

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

На VI редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду-Биолошког факултета, одржаној 11.04.2023. године, на основу молбе ментора, др Ане Марић, доцента Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације Тамаре А. Кањух, студента докторских студија Универзитета у Београду-Биолошког факултета, под насловом: „**Генетичка структура популација поточне пастрмке (*Salmo trutta* L., 1758) у дунавском сливу Хрватске**“ *енг.* „**Genetic diveristy of brown trout (*Salmo trutta* L., 1758) of the Danube basin on the territory of Croatia**“ у следећем саставу: др Предраг Симоновић, редовни професор Универзитета у Београду-Биолошког факултета, др Вера Николић, редовни професор Универзитета у Београду-Биолошког факултета и др Марија Смедеревац-Лалић, виши научни сарадник Института за мултидисциплинарна истраживања Универзитет у Београду, др Теа Томљановић, редовни професор, Свеучилиште у Загребу, Агрономски факултет, др Ивана Магуире, редовни професор, Свеучилиште у Загребу, Природословно математички факултет, др Лидија Свечњак, ванредни професор, Свеучилиште у Загребу, Агрономски факултет

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Наставно-научном већу Универзитета у Београду-Биолошког факултета подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација Тамаре А. Кањух под насловом „**Генетичка структура популација поточне пастрмке (*Salmo trutta* L., 1758) у дунавском сливу Хрватске**“ *енг.* „**Genetic diveristy of brown trout (*Salmo trutta* L., 1758) of the Danube basin on the territory of Croatia**“ оригинално је дело чији је циљ утврђивање гентичког диверзитета као и процена аутохтоности популација поточне пастрмке на територији Хрватске које

настањују реке дунавског слива. У дисертацији је коришћен један молекуларни маркер митохондријске ДНК (мтДНК), ген за лактат дехидрогеназу (LDH-C1) и осам микросателитских локуса. Такође, коришћена је и геометријска морфометрија ради поређења различитих хаплогрупа дефинисаних митохондријским хаплотиповима.

Лабораторијски део молекуларних истраживања изведен је у Центру за генотипизацију риболовних ресурса на Биолошком факултету Универзитета у Београду, док је морфолшки део урађен на Агрономском факултету Свеучилишта у Загребу.

Ова докторска дисертација написана је на 84 стране и садржи девет поглавља: Увод (2), Преглед досадашњих истраживања (16), Материјали и методе (7), Резултати (25), Дискусија (7), Закључци (2), Литература (14), Аутобиографија (3) и Прилози (8). Рад садржи 223 литературни цитат, 26 слика и 20 табела. Дисертација садржи и уводне непагиниране стране где се налазе: Подаци о тези и члановима комисије, Сажетак на енглеском, хрватском и српском језику, Подаци о менторима, Захвалница, Списак скраћеница, Списак наслова слика и табела и Садржај.

2. АНАЛИЗА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Увод ове докторске дисертације садржи кратка појашњења у вези са морфологијом, генетиком и таксономијом, као и поделом на филогенетске линије у оквиру врсте. У уводу постоји једно потпоглавље где су дефинисани циљеви рада.

Циљеви рада су:

1. Коришћењем молекуларних маркера (контролни регион мтДНК и једарне ДНК – LDH-C1 и осам микросателитских локуса) описати генетичку структуру популација поточне пастрмке дунавског басена западно-континенталне и источне Хрватске
2. Проценити стање изворне линије поточне пастрмке и одредити да ли је дошло до хибридизације са интродукованом атлантском филогенетском линијом
3. Одредити разлике у облику спољашње морфологије између различитих филогенетских линија и хибрида

У оквиру поглавља **Преглед досадашњих истраживања** приказана су у оквиру три потпоглавља биолошки, систематски, генетички и конзервациони аспекти поточне пастрмке као и опис анализираних подручја. У оквиру потпоглавља „Врста *Salmo trutta*“ постоје три додатна потпоглавља где су описане биолошке и еколошке карактеристике врсте, специфичности репродукције, систематика и филогенија као и конзервациони статус филогенетских линија у оквиру комплекса врста *Salmo cf. trutta*. Поред описа биологије врсте, овде су представљени филогенетски односи у оквиру породице Salmonidae који су нарочито комплексни због изражене фенотипске пластичности која у извесној мери утиче на реконструкцију односа када су филогенетске анализе базиране на морфолошким карактерима. Истакнута је важност молекуларно-генетичких метода приликом анализе филогенетских односа у оквиру ове групе. Посебно је наглашен висок диверзитет врста и филогенетских линија ове породице на Балканском полуострву које је представљало рефугијалну зону током плеистоценских глацијација. Потпоглавље „Генетичке и морфолошке методе у анализи рибљих популација“ говори о апликацији коришћених генетичких маркера (контролни регион мтДНК, једарне ДНК – LDH-C1 и микросателитских локуса) у претходним истраживањима, као и о предности коришћења геометријске морфометрије, нарочито у комбинацији са генетичким маркерима. Потпоглавље „Анализирано подручје“ садржи три додатна потпоглавља где су описане карактеристике области и река у Хрватској на којима је вршено узорковање поточне пастрмке: Горског Котара, Жумберачко-Самоборских планина и планине Папук.

У поглављу **Материјал и методе** у три потпоглавља, наведен је број локалитета (15) и узорака, као и коришћене генетичке и морфолошке анализе. Наглашено је који број узорака је коришћен за генетичке анализе (141) од чега је 90 жртвовано и коришћено за морфометријске анализе. Кандидат је у потпоглављу „Узорковани материјал“ приказала мапу локалитета где је вршено узорковање, а називи локалитета, њихове скраћенице и број узорака приказани су и табеларно. Потпоглавље „Генетичке анализе“ детаљно описују процес изолације ДНК, амплификације коришћених региона ДНК, концентрације реагенаса, описе протокола и реакција као и процес провере амплификоване ДНК на гелу. У овом потпоглављу наведени су и коришћени статистички програми за анализу резултата добијених секвенци. Потпоглавље „Морфометријске анализе“ детаљно описују процес

дигитизације фотографисаних јединки, као и даљу софтверску обраду података методама геометријске морфометрије.

У поглављу **Резултати** поред текстуалног, дат је и детаљан табеларни и сликовни приказ података добијених током израде ове докторске дисертације и подељен је на четири потпоглавља. Прво потпоглавље описује резултате добијене анализом секвенци контролног региона мтДНК. На 15 локалитета где је вршено узорковање, од 141 узорка 110 припада дунавској хаплогурпи, док је 31 јединка имала атлантски хаплотип. У оквиру дунавске хаплогрупе 73 јединке су биле носиоци хаплотипа Da1, 24 носиоци Da2 и 13 носиоци Da22. У оквиру хаплотипа Da1 постоји више подтипова од којих је у анализираној области нађено три (Da1a, Da1f, Da1g) од којих су последња два новоописана и приватна. Највећу заступљеност у односу на све присутне хаплогрупе има хаплотип Da1a од 46%. Позиционирање и однос нових хаплотипа са раније описаним извршено је поређењем са секвенцама из банке гена методом максималне веродостојности (*Maximum Likelihood*) и *Neighbor-Joining* (NJ) методом. Анализом молекуларне варијансе (AMOVA) утврђено је да је далеко већи проценат варијабилности последица разлика у оквиру популација (83.36%), док је далеко мања варијабилност између популација (16,64%). Груписањем анализираних локалитета у четири одвојена речна слива (Сава, Драва, Личка Јесеница и Купа) на основу Fst вредности између популација утврђене су значајне разлике $p < 0.05$ између сливова. Друго потпоглавље представља резултате добијене рестрикцијом анализом LDH-C1 локуса. Од анализираних 141 јединке, 76 су носиле алел који није у кореспонденцији са одговарајућим мтДНК хаплотипом (присутни хомозиготи LDH-C*90 код дунавских линија и LDH-C*100 код атлантских), док је код 65 јединки утврђено преклапање што указује на хибридизацију између хаплогрупа. У трећем потпоглављу наводе се резултати добијени анализом микросателитских локуса где је утврђено да су популације у Hardy-Weinberg равнотежи. Највећа очекивана и уочена хетерозиготност као и највећи број алела присутни су у реци Јасенак. Израчунате су F_{ST} вредности између популација као и проток гена. Груписање популација извршено је CLUSTER анализом методом UPGMA (eng. *Unweighted pair-group average*), коришћењем матрице различитости методом Nei и DAS генетичких дистанци, као и помоћу кореспондентне факторске анализе где је уочено издвајање популације из реке Слапнице. Анализом резултата фрагмент анализе микросателитских локуса у програму STRUCTURE

уочена је подела на две популације која је највише корелисала са дунавским и атлантским хаплотиповима мтДНК, а не са одговарајућим рекама и сливовима где је извршено узорковање. Резултати анализа у програму BOTTLENECK нису показали постојање генетичког дрифта већ је напротив у неким рекама утврђен дефицит хетерозиготности што указује на експанзију популација. У четвртом потпоглављу кандидат описује резултате морфометријских анализа. На основу статистичких анализа утврђена је значајна разлика у морфологији између различитих митохондријских хаплогрупа (АТ и DА, односно АТ и хибрида), док значајних разлика у морфологији између DА хаплогрупе и хибрида није било.

У поглављу **Дискусија** кандидат детаљно тумачи добијене резултате и пореди са доступним литературним подацима. Истиче важност генетичког диверзитета популација поточне пастрмке на локалном нивоу и значајних интерпопулационих разлика. Губитак и поремећаји генефонда на популационом нивоу могу у великој мери утицати на варијабилност читаве врсте и зато је конзервација и очување локалних популација битна тема, како на Балкану, тако и широм света. Кандидат дискутује примере и проблем нестручног порибљавања као и проблем уноса алохтоног генетичког материјала у аутохтоне популације поточних пастрмки нарочито на подручју Западног Балкана. Затим, дискутује о статусу аутохтоности појединих митохондријских хаплотипова присутних у аутохтоним популацијама. Тако се, на пример, хаплотип Da1 сматра аутохтоним за читав дунавски басен Западног Балкана и у анализираном подручју је очекивано најдоминантнији. Овај хаплотип у појединим токовима (Бресни поток, Орљава и Брзаја) није пронађен или је присутан заједно са другим хаплотиповима од којих су неки потврђено алохтони. Ове чињенице указују на угроженост нативног фонда присуством алохтоних хаплотипова унесених порибљавањем. Присуство другог најдоминантнијег дунавског хаплотипа, Da2 кандидат описује као алохтони ослањајући се на пређашња истраживања. Ранија истраживања на подручју Хрватске открила су његово присуство у рекама Јадранског слива, где су аутори извели закључак о његовој аутохтоности, али поређењем са осталим радовима и познатим чињеницама овај закључак је највероватније нетачан. Статус трећег дунавског хаплотипа Da22, присутног у анализираним популацијама је нејасан. У Босни и Херцеговини овај хаплотип се третира као аутохтон и с обзиром да постоје реке у Хрватској (Орљава) где је он и једини присутни хаплотип,

лако би могао да се изведе закључак да је и овде аутохтон. Кандидат истиче важност новоописаних подтипова јер доприносе широј слици о генетичком диверзитету поточне пастрмке, али се њихова позиција у односу на остале, као и номенклатура мора детаљније испитати. Присуство јединки које су носиоци атлантског хаплотипа изузетно је изражено и у овом анализираном подручју и сматра се главним разлогом губитка нативног диверзитета популација поточних пастрмки. Тумачењем резултата рестрикционе анализе једарног LDH-C1* гена кандидат закључује да је дошло до хибридизације између интродукованих и аутохтоних јединки и то кроз више генерација. Такође, кандидат наглашава важност генотипизације матичног генофонда приликом порибљавања поједних водотокова.

Анализом резултата микросателитских локуса утврђена је смањена генетичка варијабилност само у реци Орљави, што је највероватније последица малог броја јединки које су све биле хаплотипа Da22, као и издвајање реке Слапнице, што вероватно кореспондира са резултатима мтДНК тј, одсуством атлантског хаплотипа у овој реци. Груписање популација према присутним микросателитским алелима и њиховим учесталостима препознало је само две популације на целој територији дунавског слива Хрватске. Ови резултати такође одговарају резултатима мтДНК и јасно се одвајају јединке које заједно са посебним микросателитским алелима носе и атлантски хаплотип што указује на порибљавање свих анализираних река јединкама сличног генетичког материјала.

Морфометријске анализе кандидаткиња дискутује у складу са одговарајућим филогенетским групама и истиче који су карактери највише допринели одвајању јединки дунавске од јединки атлантске филогенетске линије.

У поглављу **Закључци**, на основу добијених резултата, кандидат је извео следеће закључке:

1. Филогенетске линије поточне пастрмке: атлантска (АТ) и дунавска (DA) дефинисане контролним регионом мтДНК присутне су у рекама Дунавског слива Хрватске. Детектована су 4 хаплотипа: Da1, Da2 и Da22 у оквиру DA линије и At1 у оквиру АТ линије.

2. Откривена су два подтипа хаплотипа Da1: Da1f (Acc. No. MK675073) и Da1g (Acc. No. MK675074) у Парку природе „Папук“ чији филогенетски статус и номенклатуру треба додатно анализирати у будућим истраживањима
3. Хаплотип Da1 сматра се аутохтоним за Дунавски басен Западног Балкана и у оквиру овог подручја присутан је са највећом учесталошћу. Ипак потпуно одсуство овог хаплотипа примећено је у три популације поточне пастрмке што указује на измењен филогеографски статус ових популација.
4. Тренутна номенклатура подтипова Da1b и Da2c је под знаком питања и треба да подлегне провери, с обзиром да припадају различитим хаплотповима (Da1 и Da2, респективно) а резултати филогенетских анализа указују на њихову блискост чему доприноси и положај истих нуклеотида на појединим варијабилним местима.
5. Хаплотип Da22, који је у анализираном подручју присутан само у систему Величанка-Орљава-Брзаја, окарактерисан је као алохтон, највероватније уведен из рибњака. Он је једини присутан хаплотип у Орљави у коју се уливају Величанка и Брзаја. Међутим, овај хаплотип је у ранијим радовима на реци Уни описан као аутохтони, по први пут на Балканском полуострву. Даља истраживања на подручју Хрватске и Балканског полуострва су неопходна како би се утврдио статус овог хаплотипа.
6. Хибридизација између DA и AT хаплогрупа присутна је у свим анализираним водотоцима што је откривено анализом једарног LDH-C1* локуса. Једина искључиво атлантска популација уочена је на рибњаку „Врабац“ где су све јединке биле носиоци хаплотопа At1 и хомозиготи за одговарајући алел LDH-C*90.
7. Генетичка структура популација указује на велику адмиксију између популација без обзира на просторну удаљеност. Ова ситуација указује на дуготрајно и неконтролисано порибљавање алохтоним материјалом највероватније гајених пастрмки атлантске филогенетске линије.
8. Разлике у облику тела између DA и AT филогенетских линија поточне пастрмке увиђају се највише у висини тела, дужини главе и величини ока. Атлантска линија се јасно одваја од дунавске и хибрида.

3. БИБЛИОГРАФИЈА

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Kanjuh, T.**, Marić, A., Piria, M., Špelić, I., Maguire, I. and Simonović, P. (2020). Diversity of brown trout, *Salmo trutta* (Actinopterygii: Salmoniformes: Salmonidae), in the Danube River basin of Croatia revealed by mitochondrial DNA. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 50(3), pp.291-300. DOI: 10.3750/AIEP/02939 M23
<https://doi.org/10.3750/AIEP/02939>
2. Špelić, I., Rezić, A., **Kanjuh, T.**, Marić, A., Maguire, I., Simonović, P., Radočaj, T. and Piria, M., 2021. Application of the geometric morphometrics approach in the discrimination of morphological traits between brown trout lineages in the Danube Basin of Croatia. *Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems*, (422), p.22. M23
<https://doi.org/10.1051/kmae/2021021>

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Kanjuh, T.** Marić, A., Nikolić, V., Maguire, I., Špelić, I., Piria, M., Simonović., P. 2022. Brown trout (*Salmo cf. trutta*) from the Danube Basin in Croatia – genetic structure of populations. Second Southeast European Ichthyological Conference (SEEIC), October 12-15, 2022, Supetar, Island Brač, Croatia.

Провера оригиналности докторске дисертације

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „**Генетичка структура популација поточне пастрмке (*Salmo trutta* L., 1758) у дунавском сливу Хрватске**“

енг. „Genetic diveristy of brown trout (*Salmo trutta* L., 1758) of the Danube basin on the territory of Croatia“, кандидата Тамаре А. Кањух, утврђено подударарење текста износи 24%.

Овај степен подударности претежно је последица претходно публикованих резултата истраживања проистеклих из докторандове дисертације, подударарења са литературом наведеном у тексту, назива подручја и река где је вршено узорковање као и стручних израза које се односе на хаплогрупе, појединачне хаплотипове и гене, прајмере, описе делова методолошких протокола, статистичких анализа и коришћених програма за које су јасно наведене референце, као и препознавања делова реченица за које је очигледно да подударарење није повезано, што је у складу са чланом 9. Правилника. Такође треба имати у виду да је теза због уговора о двојном докторату писана на енглеском језику и да је било преклапања која се односе на изјаве о ауторству на оба језика.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујемо да извештај указује на оригиналност докторске дисертације Тамаре А. Кањух, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

4. МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

Докторска дисертација кандидата Тамаре А. Кањух под насловом: „**Генетичка структура популација поточне пастрмке (*Salmo trutta* L., 1758) у дунавском сливу Хрватске**“, енг. „**Genetic diveristy of brown trout (*Salmo trutta* L., 1758) of the Danube basin on the territory of Croatia**“ представља оригиналан научни рад који се бави мапирањем и генетичком структуром популација поточне пастрмке на подручју Хрватске у циљу очувања аутохтоних фондова. Теза се одликује јасно дефинисаним циљевима и адекватно планираним и успешно реализованим истраживачким поступком.

Остварени резултати објављени су у оквиру два оригинална научна рада, што потврђује актуелност и значајност добијених резултата. Такође, текст дисертације је успешно прошао проверу оригиналности.

На основу увида у експериментални рад, постигнуте резултате као и написану докторску тезу, Комисија закључује да су задаци постављени у циљевима испуњени, тако да позитивно оцењује докторску тезу и има задовољство да предложи Наставно-научном

већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати позитивну оцену докторске дисертације Тамаре А. Кањух и омогући кандидату јавну одбрану рада.

У Београду, 11. априла 2023. године.

КОМИСИЈА:

др Предраг Симоновић
редовни професор
Универзитет у Београду – Биолошки факултет

др Вера Николић
редовни професор
Универзитет у Београду – Биолошки факултет

др Марија Смедеревац-Лалић
виши научни сарадник
Институт за мултидисциплинарне студије Универзитета у Београду

др Ивана Магуире
редовни професор
Свеучилиште у Загребу Природословно-математички факултет

др Лидија Свечњак
ванредни професор
Свеучилиште у Загребу Агрономски факултет

др Теа Томљановић
редовни професор
Свеучилиште у Загребу Агрономски факултет