

**Univerzitet u Beogradu
Biološki fakultet**

mr Saša P. Marić

**Evolucijska istorija kompleksa potočne
pastrmke *Salmo trutta* L. 1758 na području
Republike Srbije i značaj za ribarstvo**



Doktorska disertacija

Beograd, 2005.

Univerzitet u Beogradu
Biološki fakultet

mr Saša P. Marić

Evolucijska istorija kompleksa potočne
pastrmke *Salmo trutta* L. 1758 na području
Republike Srbije i značaj za ribarstvo

Mentor:

dr Predrag Simonović – vanredni profesor

Biološki fakultet

Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

dr Jelka Crnobrnja - Isailović – naučni saradnik

Institut za biološka istraživanja «Siniša Stanković» Beograd

dr Aleš Snoj – naučni saradnik

Biotehnički fakultet

Univerzitet u Ljubljani

Datum odbrane:

Doktorska disertacija

Beograd, 2005.

Zahvalnica

Zahvaljujem se svima koji su mi na bilo koji način olakšali rad na izradi disertacije i koji su svojim zalaganjem i nesebičnošću doprineli da ona ugleda svetlost dana.

Srdačno se zahvaljujem mentoru i članovima Komisije na korektnom i profesionalnom odnosu punom razumevanja.

Zahvaljujem se mentoru Prof. dr Predragu Simonoviću, koji mi je, osim istina iz ove nauke, pokazao da se autoritet i poštovanje stiču jedino znanjem i korektnim odnosom prema kandidatu. Posebno se zahvaljujem za ukazano poverenje i neograničenu slobodu.

Zahvaljujem se dr Alešu Snoju koji je rukovodio laboratorijskim radom i koji me je upoznao sa metodama molekularne genetike. Posebno mu se zahvaljujem na posvećenom vremenu, izuzetnom stpljenju, ukazanom poverenju, ustupljenoj literaturi, savetima, kao i odnosu za koji sigurno mogu reći da prevazilazi granice profesionalnog.

Takođe se zahvaljujem dr Jelki Crnobrnji – Isailović koja mi je izašla u susret kada je to bilo neophodno, i u najkraćem roku pregledala disertaciju dajući veoma korisne sugestije.

Zahvaljujem se Nenadu Sekuliću iz Zavoda za zaštitu prirode Srbije na ustupljenom materijalu sa područja Kosova i Metohije, kao i kolegama Prof. dr Božidaru Ćurčiću, Prof. dr Predragu Simonoviću, Doc. dr Veri Nikolić, dr Ljiljani Tomović, Vladanu Bjedovu, Rastku Ajtiću, Nikoli Kolundžiću, Čedomiru Mijoviću i Žiki Milenkoviću, predsedniku Ribarskog područja «Južna Morava I» Leskovac, koji su mi na različite načine pomogli u prikupljanju analiziranog materijala.

Zahvaljujem se kolegama dr Simoni Sušnik, mr Andreju Raspetu, mr Tamari Jug, mr Brigiti Slavec, mr Poloni Frajman i Vidi Štuhec sa Biotehničkog fakulteta u Ljubljani koji su mi pomogli u prevazilaženju svih laboratorijskih problema i koji su svojom ljubaznošću i gostoprimstvom svakako doprineli da mi deo izrade teze koji se odvijao na Biotehničkom fakultetu u Ljubljani ostane u prelepom sećanju.

Zahvaljujem se kolegama Prof. dr Milošu Kaleziću, Doc. dr Ani Ivanović, dr Ljiljani Tomović i mr Imreu Krizmaniću na razumevanju i peuzimanju dela nastavnih i drugih obaveza za vreme izrade disertacije.

Takođe se zahvaljujem mr Tamari Karan Žnidaršič na korisnim sugestijama vezanim za tehničku obradu teksta, a mr Biljani Stojković za pomoć pri tumačenju pojedinih rezultata.

Posebno bih se zahvalio svojim roditeljima, bratu i naravno supruzi Katarini, za pruženu podršku, moralnu potporu i sva odricanja koja su bila neminovna prilikom izrade disertacije. Najlepše vam hvala.

Saša Marić

Izvod

Za rasvetljavanje filogeografije populacija potočne pastrmke (*Salmo trutta*) na području Republike Srbije, sekvencioniran je 5' kraj kontrolnog regiona mtDNA u dužini od 561 bp i dobijene sekvence upoređene su sa poznatim sekvencama iz prethodnih istraživanja na drugim teritorijama. U analizu je uključena 101 jedinka poreklom iz gornjih tokova reka crnomorskog, egejskog i jadranskog sliva. Sekvencioniranjem je identifikovano petnaest haplotipova, od kojih se četrnaest smatra autohtonim i oni pripadaju dunavskoj i jadranskoj liniji, dok samo jedan haplotip (ATcs1), pronađen kod dve jedinke poreklom iz dve poribljavane reke, pripada atlantskoj liniji koja je komercijalizovana i najčešće korišćena za poribljavanje. Autohtoni haplotipovi odlikuju se izrazitom geografskom distribucijom: dunavski haplotipovi su strogo ograničeni na reke dunavskog sliva, dok jadranski haplotipovi dominiraju u rekama egejskog i jadranskog sliva; najveći deo ukupne molekularne varijanse (69%) pripisan je upravo razlikama između slivova. Filogenetskom rekonstrukcijom, koja je dopunjena sa šest novih haplotipova, po prvi put opisanih u ovom radu, podržano je stanovište o ancestralnoj poziciji dunavske linije unutar kompleksa potočne pastrmke, kao i naglašeno postojanje posebne *farioides* (Ad+) klade otkrivene unutar jadransko-mediteranske-*marmoratus* filogenetske grupe. Dobijeni rezultati potvrdili su naša očekivanja o postojanju visokog genetičkog diverziteta balkanskih populacija potočne pastrmke, što zahteva dalja istraživanja koja bi trebala da obuhvate pastrmske populacije iz celog regiona.

Abstract

In order to reconstruct phylogeographic pattern of brown trout (*Salmo trutta*) populations in the Balkan state of Serbia, the 561 bp 5'-end of mtDNA control region was sequenced in 101 individuals originating from headwater tributaries of the Danubian, Aegean and Adriatic drainages. These sequences were compared to corresponding ones obtained in previous studies. Fourteen of fifteen haplotypes representing the Danubian and Adriatic lineages of brown trout were considered native. Only one haplotype (ATcs1), found in two individuals originating from two stocked rivers, corresponded to the Atlantic lineage, which was most likely introduced into commercial hatcheries in the region. Native haplotypes exhibited a strong geographic pattern of distribution: the Danubian haplotypes were strictly confined to the Danubian drainage, while the Adriatic haplotypes dominated in the Aegean and Adriatic drainages; most of the total molecular variance (69%) was attributed to differences among the drainages. Phylogenetic reconstruction, supplemented with six new haplotypes described in this study, supported the considering of the ancestral position of the Danubian lineage within the brown trout complex. The results pointed to the existence of a distinct *farioides* (Ad+) clade, detected within the Adriatic-Mediterranean-*marmoratus* phylogenetic assemblage. The obtained data confirm our assumption of the existence of high genetic diversity in Balkan trout populations. The results from this study point on wider survey that should include trout stocks from the whole region.

Sadržaj

	Zahvalnica.....	III
	Izvod	IV
	Abstract.....	V
	Sadržaj.....	VI
	Skraćenice i simboli.....	VIII
1.	<u>UVOD</u>	1
1.1.	Uvodne napomene	1
1.2.	Pregled literature	3
1.2.1.	Uopšteno o Salmonidama	3
1.2.2.	Karakteristike familije Salmonidae.....	4
1.2.3.	Klasifikacija i filogenetski odnosi unutar familije Salmonidae.....	5
1.2.4.	<i>Salmo trutta</i> (Linnaeus, 1758) - potočna pastrmka.....	12
1.2.5.	Metode razlikovanja ribljih populacija	21
1.2.5.1.	Morfološke metode razlikovanja ribljih populacija.....	21
1.2.5.2.	Genetičke metode razlikovanja ribljih populacija	22
1.2.5.2.1.	Alozimi	23
1.2.5.2.2.	Savremeni genetički markeri	24
1.2.5.2.2.1.	Ponavljajuća DNA	25
1.2.5.2.2.1.1.	Mikrosateliti.....	25
1.2.5.2.2.2.	Mitohondrijalna DNA.....	27
1.2.5.2.2.2.1.	Osobine mitohondrijalne DNA	28
1.2.5.2.2.2.2.	Mitohondrijska DNA kao genetski marker.....	31
1.2.5.2.2.2.3.	Upotreba mtDNA za proučavanje vrsta i populacija salmonida.....	32
1.2.6.	Ugroženost potočne pastrmke (<i>Salmo trutta</i>) u Evropi	35
1.3.	Ciljevi rada.....	38
2.	<u>MATERIAL I METODE</u>	39
2.1.	Materijal.....	39
2.1.1.	Prikupljanje i čuvanje uzoraka.....	39
2.1.2.	Raspored lokaliteta i brojnost analiziranih uzoraka.....	40
2.1.3.	Hemikalije.....	42
2.1.3.1.	Pripremljeni setovi hemikalija	42
2.1.3.2.	Enzimi	42
2.1.3.3.	Početni oligonuklotidi (prajmeri).....	43
2.1.3.4.	Markeri.....	43
2.1.3.5.	Puferi.....	43
2.1.4.	Laboratorijska oprema	43
2.2.	Metode	44
2.2.1.	Izolacija DNA	44
2.2.1.1.	Fenolna ekstrakcija	44
2.2.1.2.	Wizard [®] Genomic DNA Purification Kit	45
2.2.1.3.	Jet quick tissue DNA spin kit/250	45

2.2.2.	Provera uspešnosti izolacije DNA	45
2.2.3.	Lančana reakcija polimeraze (PCR)	46
2.2.4.	Restrikciona analiza kontrolnog regiona mtDNA.....	48
2.2.5.	Sekvencioniranje mitohondrijalne DNA.....	48
2.2.5.1.	Izolacija fragmenata DNA iz agaroznog gela	48
2.2.5.2.	Priprema reakcije za automatski sekvenator	49
2.2.5.3.	Priprema DNA fragmenata za sekvencioniranje.....	50
2.2.5.4.	Sekvencioniranje DNA fragmenata	50
2.2.6.	Programska analiza kontrolnog regiona mtDNA.....	51
3.	<u>REZULTATI</u>	53
3.1.	Analiza kontrolnog regiona mtDNA upotrebom RFLP tehnike	53
3.2.	Analiza sekvencioniranja kontrolnog regiona mtDNA.....	54
3.2.1.	Upoređivanje sekvenci kontrolnog regiona mtDNA pronađenih haplotipova na teritoriji Srbije sa već poznatim haplotipovima potočne pastrmke iz svih filogenetskih linija	63
4.	<u>DISKUSIJA</u>	71
4.1.	Analiza kontrolnog regiona mtDNA.....	72
4.2.	Paleozoogeografska razmatranja, sa osvrtom na kolonizaciju Evrope potočnom pastrmkom	81
4.3.	Konzervacija genetičke raznovrsnosti populacija potočne pastrmke	95
4.3.1.	Specifičnosti konzervacije potočne pastrmke	95
4.3.2.	Status ugroženosti potočne pastrmke u Evropi.....	97
4.3.3.	Definisanje konzervacionih jedinica.....	98
4.3.4.	Krajnja preporuka u konzervaciji potočne pastrmke	99
4.3.5.	Konzervacija diverziteta haplotipova u Srbiji i značaj za ribarstvo	100
5.	<u>ZAKLJUČCI</u>	107
6.	<u>SUMMARY</u>	111
7.	<u>LITERATURA</u>	113

Skraćenice i simboli

A	adenin
ATP	adenozin trifosfat
bp	bazni par
C	citozin
ddNTP	2', 3' – dideoksinukleozid 5'–trifosfat
DNA	dezoksiribonukleinska kislina
dNTP	2' – deoksinukleozid 5' – trifosfat
EDTA	etilen – diamino – tetraosirćetna kislina
eng.	engleski
G	guanin
kbp	hiljadu baznih parova
mtDNA	mitohondrijska DNA
PCR	polymerase chain reaction
pH	negativni logaritam koncentracije vodonikovih jona
RFLP	restriction fragment lenght polymorphism
RNA	ribonukleinska kislina
rRNA	ribozomalna RNA
SDS	sodium dodecyl sulphate
T	timin
TAE	rastvor Trisa, acetata u EDTA
Taq DNA–polimeraza	DNA – polimeraza, izolovana iz <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	rastvor Trisa, borata u EDTA
TEN	rastvor Trisa, EDTA u NaCl
Tris	2 – amino – 2 – (hidroksimetil) – 1, 3 – propandiol
tRNA	transportna RNA
TSR	template suppresion reagent