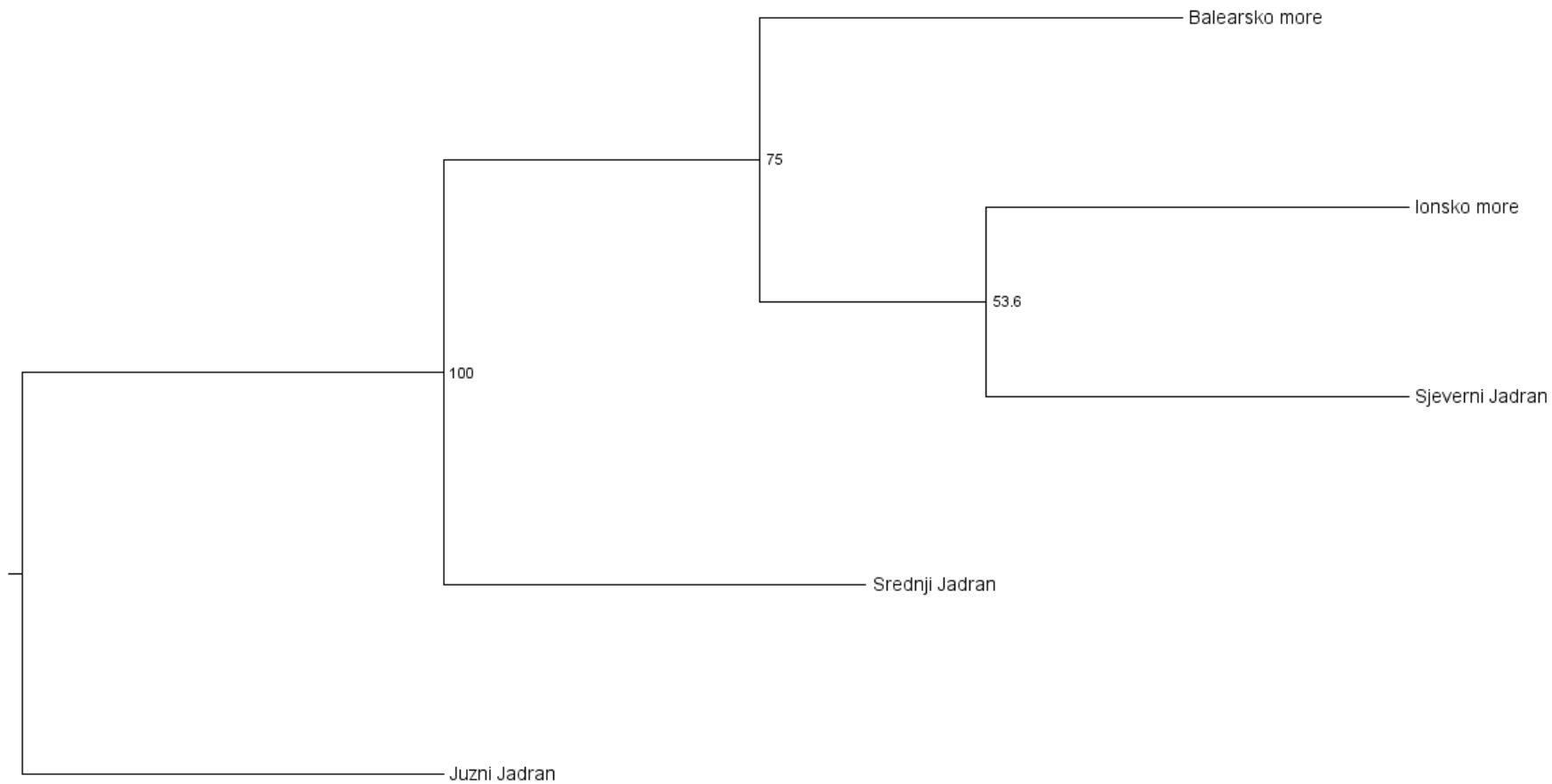
značajna genetska udaljenost populacije gofa južnog Jadrana od ostalih ispitivanih populacija, otvara mogućnost postojanja više područja mrijesta, ili mrijesta populacija u različitim vremenskim razdobljima budući da je gof po strukturi ovarija klasificiran kao vrsta koja se mrijesti više puta tijekom sezone mrijesta kada veća jata riba sinkroniziraju reproduktivne aktivnosti (engl. multiple-batch group-synchronous spawning fish) (Mylonas i sur. 2004). Analizom genetske udaljenosti (Cavalla-Sforza i Edwards, 1967) je potvrđena spomenuta populacijska struktura, te je na dobivenom dendogramu uočljivo da nema populacijskog grupiranja s obzirom na geografsku pripadnost, a populacija južnog Jadrana je genetski najudaljenija u usporedbi s ostalim populacijama (Slika 13).

(b) mitohondrijske DNK - citokrom C oksidaze podjedinice 1 (COI)

Genetska raznolikost COI regije populacija gofa istočnog Jadrana i Balearskog mora

Za potrebe istraživanja uspješno je izvršeno sekvencioniranje fragmenta mitohondrijske DNK (650bp) kod 78 uzoraka iz Jadrana te 28 uzoraka iz Balearskog mora (Tablica 22). Utvrđena je prisutnost 8 različitih haplogrupa s prosječno 9 polimorfni mjesta. Unutar 8 definiranih haplogrupa, samo su 3 haplogrupe (37.5%) bile jedinstvene odnosno zastupljene samo s jednom jedinkom, dok je H2 haplogrupa 2 (H2) pokazala najveću ukupnu učestalost u svim populacijama odnosno bila je prisutna u čak 73.5% uzoraka, a haplogrupa 1 (H1) u 14% uzoraka. Od ukupno 9 polimorfni mjesta na sekvencama, 3 mjesta su bila singltoni, a 6 mjesta je bilo filogenetski informativno. Računanjem genetskih indeksa raznolikosti dobivena je visoka vrijednost ukupne raznolikosti haplotipova (h) 0.44 ± 0.06 , te niska vrijednost nukleotidne raznolikosti (π) 0.0016 ± 0.0002 . Vrijednosti izračunatih osnovnih indeksa raznolikosti ukupno i po populacijama prikazuje Tablica 22.

Općenito visoka raznolikost haplotipova i niska nukleotidna raznolikost koje su utvrđene ovim istraživanjem ukazuju da su razlike između haplogrupa male jer ih u najvećem broju čini razlika samo jednog nukleotida. To potvrđuje i rekonstruirana filogenetska mreža haplogrupa iz koje je vidljivo da je najčešći broj mutacija po nukleotidnom mjestu, mutacija jednog nukleotida, pri čemu je najveći broj mutacija po mjestu nizak i iznosi 2 (Slika 14). Kombinacija visoke haplotipske i niske nukleotidne raznolikosti može upućivati na naglu demografsku ekspanziju koju je prošla početna mala populacija ove vrste kroz svoju demografsku povijest.

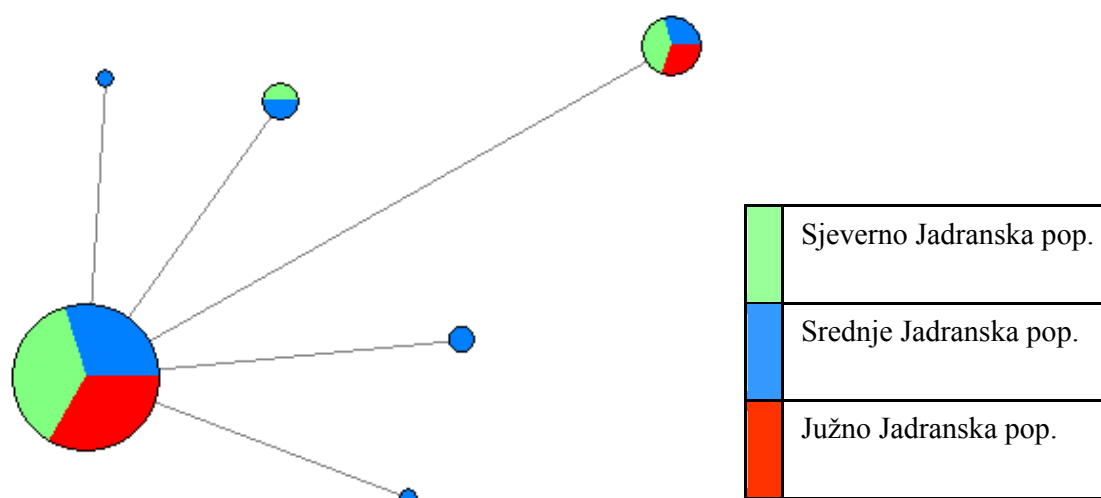


Slika 13. Nezakorijenjeno filogenetičko stablo izrađena pomoću algoritma sparivanja susjeda na osnovi Cavalla-Sforza i Edwards chord genetske udaljenost populacija gofova *S. dumerili*

Tablica 22. Vrijednosti osnovnih indeksa genetske raznolikosti ukupno i za svaku populaciju gofa *Seriola dumerili* te rezultati Tajima *D* i Fu-ovog *F_s* testa za ispitivane sekvence

Populacije	<i>N</i>	<i>H</i>	<i>S</i>	<i>h</i>	π	Tajima's <i>D</i>	Fu's <i>F_s</i>
SPA	28	5	6	0.56 ± 0.09	0.0023 ± 0.0005	-0.053 ^{ns}	0.40 ^{ns}
SJEV. JAD.	27	6	7	0.55 ± 0.11	0.0016 ± 0.0001	-1.281 ^{ns}	-1.65 ^{ns}
SR. JAD.	33	4	5	0.37 ± 0.10	0.0013 ± 0.0004	-0.853 ^{ns}	0.06 ^{ns}
JUŽ. JAD.	23	2	3	0.24 ± 0.11	0.0010 ± 0.0005	-0.317 ^{ns}	2.22 ^{ns}
Ukupno za Jadran	78	6	7	0.39 ± 0.07	0.0014 ± 0.0003	-0.929 ^{ns}	-0.98 ^{ns}
Ukupno	106	8	9	0.44 ± 0.06	0.0016 ± 0.0002	-0.955 ^{ns}	-1.78 ^{ns}

N, broj uzoraka; *H*, broj haplotipova; *S*, broj polimorfnih mjesta; *h*, raznolikost haplotipova (±S.D.); π , nukleotidna raznolikost (±S.D.).



Slika 14. Filogenetska mreža 6 haplogrupa vrste *S. dumerili* uzorkovane u istočnom dijelu Jadrana. Linije mreže označavaju vezu pojedinih haplogrupa (krugovi). Veličina kruga odgovara broju sekvenci koje pripadaju određenoj haplogrupi. Boje krugova predstavljaju vrstu populacije.

Demografska povijest i filogenetska analiza

U svim ispitivanim populacijama odbačena je hipoteza o neutralnoj evoluciji vrste s obzirom da su rezultati Tajima *D* testa i Fu-ove *F_s* statistike bili negativni iako statistički nisu značajno odstupali od modela neutralne evolucije (Tablica 22). Također, dobiveni rezultati ukazuju da je utvrđen znatan broj rijetkih alela u usporedbi s očekivanim brojem pri neutralnoj evoluciji.

Test usklađenosti (*goodness of fit*) pokazao je uniformne rezultate neusklađene distribucije (*mismatch distribution*) i potvrdio predviđeni model nagle ekspanzije populacija u povijesti (Tablica 23). Niska vrijednost Harpending indeksa ukazala je na poklapanje ispitivanih podataka s predviđenim vrijednostima modela nagle ekspanzije Rogersa i Harpendinga (1992), uz visoku p vrijednost pomoću koje se pretpostavljeni model ne može odbaciti. Rezultat sume kvadrata devijacija (SSD) za ukupnu populaciju također potvrdio modela nagle ekspanzije Rogersa i Harpendinga (1992) što pak nije bio slučaj za pojedinačne populacije. Krivulja neusklađene distribucije za populacije iz Jadrana i Balearskog mora bila je unimodalnog oblika (Slika 15), što dodatno potvrđuje nedavnu ekspanziju ispitivanih populacija kao i uočene velike razlike inicijalne populacije prije ekspanzije (parametar θ_0) i populacije nakon ekspanzije (parametar θ_1). Nagli rast populacija kroz demografsku povijest utvrđen je i kod drugih migratornih ribljih vrsta kao što je plavoperajna tuna *Thunnus thynnus*, za koju se pretpostavlja na osnovi analize mtDNA da je kolonizacija i nagli populacijski rast u Mediteranu započeo 144 000 – 137 000 godina prije sadašnjosti, nakon zadnjeg ledenog doba i nakon ulaska slane vode kroz Gibraltar (Carlsson i sur. 2004).

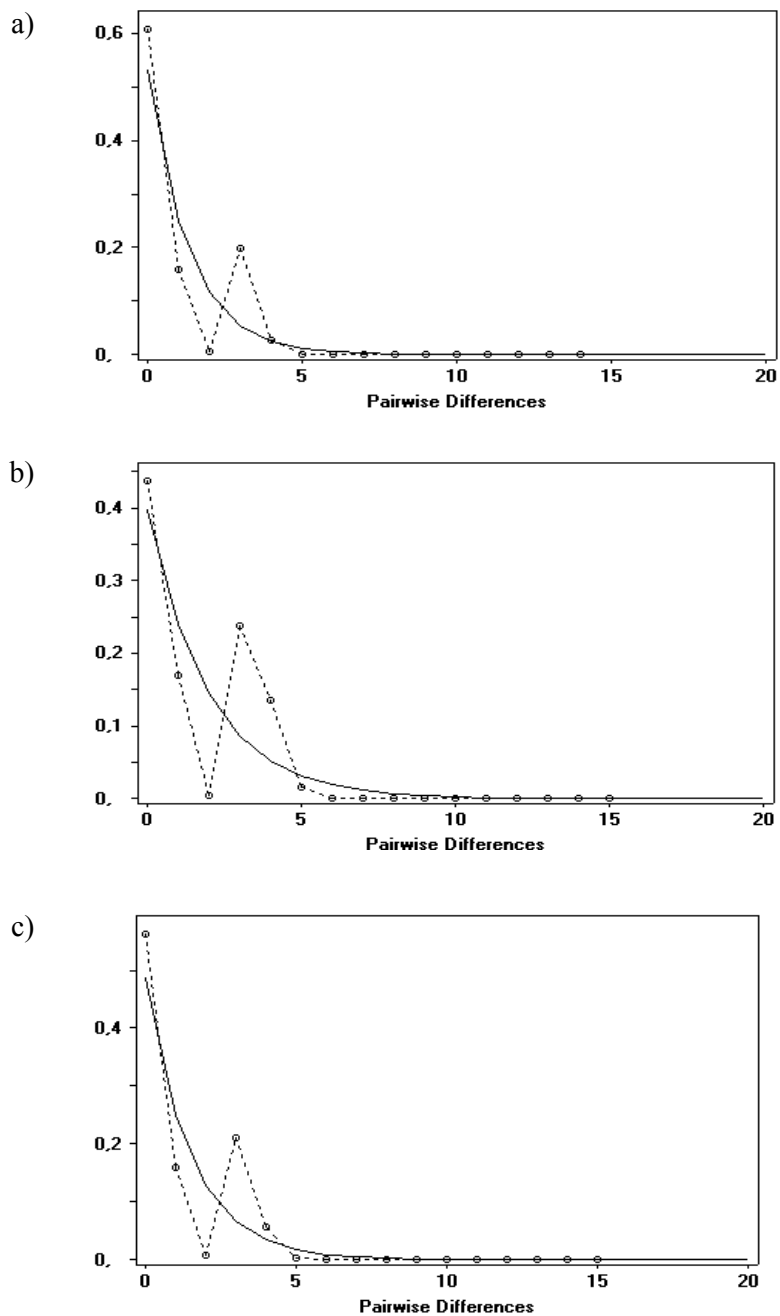
Tablica 23. Procijenjeni parametri neusklađene distribucije, vrijednosti *SSD* i *HRI* testova s pripadajućim p vrijednostima za mitohondrijsku DNK populacija gofa.

	Neusklađena (<i>mismatch</i>) distribucija			Test usklađenosti (<i>goodness-of-fit</i>)			
	τ	θ_0	θ_1	<i>SSD</i>	P	<i>HRI</i>	P
Jadransko m.	0.00	0.00	99999.0000	0.261	0.00	0.244	0.96
Balearsko m.	0.00	0.00	99999.0000	0.421	0.00	0.18	0.99
Ukupno	1.52	0.00	49999.6842	0.205	0.05	0.33	0.75

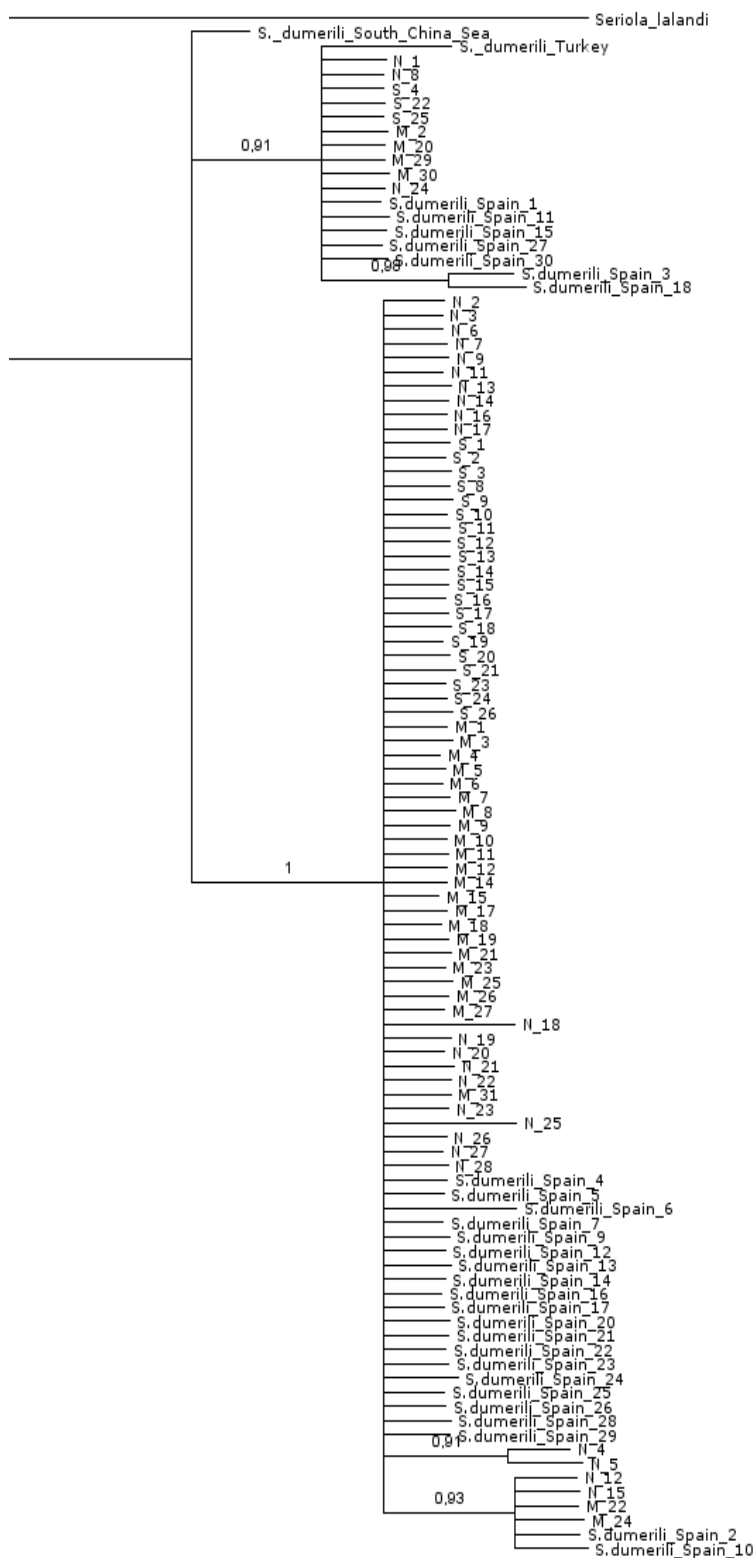
SSD, suma kvadrata devijacija; *HRI*, Harpending-ov indeks nazubljenosti

Korištenjem rezultata BI analize izrađeno je konsezusno stablo (Slika 16) koje prikazuje filogenetsku povezanost između sekvenci izoliranih ovim istraživanjem i referentnih sekvenci vrsta iz razreda Carangidae (*S. lalandi* EF609460.1, *S. dumerili* iz Južno kineskog mora FJ237927.1, *S. dumerili* iz Egejskog mora KC501452.1) preuzetih iz GenBank baze podataka. Vrsta *S. lalandi* korištena je kao vanjska grupa za ukorjenjivanje stabla. Posteriorne vrijednosti (*posterior probability*) koje označavaju vjerojatnost pojedinog grananja ili monofiletske skupine sekvenci (*clade*), nalazile su se u rasponu vrijednosti od 0.91 do 1.00. Iako struktura stabla pokazuje jasnu klasteraciju dviju populacijskih grupa, segregacija nije slijedila geografsku pripadnost jedinki što opetovano potvrđuje znatnu

izmjenu gena između ispitivanih populacija i na razini mtDNA. Toplogija stabla je plitka i nerazriješena, s nedostatkom klasteriranih i dobro definiranih grupa.



Slika 15. Krivulja (unimodalan oblik) distribucije razlika između parova haplotipova populacije gofa iz Jadranskog mora (a), populacije iz Balearskog mora te za ukupne populacije (c). Isprekidana linija označava uočenu krivulju, a puna očekivanu liniju pod pretpostavkom modela nagle ekspanzije populacije.



Slika 16. Filogenetsko stablo populacija *Seriola dumerili* uzorkovanih u istočnom dijelu Jadranskog mora i Balearskog mora, ustanovljeno pomoću mitohondrijskog DNK (citokrom C oksidaza podjedinica 1) biljega i Bayesian Inference (BI) analizom. Slova: N, populacija iz sjevernog Jadrana; M, srednji Jadran; S, južni Jadran; *S. dumerili* Spain, Balearsko more. Arapski brojevi označavaju broj uzorka.

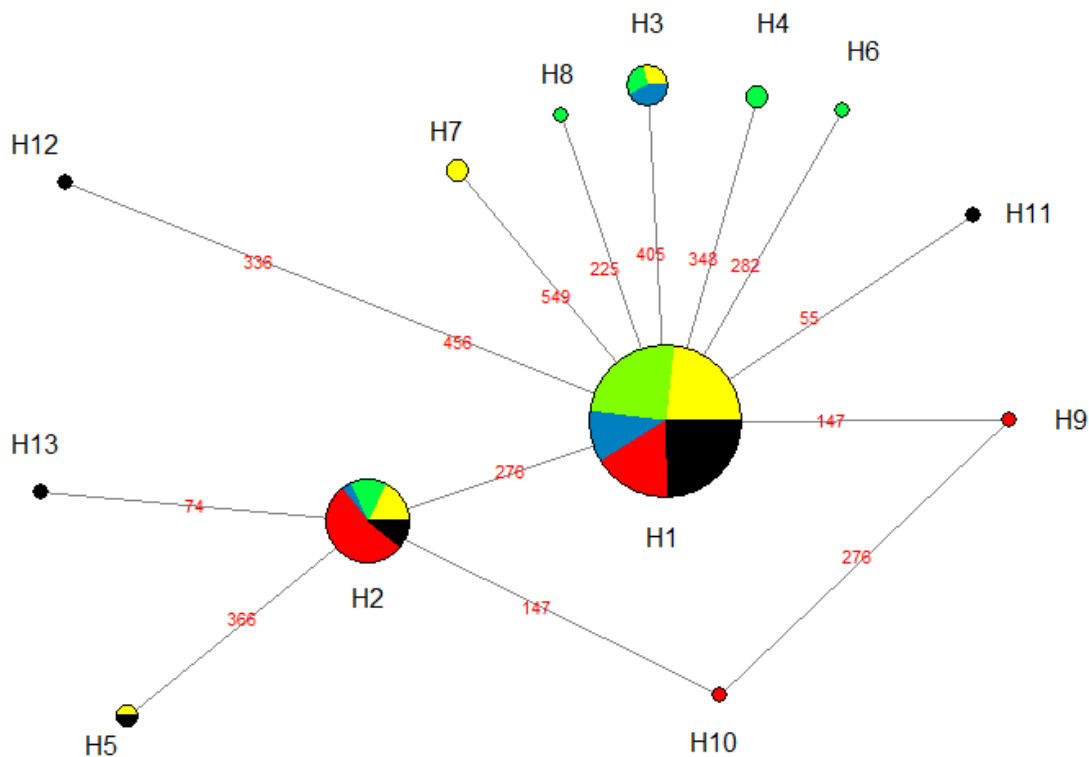
Zubatac *Dentex dentex*

Za potrebe određivanja genetske strukture populacije zubaca *Dentex dentex* u istočnom dijelu Jadranskog mora kao i populacije iz Balearskog mora, uspješno je izvršeno sekvencioniranje fragmenta mitohondrijske DNK gena citokrom C oksidaze podjedinice 1 (COI) (662bp) kod 138 jedinki iz sjevernog (n=31), srednjeg (n=32), južnog (n=14) Jadrana, iz uzgoja Jadranskog porijekla (n=31) te iz Balearskog mora (n=29) (Slika 6).

Genetska raznolikost COI regije populacija zubaca istočnog Jadrana i Balearskog mora

Kod istraživanih populacija utvrđena je prisutnost 13 različitih haplotipova s prosječnim brojem od 12 polimorfni mjesta. Unutar 13 definiranih haplotipova, čak 7 haplotipova (53.8%) bilo je jedinstveno odnosno zastupljeno samo s jednom jedinkom. Haplotip 1 (H1) bio je prisutan u svim populacijama i pokazao najveću zastupljenost u čak 65.2% uzoraka. Haplotip 2 (H2) također je bio zastupljen u svim populacijama, međutim sa znatno manjom frekvencijom od 20%. Od ukupno 12 polimorfni mjesta na sekvencama, 6 je mjesta bilo singleton, a 6 mjesta bilo filogenetski informativno. Računanjem genetskih indeksa raznolikosti dobivena je visoka vrijednost ukupne raznolikosti haplotipova (h) 0.53 ± 0.04 , te niska vrijednost nukleotidne raznolikosti (π) 0.0010 ± 0.0001 . Vrijednosti izračunatih osnovnih indeksa raznolikosti ukupno i po populacijama prikazuje Tablica 24.

Kao što je utvrđeno za vrstu *Seriola dumerili*, također i za vrstu *Dentex dentex*, visoka raznolikost haplotipova i niska nukleotidna raznolikost koje su utvrđene ovim istraživanjem ukazuju da su razlike između haplotipova male jer ih u najvećem broju čini razlika samo jednog nukleotida. To potvrđuje i rekonstruirana filogenetska mreža haplogrupa zvjezdastog oblika, iz koje je vidljivo da je najčešći broj mutacija po nukleotidnom mjestu mutacija jednog nukleotida, pri čemu je najveći broj mutacija po mjestu nizak i iznosi 2 (Slika 17). Kombinacija visoke haplotipske i niske nukleotidne raznolikosti može upućivati na naglu demografsku ekspanziju koju je prošla početna mala populacija ove vrste kroz svoju demografsku povijest. Također, rekonstruirana filogenetska mreža ukazuje na visoku frekvenciju haplogrupe H1 u svim ispitivanim populacijama te kao takva predstavlja ancestrnu haplogrupu odnosno haplogrupu koja je najduže prisutna u populacijama. Većina novih mutanata nastala je od najzastupljenijih haplotipova (H1 i H2), gdje rijetke varijante predstavljaju nedavne mutante. Niska različitost između haplotipova ukazuje na slabu genetsku udaljenost geografski različitih populacija.



Slika 17. Filogenetska mreža 13 haplogrupa vrste *D. dentex* uzorkovane u istočnom dijelu Jadrana i Balearskog mora. Linije mreže označavaju vezu pojedinih haplogrupa (krugovi). Veličina kruga odgovara broju sekvenci koje pripadaju određenoj haplogrupi. Boje krugova predstavljaju vrstu populacije. UZGOJ, crvena boja; SPA, crna boja; SJEV. JAD., žuta boja; SRED. JAD., zelena boja; JUŽ. JAD., plava boja.

Demografska povijest i populacijska diferencijacija

U svim ispitivanim populacijama odbačena je hipoteza o neutralnoj evoluciji vrste s obzirom da su rezultati Tajima *D* testa i Fu-ove *F_s* statistike bili negativni i statistički su značajno odstupali od modela neutralne evolucije (Tablica 24). Naime, dobiveni rezultati ukazuju da je utvrđen znatan broj rijetkih alela u usporedbi s očekivanim brojem pri neutralnoj evoluciji.

Tablica 24. Vrijednosti osnovnih indeksa genetske raznolikosti ukupno i za svaku populaciju zubaca *Dentex dentex* te rezultati Tajima *D* i Fu-ovog *F_s* testa za ispitivane sekvence

Populacije	<i>N</i>	<i>H</i>	<i>S</i>	<i>h</i>	π	Tajima's <i>D</i>	Fu's <i>F_s</i>
SPA	29	6	6	0.42 ± 0.11	0.0010 ± 0.0003	-1.672*	-3.17 ^{ns}
SJEV. JAD.	31	5	4	0.52 ± 0.09	0.0010 ± 0.0002	-0.927 ^{ns}	-1.80 ^{ns}
SR. JAD.	32	6	5	0.52 ± 0.10	0.0010 ± 0.0002	-1.403 ^{ns}	-3.24**
JUŽ. JAD.	14	3	2	0.47 ± 0.14	0.0010 ± 0.0003	-0.5327 ^{ns}	-0.47 ^{ns}
UZGOJ	31	4	2	0.58 ± 0.05	0.0010 ± 0.0001	-0.568 ^{ns}	-0.62 ^{ns}
Ukupno za Jadran	109	10	8	0.56 ± 0.05	0.0010 ± 0.0001	-1.352 ^{ns}	-6.26**
Ukupno	138	13	12	0.53 ± 0.04	0.0010 ± 0.0001	-1.777**	-10.43***

N, broj uzoraka; *H*, broj haplotipova; *S*, broj polimorfni mjesta; *h*, raznolikost haplotipova (±S.D.); π , nukleotidna raznolikost (±S.D.).

Test usklađenosti (*goodness of fit*) pokazao je uniformne rezultate neusklađene distribucije (*mismatch distribution*) i potvrdio predviđeni modela nagle ekspanzije populacija u povijesti (Tablica 25).

Tablica 25. Procijenjeni parametri neusklađene distribucije, vrijednosti *SSD* i *HRI* testova s pripadajućim *p* vrijednostima za mitohondrijsku DNK populacija zubaca.

	Neusklađena (<i>mismatch</i>) distribucija			Test usklađenosti (<i>goodness-of-fit</i>)			
	τ	θ_0	θ_1	<i>SSD</i>	<i>P</i>	<i>HRI</i>	<i>P</i>
SPA	0.00	0.00	1714.8951	0.261	0.00	0.244	0.96
SJEV.	0.72	0.00	99999.0000	0.006	0.37	0.11	0.39
SR. JAD.	0.73	0.00	99999.0000	0.011	0.18	0.14	0.22
JUŽ. JAD.	0.64	0.00	99999.0000	0.016	0.28	0.17	0.30
UZGOJ	0.82	0.00	99999.0000	0.032	0.04	0.22	0.03
Ukupno za Jadran	0.79	0.002	99999.0000	0.014	0.04	0.141	0.01
Ukupno	0.75	0.00	99999.0000	0.006	0.07	0.112	0.07

SSD, suma kvadrata devijacija; *HRI*, Harpending-ov indeks nazubljenosti

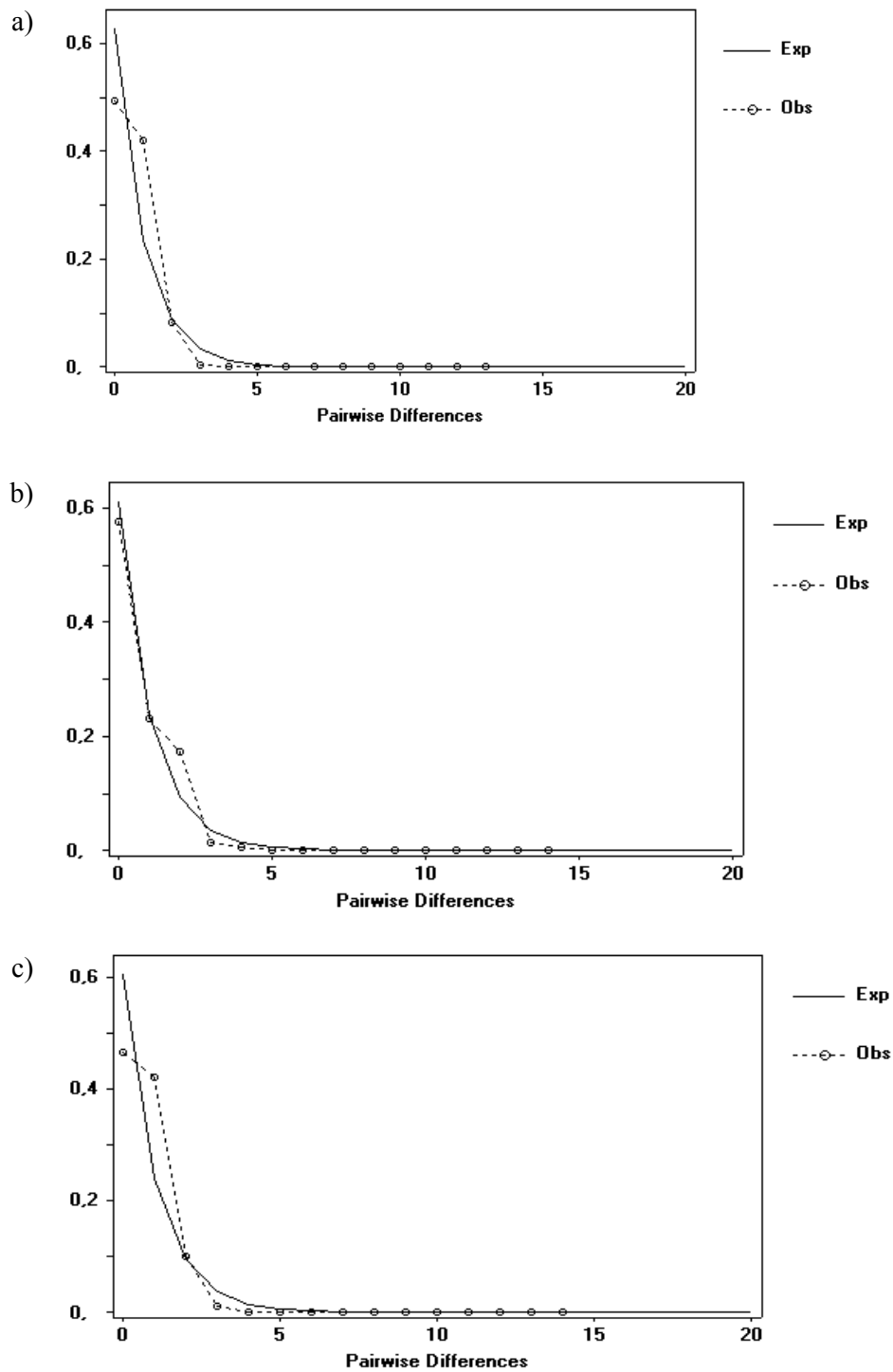
Niska vrijednost Harpending indeksa ukazala je na poklapanje ispitivanih podataka s predviđenim vrijednostima modela nagle ekspanzije Rogersa i Harpendinga (1992), uz visoku *p* vrijednost pomoću koje se pretpostavljeni model ne može odbaciti. Rezultat sume kvadrata devijacija (*SSD*) za ukupnu populaciju također je potvrdio model nagle ekspanzije Rogersa i Harpendinga (1992) što pak nije bio slučaj za populaciju iz uzgoja i populacije iz Balearskog

mora. Krivulja neusklađene distribucije za populacije iz Jadrana i Balearskog mora bila je unimodalnog oblika (Slika 18) što dodatno potvrđuje nedavnu ekspanziju ispitivanih populacija kao i uočene velike razlike inicijalne populacije prije ekspanzije (parametar θ_0) i populacije nakon ekspanzije (parametar θ_1). Nagli rast populacija kroz demografsku povijest utvrđen je i kod drugih vrsta iz porodice Sparidae kao što je komarča *Sparus aurata* (Coscia i sur. 2012), šarag *Diplodus sargus* (Gonzalez-Wanguemert i sur. 2011), dok za pica *Diplodus puntazzo* to pak nije bio slučaj (Bargelloni i sur. 2005).

Nagla demografska ekspanzija zubaca u prošlosti koja je vjerojatno nastala nakon posljednjeg glacijalnog razdoblja i ulaskom slane vode u Mediteran rezultirala je snažnim protokom gena između populacija te do danas, a to uzimajući u obzir ograničeno vremensko razdoblje nije uvjetovalo divergenciju mitohondrijske DNA između ispitivanih populacija, što je vidljivo iz testa usporedbe populacijske diferencijacije (F_{ST} test, Tablica 26). Jedino su populacije iz uzgoja Jadranskog porijekla pokazale značajnu genetsku udaljenost naspram svim ostalim populacijama, što je vjerojatno uvjetovano značajnim selekcijskim pritiskom nad matičnjakom s ciljem dobivanja komercijalno poželjnog fenotipa. Bargelloni i sur. (2003), analizirajući populacijsku strukturiranost više vrsta iz porodice Sparidae između Mediterana i Atlantika, uočili su značajnu divergenciju populacija zubaca između dva ispitivana bazena, međutim strukturiranost nije uočena između populacija unutar Mediterana, što je potvrđeno i ovom studijom. Za pretpostaviti je da bi nuklearni markeri kao što su mikrosateliti, s obzirom da su okarakterizirani visokom razinom mutacija, možda bili informativniji u analizi nedavno stvorenih populacijskih razlika zubaca u Jadranskom moru.

Table 26. Vrijednosti fiksacijskog indeksa F_{ST} utvrđene testom usporedbe genetske diferencijacije između parova populacija (ispod dijagonale) i p vrijednosti egzaktnog testa diferencijacije populacija (iznad dijagonale) između populacija *Dentex dentex* uzorkovanih iz različitih geografskih područja

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
(1) SJEV. JAD.		0.518	0.561	0.016	0.513
(2) SR. JAD.	-0.0201		0.787	0.002	0.365
(3) JUŽ. JAD.	-0.0155	-0.0195		0.004	0.190
(4)UZGOJ	0.0814*	0.1025*	0.1474*		0.003
(5) SPA	-0.0104	-0.0118	0.0080	0.1443**	



Slika 15. Krivulja (unimodalan oblik) distribucije razlika između parova haplotipova populacije zubaca iz Jadranskog mora (a), populacije iz Balearskog mora te za ukupne populacije (c). Isprekidana linija označava uočenu krivulju, a puna očekivanu liniju pod pretpostavkom modela nagle ekspanzije populacije.

5. ZAKLJUČCI

Polazeći od ustaljene prakse kojom se preveliki ribolovni pritisak pokušava sanirati poribljavanjem (popularno nazvanim „vraćanjem prirodi oduzetog“), te slijedom ukazivanja recentne znanstvene i stručne literature na potreban oprez zbog moguće genetske kontaminacije prirodnih populacija koje se mrijeste s selekcijskim postupkom uzgojenim jedinkama, HŠRSM je u suradnji s IOR-Split po prvi put pristupio sagledavanju ovih učinaka na uzgajane vrste duž istočne obale Jadrana. Jednako tako, zbog sve većeg interesa za diversifikacijom proizvoda marikulture, tj. uvođenja novih, potencijalno interesantnih vrsta poput gofa i zubaca, i dr. ukazano je na potrebu utvrđivanja njihovog morfometrijskog i genetskog profila kako bi se ubuduće mogle pratiti eventualne promjene nastale križanjem izvornih autohtonih jedinki s selekcijskim postupkom uzgojenim maticama.

Rezultati dobiveni provedenom studijom pod nazivom 'Određivanje genetske strukture izvornih prirodnih populacija vrsta od interesa za športsko - rekreacijski ribolov i marikulturu duž istočne obale Jadrana (gof, zubatac, lubina i komarča)' mogu se sažeti slijedećim po(r)ukama:

Komarča *Sparus aurata*

1. Kod populacija komarči iz istočnog dijela Jadranskog mora svi ispitivani mikrosatelitni lokusi bili su polimorfni s prosječnim brojem alela od 9.5 po lokusu. Srednja vrijednost zapažene heterogenosti (genetske raznolikosti) svih ispitivanih populacija komarči iznosila je 0.68 ± 0.2 , dok je očekivana heterozigotnost iznosila 0.78 ± 0.1 , slično prethodnim istraživanjima za atlantske i sredozemne populacije. Kod uzgojne populacije francuskog podrijetla uočena je najniža genetska raznolikost što je izravna posljedica selekcijskog pritiska u mrjestilištima.
2. Višak homozigotnosti i značajno odstupanje nekolicine lokusa od Hardy-Weinbergove ravnoteže zapaženi su kod uzgojne i divlje populacije komarči iz Malostonskog zaljeva što može biti posljedica križanja selekcijski postupkom uzgojenih jedinki (prebjega) s nativnim jedinkama i/ili mrijesta u kavezima s obzirom na produženi uzgojni ciklus vrste.
3. Test usporedbe genetske diferencijacije (F_{ST} test) između parova populacija potvrdio je najveći protok gena između uzgojnih i divljih populacija Malostonskog zaljeva (0.019), te između divljih populacija južnog i srednjeg Jadrana (0.011). Za pretpostaviti je da je visoka izmjena migranata, prvenstveno prebjega iz kaveznog uzgoja osnovni uzrok niske strukturiranosti populacija.

4. Utvrđeno je postojanje dviju populacija komarče. Referentnu populaciju iz srednjeg Jadrana sačinjavala je izvorna populacija 1 (žuta boja) i to s 85% genotipova, dok su populaciju iz uzgoja i divlju populaciju Malostonskog zaljeva sačinjavale izvorna populacija 1 (žuta) i 2 (plava) u skoro jednakim omjerima (48:52 za uzgoj, 50:50 za divlje). Izneseni rezultati dokazuju snažan genetski utjecaj prebjega na lokalne-divlje populacije i na njihovo izvjesno međusobno križanje u prirodnom okolišu.
5. Analizom tjelesne morfologije uzgojnih i divljih populacija iz Malostonskog zaljeva uočeno je da su uzgojne jedinke karakterizirane zdepastijim tijelom s plosnatijim profilnim oblikom glave te kraćim perajnim dimenzijama u odnosu na izduženo tijelo divljih jedinki komarče s manjom tjelesnom visinom. Najveće razlike uočene su na prsnim perajama, visini leđne peraje, najvećoj tjelesnoj visini, podreproj udaljenosti, trupu, promjeru oka te indeksu kondicije. Osnovni pokretač formiranja različitih fenotipskih obilježja uzgojnih komarči jest selekcijski program koji se provodi u mrjestilištima, način i uvjeti uzgojnih tehnologija te samo podrijetlo matičnjaka.
6. Diskriminantnom analizom morfoloških vrijednosti 86% uzorkovanih jedinki točno je klasificirano u divlje ili uzgojno podrijetlo, što i na morfološkoj razini dokazuje prisutnost prebjega u divljim populacijama.
7. U predmetnom istraživanju korištenje molekularnih i morfometrijskih markera omogućilo je precizniju klasifikaciju prebjega unutar prirodnih populacija Malostonskog zaljeva.
8. Dugoročna prisutnost zbjegova u Malostonskom zaljevu utječe na povećanu ekspresiju homozigotnih lokusa i posljedično na smanjenu genetsku raznolikost divljih populacija. Također, uzgojni fenotip, zdepastije tijelo s plosnatijim profilnim oblikom glave te kraćim perajnim dimenzijama, prisutan je kod prirodnih populacija. Zatečeno stanje u Malostonskom zaljevu, gdje uzgojne populacije nakon zbjega iz kaveza nalaze obilje hrane oko mnogobrojnih uzgajališta školjkaša što im omogućuje povećano preživljavanje i reprodukciju s prirodnim populacijama, utječe na alternaciju genetske strukture prirodnih populacija komarči i gubitka autohtonosti istih. Zbog prevencije još veće genetske erozije prirodnih populacija nužno je smanjiti uzgoj mlađi inozemnog podrijetla, te posljedično povećati komercijalnu proizvodnju autohtone mlađi u Hrvatskoj kako bi se zadovoljila tržišna potražnja. Poribljavanje istočne obale Jadrana dopustivo je jedino i samo s izvornim jadranskim jedinkama (divljim maticama). Veća kontrola kaveznih mreža i učestalije čišćenje obraštaja,

također može znatno smanjiti brojnost zbjegova uzgojnih komarči i posljedično genetsko onečišćenje prirodnih populacija. .

Lubin *Dicentrarchus labrax*

9. Kod 12 populacija lubina uzorkovanih iz geografski različitih lokacija duž istočne obale Jadranskog mora, svi ispitivani mikrosatelitni lokusi ($n=10$) bili su polimorfni s prosječnim brojem alela od 11.4 po lokusu. Srednja vrijednost zapažene heterogenosti (genetske raznolikosti) svih ispitivanih populacija lubina iznosila je 0.76 ± 0.1 , dok je očekivana heterozigotnost iznosila 0.88 ± 0.1 , što je u skladu s prethodnim istraživanjima za atlantske i sredozemne populacije.
10. Višak homozigotnosti i značajno odstupanje nekolicine lokusa od Hardy-Weinbergove (H-W) ravnoteže zapaženi su kod dviju uzgojnih populacija atlantskog porijekla (UL-Ugljan-FRA, UL-Brač-FRA) te kod divlje populacije iz Novigradskog mora. Nenasumično križanje te križanje jedinki u bliskom srodstvu, što se dešava u komercijalnim mrjestilištima u kojima ne postoji kontrola genotipova, može rezultirati značajnim odstupanjem od H-W ravnoteže kod uzgojnih populacija, dok kod divljih populacija to može biti uzrokovano uzorkovanjem različitih subpopulacija s različitim alelnim frekvencijama.
11. Ukupna vrijednost fiksacijskog indeksa F_{ST} , kao mjera protoka gena između ispitivanih populacija, iznosila je 0.053 s značajnom p -vrijednošću manjom od 0.001. Relativno visoka vrijednost indeksa upućuje na postojanje genetske strukturiranosti populacija odnosno da je protok gena između ispitivanih populacija ograničen, odbacujući nul-hipotezu da su populacije lubina u Jadranu u panmiksiji.
12. Filogenetsko stablo izgrađeno od dva jasno odijeljena sestrinska klastera ukazuje na geografsko grupiranje populacija na srednji i sjeverni Jadran, s jasno izdvojenim uzgojnim populacijama atlantskog porijekla. Najveća genetska sličnost uočena je između populacija Rijeke, Paga, Novigradskog mora i Piranskog zaljeva (sjeverni Jadran) te između populacija iz Makarske, Jadrtovcva i uzgojne populacije o. Ugljana Jadranskog porijekla (srednji Jadran).
13. Grupiranjem populacija s obzirom na populacijski karakter (uzgojne i divlje), molekularnom analizom varijance utvrđena je značajna razlika između ispitivanih grupa, ukazujući da utjecaj zbjegova lubina iz kaveza nije intenzivan kao što je to slučaj kod komarče. Jedino kod prirodne populacije lubina Piranskog zaljeva uočena je znatna genetska sličnost s uzgojnom populacijom talijanskog podrijetla uzorkovanih

također u Piranskom zaljevu sugerirajući genetske interakcije prebjega s lokalnim populacijama

14. S obzirom da su uzgojne populacije iz zapadnog Mediterana i Atlantika veoma genetski udaljene od populacija iz istočnog Jadrana, dugoročni uzgoj populacija iz Atlantika može utjecati na stabilnost autohtonih i lokalno adaptiranih genotipova divljih jadranskih populacija lubina.

Gof *Seriola dumerili*

15. Kod 5 populacija gofa uzorkovanih iz sjevernog, srednjeg, južnog Jadrana, Balearskog mora te Ionskog mora, svi ispitivani mikrosatelitni lokusi ($n=8$) bili su polimorfni s prosječnim brojem alela od 7.5 po lokusu. Srednja vrijednost zapažene heterogenosti (genetske raznolikosti) svih ispitivanih populacija iznosila je 0.66 ± 0.2 , dok je očekivana heterozigotnost iznosila 0.68 ± 0.2 .
16. Svi ispitivani lokusi kao i sve populacije bili su u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži. Može se zaključiti da su ispitivane populacije okarakterizirane visokom efektivnom veličinom, te da postojeći ribolovni pritisak ne utječe na njihovu stabilnost.
17. Ukupna vrijednost fiksacijskog indeksa F_{ST} , kao mjera protoka gena između ispitivanih populacija, iznosio je 0.006 s p -vrijednošću većom od 0.8. Niska vrijednost indeksa upućuje na postojanje znatnog protoka gena između ispitivanih populacija što onemogućuje jačanje genetske strukturiranosti populacija te se nul-hipoteza o prisutnosti panmiksičnih populacija gofa u Mediteranu ne može odbaciti.
18. Budući da su mnogobrojna istraživanja potvrdila da je glavno područje mrijesta gofa locirano u centralnom Mediteranu, između južne obale Sicilije i obale Tunisa, izvan Pelagijskih otoka, za pretpostaviti je da je okupljanje spolno zrelih jedinki iz cijelog Mediterana, uključujući jedinke iz Jadrana, oko istog područja mrijesta i u istom vremenskom periodu omogućilo razmjenu genetskog materijala i uspostavljanje znatnog protoka gena između različitih populacija, što je potvrđeno niskom vrijednošću fiksacijskog indeksa F_{ST} kao i rezultatima molekularne analize varijance (AMOVA test), gdje je 0.57% varijabilnosti pripisano razlikama na razini populacije, dok je 97.36% varijabilnosti pripisano razlikama na razini svih jedinki.
19. Na filogenetskom stablu dobivenom na osnovu Cavalla-Sforza i Edwards (1967) kohord genetske udaljenosti, uočljivo je da nema populacijskog grupiranja s obzirom na geografsku pripadnost, dok je populacija južnog Jadrana genetski najudaljenija u usporedbi s ostalim populacijama, što otvara mogućnost postojanja više područja

mriješta, ili mriješta populacija u različitim vremenskim razdobljima, budući da gof po strukturi ovarija ima parcijalni i grupno-sinkronizirani mriješt.

20. Analizom mitohondrijske DNA utvrđena je prisutnost 8 različitih haplogrupa u svim populacijama gofa. Također, uočena je visoka vrijednost ukupne raznolikosti haplotipova (h) 0.44 ± 0.06 , te niska vrijednost nukleotidne raznolikosti (π) 0.0016 ± 0.0002 , a to ukazuje na nedavnu naglu demografsku ekspanziju populacija *S. dumerili*, što je u korelaciji sa široko uočenim uzorkom ekspanzije populacija organizama različitih taksonomskih skupina u Sredozemlju nakon posljednjeg glacijalnog razdoblja.

Zubatac *Dentex dentex*

21. Analizom mitohondrijske DNA, kod istraživanih populacija zubaca *Dentex dentex* uzorkovanih iz sjevernog, srednjeg i južnog Jadrana, iz uzgoja te iz Balearskog mora, ukupno je utvrđena prisutnost od 13 različitih haplotipova. Također, uočena je visoka vrijednost ukupne raznolikosti haplotipova (h) 0.53 ± 0.04 , te niska vrijednost nukleotidne raznolikosti (π) 0.0010 ± 0.0001 , što ukazuje da su razlike između haplotipova male jer ih u najvećem broju čini razlika samo jednog nukleotida.
22. Na osnovu rezultata testova demografske povijesti i rekonstrukcije filogenetskih odnosa haplotipova vrste *D. dentex* utvrđeno je da su populacije prošle naglu demografsku ekspanziju u povijesti.
23. Testom usporedbe populacijske diferencijacije (F_{st} test) nije utvrđena genetska strukturiranost populacija, te se genetske razlike nalaze unutar samih populacija. Jedino su populacije iz uzgoja Jadranskog podrijetla pokazale značajnu genetsku udaljenost naspram svim ostalim populacijama, što je vjerojatno uvjetovano značajnim selekcijskim pritiskom nad korištenim matičnjacima s ciljem dobivanja komercijalno poželjnog fenotipa.
24. Nagla demografska ekspanzija zubaca u prošlosti koja je vjerojatno nastala nakon posljednjeg glacijalnog razdoblja i ulaskom slane vode u Mediteran rezultirala je snažnim protokom gena između populacija te do danas, uzimajući u obzir ograničeno vremensko razdoblje, nije uvjetovala divergenciju mitohondrijske DNA između ispitivanih populacija.
25. Za detaljniju i recentniju analizu populacijske strukture vrste *D. dentex*, nužno je razviti i analizirati nuklearne markere kao što su mikrosateliti obzirom da su

okarakterizirani visokom razinom mutacija te su kao takvi informativniji u analizi nedavno stvorenih populacijskih razlika.

6. LITERATURA

- Alarcón, J.A., Magoulas, A., Georgakopoulos, T., Zouros, E., Alvarez, M.C., 2004. Genetic comparison of wild and cultivated European populations of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 230, 65-80.
- Altukhov P., Salmnekovala, E.A. 1994. Straying intensity and genetic differentiation in salmon populations. *Aquaculture and Fisheries Management*, 25 (Supplement 2): 99-102.
- Andaloro F., Potoschi A., Porrello S. 1992. Contribution to the knowledge of growth of greater amberjack, *Seriola dumerili* (Cuv., 1817) in the Sicilian Channel (Mediterranean Sea). *Rapp. Comm. Int. Mer Medit.* 33, 282.
- Arechavala-Lopez P., Uglem I., Fernandez-Jover D., Bayle-Sempere J.T., Sanchez-Jerez P. 2011. Immediate postescape behaviour of farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in the Mediterranean Sea. *J Appl Ichthyol* 27: 1375–1378.
- Badalamenti F., D’Anna G., Lopiano L., Scilipoti D., Mazzola A. 1995. Feeding habits of young-of-the-year greateramberjack *Seriola dumerili* (Risso, 1810) along the N/W Sicilian Coast. *Sci. Mar.* 59, 317–323.
- Bandelt H-J, Forster P, Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16:37-48.
- Bargelloni L, Alarcon JA, Alvarez MC *et al.* 2003. Discord in the family Sparidae (Teleostei): divergent phylogeographical patterns across the Atlantic-Mediterranean divide. *Journal of Evolutionary Biology*, 16, 1149–1158.
- Bargelloni L, Alarcon JA, Alvarez MC *et al.* 2005. The Atlantic-Mediterranean transition: discordant genetic patterns in two seabream species, *Diplodus puntazzo* (Cetti) and *Diplodus sargus* (L.). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 36, 523–535.
- Benović A. 1980. The problems and perspectives of Mariculture in the southern Adriatic region. *Nova Thalassia* 4 Suppl.: 105-111.
- Boore J.L. 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res* 27: 1767-1780.
- Borrell, Y., Carleos, C.E., Asturiano, J.F., Bernardo, D., Vázquez, E., Corral, N., Sánchez, J.A., Blanco, G., 2007. Use of microsatellites and a combinatorial optimization approach in the acquisition of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) broodstocks for hatcheries. *Aquaculture* 269, 200-210.
- Carlsson J., McDowell J. R., Diaz-Jaimes P., Carlsson J. E. L., Boles S. B., Gold J. R., Graves J. E. 2004. Microsatellite and mitochondrial

- DNA analyses of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus thynnus*) population structure in the Mediterranean Sea. *Molecular Ecology*, 13: 3345-3356.
- Castilho R., Ciftci Y. 2005. Genetic differentiation between close eastern Mediterranean *Dicentrarchus labrax* (L.) populations. *Journal of Fish Biology*, 67: 1746-1752.
- Cavalli-Sforza, L.L., Edwards, A.W.F., 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *Amer. J. Hum. Genet.* 19, 233-257.
- Coscia I., Vogiatzi E., Kotoulas G., Crivelli A., Poizat G., Berrebi P., Jesensek D., Rubin J. F. 2000. Conservation biology applied to fish: The example of a project for rehabilitating the marble trout (*Salmo marmoratus*) in Slovenia. *Cybiurn*, 24, (3), 211–230.
- Dimitriou E, Katselis G, Moutopoulos DK, Akovitiotis C, Koutsikopoulos C. 2007. Possible influence of reared gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) on wild stocks in the area of the Messolonghi lagoon (Ionian Sea, Greece). *Aquacult Res* 38: 398–408.
- Excoffier, L., Lischer, H.E., 2010. Arlequin suite version 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10, 564-567.
- Felsenstein, J., 1993. Phylogeny Inference Package (PHYLIP). Version 3.5. University of Washington, Seattle.
- Fleming, I.A., K. Hindar, I.B. Mjølnerød, B. Jonsson, T. Balstad & A. Lamberg. 2000. Lifetime success and interactions of farm salmon invading a native population. *Proc. Biol. Sci.*, 267:1517-1523.
- Ford-Lloyd B., Painting K. 1996. Measuring genetic variation using molecular markers. Version 1.2. International Plant Genetic Resource Institute. <http://www.cgiar.org/ipgri>
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology & Biotechnology*, 3, 294–299.
- Forrest B, Keeley N, Gillespie P, Hopkins G, Knight B, Govier D. 2007. Review of the Ecological Effects of Marine Finfish Aquaculture: Final Report. Cawthron institute, Nelson, 80 str.
- Galtier N., Nabholz B., Glémin S., Hurst G. 2009.. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology*, vol. 18, 4541-4550.
- García de León F.J., Chikhi L., Bonhomme F. 1997. Microsatellite polymorphism and population subdivision in natural populations of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Molecular Ecology*, 6: 51 -62.
- Gonzalez-Wanguemert M., Froufe E., Perez-Ruzafa A., Alexandrino P. 2011.

- Phylogeographical history of the white seabream *Diplodus sargus* (Sparidae): implications for insularity. *Marine Biology Research*, 7, 250–260.
- Goudet, J., 2002. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). URL: <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O., 2010. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* 27, 221-224.
- Giovanardi O., Mattioli G., Picchetti C., Smabucci G. 1984. Prime esperienze della Ricciola (*Seriola dumerilii*, Risso 1810) in Italia. *It. Piscic. Ittiop.* A-XIX NO 4: 123-130.
- Grau A. 1992. Aspectos histológicos, ciclo reproductor y principales procesos patológicos de *Seriola dumerilii*, 1810 (Carangidae). PhD Thesis, Facultat de Veterinaria, Universitat Autònoma, Barcelona.
- Greco S., Arena G., Caridi D., Micale V. 1991. An improved method of capture and transport for juveniles of *Seriola dumerili*. In: De Pauw, N., Joyce, J. (Eds.), *Aquaculture and Environment*. Dublin Aquaculture 1991, 14, 130-131.
- Grigorakis K. 2010. Ethical issues in aquaculture production. *J. Agric. Environ. Ethics*, 23: 345-370.
- Guo, S., Thompson, E., 1992. Performing the exact test of Hardy–Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48, 361–372.
- Hansen A.J., Willerslev E., Wiuf C., Mourier, T., Arctander, P. 2001 Statistical evidence for miscoding lesions in ancient DNA templates. *Molecular Biology and Evolution* 18, 262–265.
- Hills, D.M. & J.J. Bull. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.*, 42: 182-192.
- Hoelzel A.R., Dover G.A. 1991. *Molecular genetic ecology*. IRL press at Oxford University Press, Oxford.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, 17: 754–755.
- Jackson D., Drumm A., McEvoy S., Jensen Ø. and others 2012. A pan-European evaluation of the extent, causes and cost of escape events from sea-cage fish farming. In: PREVENT ESCAPE Project Compendium. Chapter 2. Commission of the European Communities, 7th Research Framework Program. Available at www.preventescape.eu
- Jensen Ø, Dempster T, Thorstad EB, Uglem I, Fredheim A. 2010. Escapes of fishes from Norwegian sea-cage aquaculture: causes, consequences and prevention. *Aquacult*

- Environ Interact 1: 71–83.
- Karaiskou, N., Triantafyllidis, A., Katsares, V., Abatzopoulos, T.J., Triantaphyllidis, C., 2009. Microsatellite variability of wild and farmed populations of *Sparus arata*. J. Fish Biol. 74, 1816-1825.
- Koljonen M.L. 2001. Conservation goals and fisheries management units for Atlantic salmon in the Baltic Sea area. Journal of Fish Biology, 59 (Supplement A): 269–288.
- Kozul V., Skaramuca B., Kraljevic M., Dulcic J., Glamuzina B., 2001. Age, growth and mortality of the Mediterranean amberjack *Seriola dumerili* (Risso 1810) from the south-eastern Adriatic Sea. Journal of Applied Ichthyology, 17: 134-141.
- Kumar, S., Tamura & M. Nei. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Brief. Bioinform., 5: 150-163.
- Laird, P.W., Zijderveld, A., Linders, K., Rudnicki, M.A., Jaenisch, R., Berns, A., 1991. Simplified mammalian DNA isolation procedure. Nucl. Acid Res. 19, 4293.
- Laikre L., Palm S., Ryman N. 2005. Genetic population structure of fishes: implications for coastal zone management. Ambio 34: 111-119.
- Larget B, Simon DL. 1999. Markov chain Monte Carlo algorithms for the Bayesian analysis of phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution, 16: 750–759.
- Lazzari A., Barbera G. 1988. First data on the fishing of yellowtail (*Seriola dumeril*) spawners in the mediterranean basin. Journal Aquatic Products, 2(1): 133-142.
- Lazzari A., Barbera G. 1989. Farming the Mediterranean yellowtail, *Seriola dumerili* (Risso, 1810) in concrete ponds: results and perspectives. In: De Pauw, N., Jaspers, E., Ackefors, H., Wilkins, N. (Eds.) Aquaculture A Biotechnology in progress. Bredene, Belgium. EAS: 209 213.
- Librad, P., Rozas J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics 25: 1451-1452.
- Lynch M., Jarrell P.E. 1993. A method for calibrating molecular clocks and its application to animal mitochondrial DNA. Genetics 135:1197–2208.
- Mazzola A., Sara G., Favaloro E., Mirto S. 1996. Sistemi di maricoltura open-sea per l'allevamento di *Seriola dumerili* _Pisces, Osteichthyes. nel Golfo di Castellammare Sicilia Occidentale.. Biol. Mar. Medit. 3, 176–185.
- McGinnity P., Prodohl P., Ferguson A., Hynes R., Maoileidigh N.O., Baker N., Cotter D., O'Hea B., Cooke D., Rogan G., Taggart J., Cross T. 2003. Fitness reduction and potential extinction of wild populations of Atlantic salmon, *Salmo salar*, as a result of

- interactions with escaped farm salmon. *Proc. Biol. Sci.*, 270(1532): 2443-2450.
- Miggiano E., Lyons R.E., Li Y., Dierens L.M., Crosetti .D, Sola L. 2005. Isolation and characterization of microsatellite loci in the striped mullet, *Mugil cephalus*. *Mol Ecol Notes* 5: 323–326.
- Miller P. A., Fitch A. J., Gardner M., Hutson K. S, Mair G. 2011. Genetic population structure of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) in temperate Australian waters inferred from microsatellite markers and mitochondrial DNA. *Aquaculture* 319:328–336.
- Moritz, C, Hillis, D. M. 1996. Molecular systematics: context and controversies. **In** *Molecular Systematics*, Second Edition, eds. D. M. Hillis, C. Moritz and B. K. Mable, pp. 1-13. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Mylonas C.C., Papandroulakis N., Smboukis A., Papadaki M., Divanach P. 2004. Induction of spawning of cultured greater amberjack (*Seriola dumerili*) using GnRH α implants. *Aquaculture*, 237, 141–154.
- Naciri M, Lemaire C, Borsa P, Bonhomme F. 1999. Genetic study of the Atlantic/Mediterranean transition in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Heredity*, 90, 591–596.
- Navarro A., Zamorano M.J., Hildebrandt S., Gines R., Aguilera C., Afonso J.M. 2009. Estimates of heritabilities and genetic correlations for growth and carcass traits in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.), under industrial conditions. *Aquaculture*, 289: 225-230.
- Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, 512 str.
- Oosterhout C.V., Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* 4, 535–538.
- Page, R. D. M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.
- Pavlović A. 2010. Aktualni trenutak u marikulturi. Zbornik sažetaka, 16. Susret ribara, Hrvatska obrtnička komora, Poreč.
(http://www.hok.hr/cro/cehovi/cehovska_dogadanja/15_susret_ribara_porec)
- Pickett G. D., Pawson M. G. *Fish and Fisheries Series*, 12. London: Chapman & Hall; 1994. Sea Bass. *Biology, Exploitation and Management*; p. 358.
- Pipitone C., Andaloro F. 1995. Food and feeding habits of juvenile greater amberjack,

- (Osteichthyes, Carangidae) in inshore waters of the central Mediterranean sea. *Cybium*, 19(3): 305-310.
- Porrello S., Andaloro F., Vivona P., Marino G. 1993. Rearing trial of *Seriola dumerili* in a floating cage. In: Barnabe, G., Kestemont, P. Eds. Production, Environment and Quality. Bordeaux Aquaculture 1992.nEAS, Special publication Ghent, Belgium 1993, 18, 299–307.
- Pritchard J.K., Stephen, M., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945–959.
- Pujolar J. M., Roldan M. I., Pla C. 2002. A genetic assessment of the population structure of swordfish (*Xiphias gladius*) in the Mediterranean Sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 276: 19–29.
- Pujolar J.M., Roldán M.I., Pla C. 2003. Genetic analysis of tuna populations, *Thunnus thynnus thynnus* and *T. alalunga*. *Marine Biology*, 143, 613 –621.
- Raymond M., Rousset F. 2003. A population genetic software for exact test and ecumenicist: GENEPOP version 3.4. *Heredity* 68, 248-249.
- Rogdakis Y., Koukou K., Ramfos A., Dimitriou E., Katselis G. 2011. Comparative morphology of wild, farmed and hatchery – released gilthead sea bream (*Sparus aurata*) in western Greece. *International Journal of Fisheries and Aquaculture*, 3: 1 – 9.
- Rogers A.R., Harpending H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9: 552–569.
- Rosenberg N.A. 2004. Distruct: A program for the graphical display of population structure. *Mol. Ecol. Notes* 4, 137–138.
- Rosenberg, N.A., Calabrese, P.P., 2004. Polyploid and multilocus extensions of the Wahlund inequality. *Theor. Pop. Biol.* 66, 381-391.
- Ruzzante D.E., Hansen M.M., Meldrup D., Ebert K. 2004. Stocking impact and migration pattern in an anadromous brown trout (*Salmo trutta*) complex: where have all the stocked spawning sea trout gone? *Molecular Ecology* 13: 1433-1445.
- Reist J.D. 1985. An empirical evaluation of several univariate methods that adjust size variation in morphometric data. *Canadian Journal of Zoology*, 63: 1429 – 1439.
- Ryman N., Utter F. 1987. Population Genetics & Fishery Management. University of Washington Press, 420 pp.
- Saitou N., Nei M. 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4: 406-425.

- Skaala Ø., Wennevik V., Glover K.A. 2006. Evidence of temporal genetic change in wild Atlantic salmon, *Salmo salar* L., populations affected by farm escapees. *ICES J. Mar. Sci.*, 63: 1224-1233.
- Slatkin M. 1985. Gene flow in natural populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 16, 393-430.
- Šegvić-Bubić T., Lepen I., Trumbić Ž., Ljubković J., Sutlović D., Matic-Skoko S., Grubišić L., Glamuzina B., Mladineo I. 2011. Population genetic structure of reared and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) in the Adriatic Sea inferred with microsatellite loci, 318: 309 – 315.
- Tajima F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, 105: 437–467.
- Treer T., Safner R., Aničić I., Lovrinoc M. 1995. Morfologija riba. U: Habeković. D. (Ed.), Ribarstvo. Nakladni zavod Globus, Zagreb, str. 69 – 74.
- Treer T. 1993. Upotrebljivost merističkih i morfometrijskih svojstava u razlikovanju ribljih populacija. *Ribarstvo*, 48: 13 – 26.
- Tsigenopoulos C.S., Mariani S. 2012. Exploring neutral and adaptive processes in expanding populations of gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., in the North-East Atlantic. *Heredity*, 108,537-546.
- Ward R.D. 2006. The importance of identifying spatial population structure in restocking and stock enhancement programmes. *Fisheries Research*, Vol.80, No.1, (August 2006), pp. 9-18, ISSN 0165-7836.
- Weir B.S., Cockerham C.C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38, 1358-1370.
- Zhang D-X, Hewitt G.M. 1996. Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 247-251.
- Yeh F., Yang R., Boyle T. 2000. POPGENE version 1.32: A Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis. Molecular biology and biotechnology centre. University of Alberta, Edmonton, Canada. URL: <http://www.ualberta.ca/~fyeh/info.htm>.

