

Ribarstvo, 60, 2002, (3), 116–126
T. Odak i sur.: Primjena molekularnih metoda

ISSN 1330-061X
CODEN RIBAEG

UDK 639.3.04:575.1
Izlaganje sa znanstvenog skupa

PRIMJENA MOLEKULARNIH METODA U RIBARSTVU

T. Odak, T. Treer, I. Aničić, R. Safner, M. Piria

Sažetak

Velika različitost među ribljim populacijama i vrstama, od kojih neke nisu do kraja definirane (npr. vrste roda *Cobitis*), te negativni čovjekov utjecaj zbog prevelike eksploatacije, neadekvatnih poribljavanja, te promjena prirodnih sredina osigurali su činjenicu da su ribe postale središtem brojnih molekularno-bioloških istraživanja. Ovdje dajemo pregled nekih češće primjenjivanih tehnika u razlikovanju ribljih populacija, osvrćemo se na njihove prednosti i nedostatke. U uzgoju riba daje se uvid u problem redukcije genetske različitosti, kako u slatkovodnom ribarstvu (npr. šarana, *Cyprinus carpio*), tako i u marikulturi (npr. lubina, *Dicentrarchus labrax*).

Ključne riječi: *molekularne metode, genetska različitost, biodiverzitet, ribe*

UVOD

Hrvatska je u svjetskim ihtiološkim krugovima poznata po postojanju brojnih endemskih vrsta i podvrsta riba (Economidis i Banarescu, 1991). Tomu je ponajprije razlog specifičnost hrvatskih otvorenih voda, kojima pripada velik broj kratkih i izoliranih rijeka jadranskog slijeva. Procesom specifikacije u njima su se razvile endemske riblje vrste i podvrste (ponajprije iz porodice pastrva, *Salmonidae* te šaranki, *Cyprinidae*, ali i druge). Za razliku od tropskog pojasa, danas je u Europi rijetkost naći neku do sada nepoznatu vrstu kralježnjaka. No, u Hrvatskoj je npr. još prije nekoliko godina otkrivena nova vrsta glavoča — *Knipowitichia mrakovcici* (Mrakovčić i Kerovec, 1997).

* Tea Odak, dipl. ing., prof. dr. sc. Tomislav Treer, doc. dr. sc. Ivica Aničić, doc dr. sc. Roman Safner, Marina Piria, dipl. ing., Agronomski fakultet, Zavod za ribarstvo, pčelarstvo i spec. zoologiju, Svetošimunska 25, 10000 Zagreb, Hrvatska, tel. 01/2393 860, e-mail: odak@agr.hr
Rad je izložen na Prvom hrvatskom kongresu za molekularne bioznanosti, Opatija 9–13. lipnja 2002.

Po nekim teorijama, ti su endemi ostatci populacija, izvedenih iz primarnih paratetskih riba, koje su prodrle u jadransko područje prije pet milijuna godina, kada je cijelo Sredozemno more bilo djelomično punjeno slatkom vodom iz Paratetisa. Nakon invazije slane vode kroz Gibraltarski kanal, ribe su u Jadranskom moru nestale, a samo one koje su živjele u perijadranskim prastarim rijekama su preživjele. Te su ribe poslije bivale ugrožene s nekoliko ledenih doba. Upravo njihova dugotrajna izoliranost uzrokovala je formiranje nekoliko različitih homogenih populacija (Snoj, 2001). Tako je glavatica (*Salmo marmoratus*) jedan od tih endema, čija su prirodna staništa rijeke od Italije do Albanije. Morfološki se glavatica jasno razlikuje od potočne pastrve, *Salmo trutta* (Delling i sur., 2000), no te dvije vrste uspješno se međusobno razmnožavaju, stvarajući hibride, koji ponovno imaju sposobnost razmnožavanja i s glavaticom i s potočnom pastrvom. Stoga ih je sada teško međusobno razlikovati. Danas hibridi prevladavaju, a čista glavatica nađena je u višim područjima rijeke Soče (Crivelli i sur., 2000).

Mekousna pastrva, *Salmothymus obtusirostris* endemična je vrsta jadranskog slijeva, s nekoliko podvrsta od kojih u hrvatskim rijekama nalazimo dvije: *Salmothymus obtusirostris krkensis*, zlousta, u rijeci Krki i *Salmothymus obtusirostris salonitana*, mekousna pastrva u rijekama Jadru i Žrnovnici (Vuković i Ivanović, 1971). Budući da je riječ o relativno malim i osjetljivim populacijama, promjene u njihovu staništu (uređivanje divljih obala, ekološki incidenti, te krivolov) dovode do još izraženijega smanjenja populacija. Te su populacije slabo istražene i njihovo pravo stanje tek je potrebno utvrditi.

Takoder tek predstoji utvrđivanje pravoga broja vrsta roda vijuni (porodica *Cobitidae*). Rod *Cobitis* široko je rasprostranjen u našim vodama, zastupan trima vrstama s 12 različitih formi, no nedovoljno proučenih (Sofradžija i Berberović, 1978). Schneider i suradnici (2000) promatrali su četiri populacije vijuna iz jadranskog i crnomorskog slijeva. Na osnovi morfoloških razlika uočavaju da populacije *C. narentana* iz rijeke Neretve i *C. dalmatina* iz rijeke Cetine ne bi trebale biti smatrane podvrstama, već vrstama. Takoder postojanje dviju točaka na kaudalnoj peraji *Cobitisa* iz rijeke Zrmanje upućuje na to da je ta populacija zapravo *C. taenia bilienata* Canestrini, 1865 iz sjeverne Italije. Za ovakve je slučajeve nužno daljnje proučavanje na osnovi genetskih i biokemijskih metoda. Upotreba novih genetskih tehnika, koje uključuju molekularne metode, dovodi do revizije mnogih dosadašnjih spoznaja (Vasileva, 2000).

UZROCI SMANJENJA BIODIVERZITETA RIBA

Organizirane introdukcije alohtonih vrsta u otvorene vode započele su u 19. st. radi bolje ribarske iskorištenosti pojedinih akvatorija. No, uspjeh se pokazao samo u rijetkim slučajevima kada su one zauzele neiskorištene ekološke niše. Mnogo su češće unesene vrste, ako su opstale u nekoj vodi, djelovale negativno,

pa čak i katastrofalno na autohtone populacije, bilo kompeticijom, bilo predacijom. Negativni utjecaj intenzivnog poribljavanja jasno se mogao uočiti u smanjenju biodiverziteta u vodama. Uspješan razvoj induciranog mriješta nekoliko ribljih vrsta omogućio je nasadivanje ograničenoga broja genotipova u velik broj otvorenih voda. Unošenje riba s ribogojilišta dugo je bilo opravdavano kao pokušaj rehabilitacije vrsta kojima je prijetilo istrebljenje ili je uništen njihov okoliš onečišćenjem ili gradnjom brana. Osim ekoloških promjena, ta unošenja dovela su do pada genetske varijabilnosti tih vrsta zbog eliminacije lokalnih populacija ili zbog mogućega križanja s unesenim vrstama (Treer i sur., 2001). U Češkoj se dogodilo da u otvorenim vodama koje pripadaju različitim sljevovima triju različitih mora, postoji samo jedna homogenizirana populacija domaće pastrve (*Salmo trutta*), (Šlechta i sur., 1996). Izbjegavanje ovoga problema u kopnenim vodama morat će se rješavati sve proširenijim mriještom autohtonih populacija riba u svrhu poribljavanja.

Svijest o mogućem negativnom genetskom učinku na divlje populacije rezultirala je brojnim studijama koje su pokušale ocijeniti genetsko stanje u tim vodama. Zaštita slatkovodnih riba važno je svjetsko pitanje, jer je trećina znanih ribljih vrsta nestala ili je ozbiljno ugrožena. Posebice je upitna budućnost malih ribljih populacija, jer ribe su upravo primjer neobično velikoga stupnja populacijske različitosti na malom geografskom području (Crivelli i sur., 2000).

KLASIČNE METODE RAZLIKOVANJA RIBLJIH POPULACIJA

Jedan od važnijih zadataka u zaštiti slatkovodnih riba jest determinacija genetske različitosti između autohtonih i unesenih vrsta, te njihovih hibrida. Među ostalim, u Francuskoj i Sloveniji vođeni su opsežni projekti pokušaja revitalizacije autohtonih populacija, čiji se obujam sve više smanjivao nakon unošenja ribogojilišnih riba. Cilj je bio uočiti genetski čiste populacije autohtonih vrsta, te ih po mogućnosti izmriještiti umjetno i vratiti u vode. Prvi korak u takvim slučajevima jest pronalaženje čiste autohtone populacije s pomoću vanjskih oznaka.

Za razlikovanje ribljih populacija primjenjuju se klasične morfološke (morfometrijske i merističke) metode, kao i suvremene molekularne metode. Morfološke su metode danas još dosta u primjeni, ponajprije zbog pristupačnosti i često ekonomskog značenja. Za prikazivanje morfoloških razlika između genetski bliskih populacija ili taksona riba bolje rezultate daje metoda vezane mreže (*truss network*), kojom se mjere elementi oblika, bazirani na linearnim mjerenjima između homolognih ključnih anatomskih točaka (Delling i sur., 2000).

Budući da su vanjske oznake vrlo podložne utjecaju sredine, za detaljnu se analizu primjenjuju molekularne metode. Molekularne se metode zasnivaju na upotrebi genetskih markera.

MOLEKULARNE METODE RAZLIKOVANJA RIBLJIH POPULACIJA

Sedamdesetih godina u molekularnoj populacijskoj genetici riba glavni su alat bili enzimi, a budući da su vrlo korisni pri istraživanju genetske različitosti, svoje mjesto imaju i danas. Vrlo su uvjerljivi i relativno se lako primjenjuju, no treba spomenuti i njihove mane, kada su upotrebljavani kao markeri kod nekih ribljih vrsta. Ponajprije se problem pojavio kada je utvrđeno da je njihova varijabilnost kod nekih vrsta znatno niska, osim toga često se nalaze na vrlo malom kodirajućem dijelu genoma i teško ih je detektirati elektroforezom. Za istraživanje tom metodom potreban je veći uzorak tkiva, koji, ako se duže čuva, degradira (Carvalho i Hauser, 1994). U ranijim studijama enzimski su lokusi najprije rabljeni kao biokemijski markeri ribogojilišnih linija radi otkrivanja i popravljivanja rijetkih alela (Utter i Seeb, 1990), a tek poslije i kao dijagnostika za razlikovanje domaćih od divljih populacija. Osim toga, enzimski je polimorfizam bio učinkovito rabljen kao genetski marker da karakterizira strukturu populacije različitih ribljih vrsta. No pojavila se potreba za više polimorfnim markerima pri detektiranju inbridinga u populacijama, u studijama uspjeha križanja divljih populacija.

Molekulu DNA nalazimo u jezgri i u mitohondijima. Kod riba se veličina nuklearnog genoma kreće od 0,3 do 4 bilijuna parova baza (Ohno, 1974), mitohondrijalnog genoma od 16 000 do 18 000 parova baza (Park i Morgan, 1994).

Polimorfizam na DNA razini nastaje kao rezultat točkastih mutacija i pogrešaka prigodom replikacije. Istaživanje tih varijacija postalo je moguće zahvaljujući razvoju tehnika DNA analize, ponajprije otkrićem restrikcijskih enzima, koji režu molekulu DNA na fragmente, te razvojem lančane reakcije polimeraze (PCR), koja omogućuje amplifikaciju fragmenta DNA od minimalnog uzorka tkiva.

Područje nuklearne DNA molekule koje je od posebnog interesa jesu minisateliti i mikrosateliti. Genom riba veoma je bogat tim sekvencama, tako da kod potočne pastrve u genomu nalazimo od oko 33 000 do 109 000 mikrosatelita (Estoup i sur., 1993). Vrlo su pogodni za istraživanja jer se, osim iz krvi i tkiva riba, uspješno mogu izolirati i iz suhih ljuski (Miller i Kapuscinski, 1996), te iz otolita (Hutchinson i sur., 1999). Nalaze se na nekodirajućem dijelu DNA i rastu neprestano. Mikrosateliti se sastoje od jednostavnih opetovanih sljedova nukleotida, veličine od 2 do 6 parova baza. U procesu replikacije DNA molekule veoma su česte pogreške koje dovode do produženja ili skraćivanja sekvence mikrosatelita. Ta se pojava lijepo može uočiti u gelu pri elektroforezi, nakon što količinu DNA metodom PCR povećamo toliko da bude vidljiva. Uspoređivanjem mikrosatelita različitih populacija i jedinki može se zaključiti na kojem se stupnju razlikuju, a njihov visok stupanj polimorfnosti daje veću informativnost od one kod enzima. Upravo ih zbog toga Aliah i suradnici (2000) upotrebljavaju pri istraživanju bliskih linija, kod

populacija koje su ugrožene »uskim grlom (*bottlenecks*)« kao rezultatom križanja.

Spontana mutacija za minisatelitske i mikrosatelitske lokuse jest 10^{-2} do 10^{-4} po generaciji, što je znatno više od promjena na enzimima od 10^{-6} po generaciji (Nei, 1987). Minisateliti i mikrosateliti obično označuju mendeljevske kodominantno nasljeđivanje i ono što bitno pridonosi njihovoj popularnosti jest da su mikrosatelitski lokusi bliskih vrsta gotovo jednaki, pa je stoga moguće upotrebljavati iste *primere* i procedure.

I minisateliti i mikrosateliti uspješno se upotrebljavaju u analizi populacija riba. Zahvaljujući njihovu visokom stupnju polimorfizma ovi su se markeri pokazali korisnima za istraživanja vrsta s malim enzimskim varijacijama kao što je npr. atlantski losos (*Salmo salar*), (Gavin i sur., 1996) i jezerska zlatovčica (*Salvelinus alpinus*), (Brunner i sur., 1998).

Zahvaljujući tim svojstvima ti su markeri vrlo efikasni u istraživanju srodnih linija u uvjetima akvakulture, te kod vrlo bliskih, nedavno odvojenih populacija.

Zbog velikog polimorfizma mnogi minisateliti i mikrosateliti omogućuju uspješnu identifikaciju jedinki i odnosa unutar porodica. To uključuje velik broj mikrosatelita (engl. DNA fingerprinting), koji predstavljaju različite genotipove. Ti markeri omogućuju istraživačima da identificiraju srodstvo i vezu ne samo u prvoj nego i u daljnjim generacijama, a to omogućuje analizu reprodukcijanskog uspjeha i »fitness« pojedine jedinke (Crivelli i sur., 2000).

Mikrosatelitski su lokusi vrlo pogodni za populacijska proučavanja jer se lako otkrivaju s pomoću PCR tehnike i jer se i razlika u alelima od 1 bp može uočiti na visoko rezolucijskim gelovima.

Postotak je zamjene nukleotida u mtDNA 5 do 10 puta veći nego u nuklearnoj DNA (Nei i Tajima, 1981). Ako mužjaci nekih vrsta migriraju tijekom reprodukcije više nego ženke, različitost u populaciji neće se očitovati u enzimima, nego u mtDNA, jer se prenosi samo preko ženke. Važna osobina mtDNA, za razliku od enzima i mikrosatelita, jest da se mtDNA mogu prespojiti jedno s drugima stvarajući mrežu od uzastopnih evolucijskih događaja.

Postupni nestanak različitosti dosta je brži kod enzima, dok se različitost dugo održava u mtDNA i upravo je zato mtDNA odličan marker za istraživanja evolucije nekih populacija.

Signifikantne razlike mtDNA u različitim geografskim područjima i materinsko (klonalno) nasljeđivanje čine mtDNA efikasnim genetskim markerom za različite ribogojilišne populacije i linije. Ti markeri omogućuju razlikovanje populacija, identificiranje podrijetla riba, ispitivanje djelotvornosti uvođenja pojedinih linija u akvakulturu, te su vrlo efikasni za kontrolu djelovanja unesenih linija na domaće, autohtone vrste.

Mnogobrojna nova istaživanja biodiverziteta riba često u sebi uključuju sve ove metode, i klasične i molekularne, te tako povećavaju svoju vjerodostojnost (Li i sur., 1993).

TRENDOVI PROUČAVANJA BIODIVERZITETA U RIBARSTVU

Tradicija poribljavanja otvorenih voda u Francuskoj prisutna je od 19. stoljeća. Posljedica je toga da je gotovo nemoguće pronaći populaciju bez utjecaja poribljavanja. Različiti tipovi genetskih markera razvijeni su za proučavanje utjecaja domestikiranih i divljih riba. Autohtone »onečišćene« riblje populacije uglavnom su se nalazile u višim, teže dostupnim tokovima rijeka, koje su izbjegle poribljavanje. Takve sada već registrirane moguće autohtone populacije uspoređivane su s potočnom pastrvom iz donjih tokova.

Potočna pastrva (*Salmo trutta*) u Francuskoj postoji u dvjema formama: mediteranskoj i atlantskoj, ovisno o tome u kojem slijevu obitavaju. Genetska udaljenost tih formi izmjerena s enzimima je 0,1, dok je s pomoću mtDNA utvrđeno 1,5% (Bernatchez i sur., 1992). Poteaux i suradnici (1999) s pomoću enzima i mtDNA utvrdili su da postoji razlika u reprodukcijском uspjehu između područja gdje su uneseni domaći genotipovi i divljih tipova gdje je izbjegnuto poribljavanje. Tako je u tokovima gdje je provedeno intenzivno poribljavanje utvrđen velik pad divljih vrsta (Poteaux i sur., 1998).

Na području jugozapadne Francuske četiri vrste pastrva »bore« se za prevlast; to su: sjevernoatlantska, južnoatlantska, mediteranska i domaća pastrva. Razumijevanje toga izuzetnog primjera unutarvršnih odnosa izazov je koji zahtijeva posebne markere i statističke metode. Prvi marker koji se rabio jesu enzimi. Veliko područje s mnogo nejasnoća je analizirano, a rezultati su dali dobru sliku preklapanja teritorija. Na temelju detaljnih istraživanja doneseni su zaključci, kojima je poribljavanje obustavljeno, osim u nekoliko rijeka. Zbog razmjene riba varijabilnost unutar ribogojilišta vrlo je mala, pa je prirodna različitost znatno veća nego kod domaćih linija.

Šaran (*Cyprinus carpio*) vjerojatno je najproučavanija riba svijeta. Ponajprije zbog duge povijesti u njejoj domestikaciji i zbog veoma široke rasprostranjenosti postoji velik broj različitih populacija. U više od stoljeća staroj slatkovodnoj akvakulturi učinjeno je mnogo na selekciji riba za zadovoljenje uzgojnih potreba (Habeković i Turk, 1981). Rezultiralo je to npr. svjetski poznatim linijama šarana s ribnjačarstava Našice i Poljana, kao i angažmanom na drugim ribnjacima na formiranju vlastitih matičnih stokova ribe.

Usavršavanje tehnika induciranog mrijesta riba, uz sve prednosti, dovelo je do miješanja genotipova, te se posljednjih desetljeća uočava nagli gubitak genetske raznolikosti, i na otvorenim vodama, i u uzgoju (Teer i sur., 1995). Stoga je briga o očuvanju biološke raznolikosti u ribarstvu Hrvatske nužnost.

Mnogi su markeri primjenjivani pri genetskom razlikovanju populacija, ponajprije morfološki. Treer i sur. (2000) morfološki prate populacije šarana s četiri slatkovodna ribnjačarstva, te na osnovi mjerenja utvrđuju da još postoje dobro definirane linije u Hrvatskoj, ali da je ipak potrebna detaljnija provjera s pomoću molekularnih markera. Osim morfoloških markera, dosta su se rabili imunogenetski i biokemijski markeri, no njihovo mjesto sve više zauzimaju mikrosateliti zbog znatno većeg polimorfizma (Crooijmans i sur., 1997).

S pomoću DNA markera moguće je bolje vidjeti postojeće stanje na ribnjaku, odnosno postoji li opasnost od inbridinga, kao i genetsku varijabilnost populacija. Također je moguće utvrditi udaljenost među populacijama.

Na šaranima u ribnjacima analiza razlike populacija dobro se može utvrditi s pomoću mikrosatelita (Lehoczy i sur., 2000). Uporabom mikrosatelitskih markera zajedno s enzimima u Danskoj utvrđena je udaljenost ribnjačarskih šarana od šarana u divljim vodama (Tancik i sur., 2000). Sličan tip istraživanja raden je u Njemačkoj gdje se tražila udaljenost između domaćih i stranih linija šarana, no kao markeri rabili su se enzimi (Kohlmann i Kersten, 1999).

Problem »onečišćenja« morske ribe pojavio se razvojem marikulture u Jadranskom moru. Naime, velike količine mlada, ponajprije lubina (*Dicentrarchus labrax*) nabavljaju se iz inozemstva (uglavnom iz Italije i Francuske), čiji znatan dio bjegovima dopijeva u otvoreno more i dobiva mogućnost križanja s domaćim populacijama (Treer i sur., 2001). Različite selekcije uključuju diferencijaciju jednog ili više lokusa, što vodi do djelomične redukcije protoka gena. To se najčešće događa u slučajevima kad je morska ličinka prenesena u drugi okoliš.

Lubin je odličan biološki model za proučavanje odnosa između genetske strukture i selekcije. To je široko rasprostranjena eurihalna i euritermna riba koja uspješno kolonizira obalne lagune, kao i otvorena mora (Treer i sur., 1995a). Nekoliko je studija pokušalo definirati genetski odnos između populacija lubina. U tim studijama korišteni su različiti molekularni markeri, te su zato komplementarne. Lemaire i suradnici (2000) usporedili su podatke dobivene s pomoću mikrosatelita i enzima u lubina iz različitih područja Sredozemlja, te su utvrdili da se najkompletnija slika dobiva uporabom obaju tipova markera.

Genetski se markeri vrlo često upotrebljavaju pri genetskom praćenju brojnih drugih ribljih vrsta. Tako se pri istraživanju genetske različitosti populacija podusta (*Chondrostoma nasus*), (Luskova i sur., 1997) i mreke (*Barbus barbus*), (Šlechtova i sur., 1998), koristi enzimskim polimorfizmom.

Genetski se markeri vrlo učinkovito rabe za istraživanja ne samo riba nego i ostalih akvatičnih organizama. Tako su Bierne i suradnici (2000) rabili mikrosatelite pri razlikovanju dviju populacija kozica (*Penaeus stylirostris*) koje

se uspješno uzgajaju dugi niz godina, pri čemu su bili izdvojeni od drugih populacija. Iako je bila riječ o malom uzorku u vrlo bliskom odnosu, mikrosateliti su se pokazali dovoljno informativnima za istraživanje. Pri tome je molekula DNA izolirana iz hemolimfe. Zaključili su o postojanju inbridinške depresije u kozica (Bierne i sur., 2000).

Pacifičke kamenice (*Crassostrea gigas*) unesene su u Tasmaniju prije pedesetak godina, te su se pojavili strahovi da su izgubile svoju genetsku varijabilnost kroz postupno prilagođavanje. Rabeći 17 enzimskih lokusa, promatrane su tri udomaćene populacije u Australiji i uspoređene s endemskom japanskom populacijom. Sve su populacije pokazale visok stupanj genetskog varijabiliteta (English i sur., 2000).

Enzimi su se rabili uz morfološka mjerenja i pri razlikovanju kamenica roda *Saccostrea* u Tajlandu. Četiri od osam enzima bila su vrlo efektivna u razlikovanju između triju vrsta kamenica. Obje metode primjenjene zajedno pokazale su se vrlo dobre za uzgajivače pri utvrđivanju identiteta uzgojnog materijala (Day i sur., 2000).

DNA tehnologija progresivno raste. Iako DNA analize mogu biti dugotrajne, zamorne i skupe, količina genetske različitosti uočena na taj način mnogo je veća nego istraživanjem s pomoću enzima. Trenutačno, glavni metodološki trend u ovom polju jest razvoj što bržeg i lakšeg dobivanja podataka, što se napose odnosi na automatizaciju. Kompjutorske baze nuklearnih sekvenci mnogih gena, DNA markera, primera i ostalih sličnih informacija su napravljene i dostupne su istraživačima. Razvijene su i specijalne metode statističke analize i sličnih kompjutorskih programa. Svi ti uvjeti omogućuju široku primjenu analiza DNA polimorfizama različitih ribljih populacija.

Summary

THE USE OF MOLECULAR METHODS IN FISHERIES

T. Odak, T. Treer, I. Aničić, R. Safner, M. Piria

The existence of high diversity between fish populations and species, among which some are not completely defined (for instance species of genus *Cobitis*), as well as negative human influence through overexploitation, non adequate fish stockings and changes of natural habitats, both ensured the fact that fish

* Tea Odak, dipl. ing., prof. dr. sc. Tomislav Treer, doc. dr. sc. Ivica Aničić, doc dr. sc. Roman Safner, Marina Piria, dipl. ing., Faculty of Agriculture, Department for fisheries, beekeeping and special zoology, Svetošimunska 25, 10000 Zagreb, Hrvatska, tel. 01/2393 860, e-mail: odak@agr.hr

entered into the focus of many molecular biological investigations. In this paper has been given the review of the most used techniques in the differentiation of fish populations, including their advantages and weaknesses. The problem of the reduction of genetic diversity in freshwater (for instance common carp, *Cyprinus carpio*) and marine (for instance seabass, *Dicentrarchus labrax*) aquaculture is also discussed.

Key words: *molecular methods, genetic diversity, biodiversity, fish*

LITERATURA

- Aliah, R. S., Sato, S., Taniguchi, N. (2000): An Evaluation of Genetic Variability in Nishikigoi, *Cyprinus carpio*, Stocks from Niigata Prefecture, Based on Microsatellite DNA Markers. *Suisanzishoku*, 48, (1), 25–31.
- Bernatchez, L., Guyomard, R., Bonhomme, F. (1992): DNA sequence variation of the mitochondrial control region among geographically and morphologically remote European brown trout *Salmo trutta* populations. *Molecular Ecology*, 1, 161–173.
- Bierne, N., Beuzart, I., Vonau, V., Bonhomme, F., Bedier, E. (2000): Microsatellite-associated heterosis in hatchery — propagated stocks of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture*, 184, 203–219.
- Brunner, P. C., Douglas, M. R., Bernatchez, L. (1998): Microsatellite and mitochondrial DNA assessment of population structure and stocking effects in Arctic charr *Salvelinus alpinus* (Teleostei, Salmomidae) from Central Alpine lakes. *Molecular Ecology*, 7, 209–223.
- Carvalho, G. R., Hauser, L. (1994): Molecular genetic and the stock concept in fisheries. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 4, 351–373.
- 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. *Cybium*, 24, (3), 211–230.
- Crooijmans, R. P. M. A., Bierbooms, V. A. F., Komen, J., Van der Poel, J. J., Groenen, M. A. M. (1997): Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Animal Genetics*, 28, 129–134.
- Day, A. J., Hawkins, A. J. S., Visootviseth, P. (2000): The use of allozymes and shell morphology to distinguish among sympatric species of the rock oyster *Saccostrea* in Thailand. *Aquaculture*, 187, 51–72.
- Delling, B., Crivelli, A. J., Rubin, J-F., Berrebi, P. (2000): Morphological variation in hybrids between *Salmo marmoratus* and alien *Salmo* species in the Volaria stream, Soca River Basin, Slovenia. *Journal of Fish Biology*, 57, 1199–1212.
- Economidis, P. S., Banarescu, P. M. (1991): The Distribution and Origin of Freshwater Fishes on the Balka Peninsula, Especially in Greece. *Int. Revue. Ges. Hydrobiol.*, 76, 257–283.

- English, L. J., Maguire, G. B., Ward, R. D. (2000): Genetic variation of wild and hatchery populations of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Australia. *Aquaculture*, 187, 283–298.
- Estoup, A., Presa, P., Krieg, F., Vaiman, D., Guyomard, R. (1993): (CT)_n and (GT)_n microsatellites: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). *Heredity*, 71, 488–496.
- Gavin, P., Taggart, J., Ferguson, A., O'Farrell, M., Cross, T. (1996): Population genetics of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in the River Shannon system in Ireland. *Canadian Journal of Fisheries Sciences*, 53, 1933–1942.
- Habeković, D., Turk, M. (1981): Neki podaci selekcije šarana u SRH. *Rib. Jug.*, 36, 99–101.
- Hutchinson, W. F., Carvalho, G. R., Rogers, F. I. (1999): A non-destructive technique for the recovery of DNA from dried fish otoliths for subsequent molecular genetic analysis. *Molecular Ecology*, 8, 893–894.
- Kohlmann, K., Kersten, P. (1999): Genetic variability of German and foreign common carp (*Cyprinus carpio* L.) populations. *Aquaculture*, 173, 435–445.
- Lehoczky, I., Hanslík, S., Magyary, I., Schlotterer, C., Weiss, S., Csaba, H. (2000): DNA analysis of Hungarian common carp strains. XXIV. Halaszati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, 82–85.
- Lemaire, C., Allegrucci, G., Naciri, M., Bahri-Sfar, L., Kara, H., Bonhomme, F. (2000): Do discrepancies between microsatellite and allozyme variation reveal differential selection between sea and lagoon in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*)? *Molecular Ecology*, 9, 457–467.
- Li, S., Cai, W., Zhou, B. (1993): Variation in morphology and biochemical genetic markers among populations of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *Aquaculture*, 111, 117–127.
- Luskova, V., Šlechtová, V., Povž, M., Šlechtá, V., Lusk, S. (1997): Genetic variability of *Chondrostoma nasus* populations in rivers of the Black sea and the Baltic sea drainage systems. *Folia Zoologica*, 46, 27–36.
- Miller, L. M., Kapuscinski, A. R. (1996): Microsatellite DNA Markers Reveal New Levels of Genetic Variation in Northern Pike. *Transactions of the American Fisheries Society*, 125, 971–977.
- Mražković, M., Kerovec, M. (1997): Slatkovodne ribe i kružnoust Hrvatske. *Sportski ribolov*, 2, 14–16.
- Nei, M. (1987): *Molecular Evolutionary Genetic*. Columbia University Press, New York.
- Nei, M., Tajima, F. (1981): DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics*, 105, 207–217.
- Ohno, S. (1974): *Chordata 1: Protochordata, Cyclostomata, and Pisces*. *Animal Cytogenetics*, 4, 1–92. Gebrüder — Borntraeger, Berlin.
- Park, L. K., Morgan, P. (1994): Developments in molecular genetic techniques in fisheries. *Review of Fish Biology and Fisheries*, 4, 272–279.
- Poteaux, C., Bonhomme, F., Berrebi, P. (1998): Differences between nuclear and mitochondrial introgressions of brown trout populations from a restocked main river and its unstocked tributary. *Biological Journal of the Linnean Society*, 63, 379–392.
- Poteaux, C., Bonhomme, F., Berrebi, P. (1999): Microsatellite polymorphism and genetic impact of restocking in Mediterranean brown trout (*Salmo trutta* L.). *Heredity*, 82, 645–653.

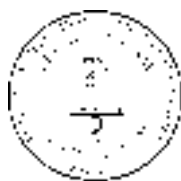
- Schneider, D., Mrakovčić, M., Mustafić, P. Kerovec, M. (2000): Morfological differences in some *Cobitis* populations from Croatia. *Folia Zoologica*, 49, 227–234.
- Snoj, A. (2001): Preservation biology: a case of preserving Marble trout. Winer School in Molecular Genetics, Lecture notes, 2000.
- Sofradžija, A., Berberović, Lj. (1978): Diploidno–triploidni seksualni dimorfizam u vijuna (*Cobitis taenia taenia* L., *Cobitidae*, *Pisces*). *Genetika*, 10, (3), 389–397.
- Šlechtova, V., Luskova, V., Šlechtova, V., Lusk, S. (1996): Intraspecies diversity of fishes and possibilities of their protection. *Biodiverzita Ichthyofauni CR*, 1, 26–33.
- Šlechtova, V., Šlehta, V., Luskova, V., Lusk, S., Berrebi, P. (1998): Genetic variability of common barbel, *Barbus barbus* populations in the Czech Republic. *Folia Zoologica*, 47, 21–33.
- Tanck, M. W., Baars, H. C. A., Kohlmann, K., Van der Poel, J. J., Komen, J. (2000): Genetic characterization of wild Dutch common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture Research*, 31, 779–783.
- Treer, T., Aničić, I., Safner, R. (1995): The growth and condition of common carps (*Cyprinus carpio*) introduced into Croatian Vransko lake. *Ribarstvo*, 53, 63–73.
- Treer, T., Odak, T., Safner, R., Aničić, I., Piria, M., Kolak, A. (2001): Biodiversity in Croatian Freshwater Fisheries. Biodiversity in livestock production in Croatia. Zbornik radova, *Biološka raznolikost u stočarstvu Republike Hrvatske*, 131–139.
- Treer, T., Safner, R., Aničić, I., Kolak, A., Dražić M. (2000): Morfological variation among four strains of common carp *Cyprinus carpio* in Croatia. *Folia Zoologica*, 49, (1), 69–74.
- Treer, T., Safner, R., Aničić, I., Lourinov, M. (1995a): *Ribarstvo* (Ur.: D. Habeković), Nakladni zavod Globus, Zagreb.
- Utter, F. M., Seeb, J. E. (1990): Genetic marking of fishes: overview focusing on protein variation. *American Fisheries Society Symposium*, 7, 426–438.
- Vasileva, E. D. (2000): Sibling species in the genus *Cobitis* (*Cobitidae*, *Pisces*). *Folia Zoologica*, 49, 23–30.
- Vuković, T., Ivanović, B. (1971): *Slatkovodne ribe Jugoslavije* (Ur.: Ž. Bjelčić), Zemaljski muzej BiH. Sarajevo.

Primljeno: 19. 7. 2002.
Prihvaćeno: 20. 9. 2002.

Obavijesti

**AKADEMIJA MEDICINSKIH ZNANOSTI
HRVATSKE**

KOLEGIJ VETERINARSKE MEDICINE



u suradnji s

Veterinarskim fakultetom, Hrvatskim veterinarskim institutom,
Institutom Ruder Bošković, Hrvatskom veterinarskom komorom i
Hrvatskim veterinarskim društvom 1893.

organizira

Znanstveno–stručni skup

**BOLESTI ORGANIZAMA IZ VODA I LJUDSKO
ZDRAVLJE**

Pod pokroviteljstvom Ministarstva poljoprivrede i šumarstva,
Ministarstva znanosti i tehnologije i Ministarstva zdravstva

Skup će se održati u **petak 8. studenoga 2002.** godine u **velikoj dvorani Veterinarskog fakulteta** Sveučilišta u Zagrebu, Heinzelova 55 s početkom u **9 sati**. Kotizacija se ne naplaćuje. Sudjelovanje na skupu bit će bodovano prema Statutu Hrvatske veterinarske komore.

Skup su financijski potpomogli Veterinarska stanica grada Zagreba i grad Zagreb, Gradski ured za poljoprivredu i šumarstvo

Organizacijski odbor