



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Наташа М. Којадиновић

**Могућност конзервације фрагментисаних
популација риба на примеру поточне мрене
(*Barbus balcanicus* Kotlík, Tsigenopoulos, Ráb &
Berrebi, 2002)**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2020.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF SCIENCE

Nataša M. Kojadinović

**Conservation possibility of fragmented fish
populations on the example of the Danube barbel
(*Barbus balcanicus* Kotlík, Tsigenopoulos, Ráb &
Berrebi, 2002)**

Doctoral dissertation

Kragujevac, 2020.

I Аутор
Име и презиме: Наташа М. Којадиновић
Датум и место рођења: 06. 05. 1987. године, Косовска Митровица
Садашње запослење: Универзитет у Крагујевцу, Природно-математички факултет, Институт за биологију и екологију, звање истраживач-сарадник
II Докторска дисертација
Наслов: Могућност конзервације фрагментисаних популација риба на примеру поточне мрене (<i>Barbus balcanicus</i> Kotlík, Tsigenopoulos, Ráb & Berrebi, 2002)
Број страница: 107
Број слика: 16 табела, 34 слике
Број библиографских података: 218
Установа и место где је рад израђен: Универзитет у Крагујевцу, Природно-математички факултет
Научна област (УДК): 574.5 (497.11) (Хидробиологија. Водене биоценозе и екосистеми. Подручје Србије).
Ментор: Проф. др Владица Симић, Универзитет у Крагујевцу, Природно-математички факултет
III Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 13. 07. 2016. године
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:
Комисија за оцену подобности теме и кандидата:
<ol style="list-style-type: none"> 1. Др Владица Симић, редовни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Екологија, биогеографија и заштита животне средине 2. Др Милица Стојковић-Пиперац, доцент Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу, ужа научна област: Екологија и заштита животне средине 3. Др Ана Петровић, научни сарадник Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Екологија, биогеографија и заштита животне средине 4. Др Јелена Лујић, научни сарадник Департмана за аквакултуру, Факултета пољопривредних наука и заштите животне средине, Универзитета Szent István, Gödöllő, Мађарска, ужа научна област: Пољопривредне науке

Комисија за преглед и одбрану докторске дисертације:

Др Саша Марић, ванредни професор
Биолошког факултета Универзитета у Београду,
ужа научна област: Морфологија, систематика и
филогенија животиња, председник Комисије

др Александра Милошковић, научни
сарадник Института за информационе технологије
Универзитета у Крагујевцу, научна област:
Биологија

др Милица Стојковић-Пиперац, доцент
Природно-математичког факултета, Универзитета
у Нишу, ужа научна област: Екологија и заштита
животне средине

Датум одбране докторске дисертације:

Мом Вукану

Захвалница

Ова дисертација представља резултат дугогодишњег рада и желим да се најискреније захвалим свима који су ми помогли и веровали у мене. Велико хвала,

Мом ментору, *др Владици Симићу*, редовном професору Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, на великом поверењу које ми је указао и помоћи у свим фазама израде докторске дисертације.

Др Саши Марићу, ванредном професору Биолошког факултета Универзитета у Београду, изузетно сам захвална што је прихватио да буде део Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације. Захваљујем се и на великом стрпљењу, свим сугестијама, предлозима и корекцијама које су знатно унапредиле изглед овог рада.

Др Александри Милошковић, научном сараднику Института за информационе технологије Крагујевац Универзитета у Крагујевцу, хвала на безрезервној подршци, разумевању и несебичној помоћи приликом израде ове докторске дисертације.

Др Милицы Стојковић Пиперац, доценту Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу, захваљујем се на лепој сарадњи током реализације овог рада.

Др Снежани Симић, редовном професору Природно-математичког факултета у Крагујевцу, хвала на лепој сарадњи и интересовању за мој рад.

Др Акошу Хорвату (мађ. Ákos Horváth), захваљујем на свим пруженим приликама, подршци и помоћи.

Велику захвалност дугујем колегама *Јелени* и *Зорану*, хвала на великој помоћи и знању које сте поделили са мном.

Мојим драгим колегама, *Марији*, *Маријани*, *Ани*, *Невени*, *Марини*, *Бојану*, *Марку*, *Мирославу*, *Зорану*, *Пеђи* и *Вити* хвала на подршци, лепим тренуцима и дивним успоменама.

Мојим девојкама, *Симони*, *Милени* и *Тијани* хвала на помоћи, без вас би све ово било много теже. Привилегија је имати вас за пријатеље.

Неизмерну захвалност дугујем целој мојој породици, а нарочито *мајци* и *брату* на разумевању, љубави и зато што су веровали у мене све ове године.

Светозаре и *Вукане*, хвала за сву љубав и подршку ♥.

Наташа Којадиновић

Абстракт

Врста *B. balcanicus* је званично описана 2002. године. Насељава потоке и горње токове река, који су често под антропогеним утицајем, пре свега у смислу стварања баријера. Баријере могу да буду предуслов фрагментације станишта која утиче на кључне аспекте екосистема, попут хидролошке повезаности, што је од пресудног значаја за рибе и друге водене организме.

Истраживањем је обухваћено девет популација врсте *B. balcanicus* из пет река које припадају сливу Велике Мораве. Резултати анализе структуре популација указују на одређени степен разлика између истраживаних локалитета. Генетичком карактеризацијом, на основу анализе секвенци *COI* гена мтДНК, потврђено је да популације обухваћене истраживањем припадају врсти *B. balcanicus* и констатован је само један хаплотип - Eх65F1. Анализом геометријске морфометрије потврђено је постојање полног диморфизма у величини и облику, као и морфолошка варијабилност између популација узрокована фрагментацијом станишта. Најниже вредности покретљивости сперматозоида констатоване су у фрагментисаним стаништима, и у популацији из Петровачке реке, која је делимично загађена. У овој докторској дисертацији представљен је први успешан протокол за криопрезервацију сперматозоида поточне мрене. Применом модификованог ESHIPPO-ILSFP-RP модела процењен је умерени ризик од нестајања за популације из Грошничке реке, на локалитетима изнад и испод акумулације, као и за Петровачку реку.

На основу изложених резултата може се закључити да је фрагментација станишта утицала на популације поточне мрене у погледу структуре популација, морфологије и репродуктивног статуса, који је представљен покретљивошћу сперматозоида.

Кључне речи: поточна мрена, фрагментација, конзервација, структура популација; генетичка карактеризација, геометријска морфометрија; криопрезервација, ESHIPPO модел.

Abstract

The species *B. balcanicus* was officially described in 2002. This species inhabits streams and the upper reaches of rivers, which are often altered by anthropogenic activity, primarily by creating barriers. Barriers are a prerequisite for habitat fragmentation that affects key aspects of ecosystems, such as hydrological connectivity, which is crucial for fish and other aquatic organisms.

The research included nine populations of *B. balcanicus* from five rivers belonging to the Velika Morava drainage. The population structure analysis indicated a certain degree of difference between the investigated localities. Based on the mtDNA *COI* gene sequences, genetic characterization confirmed that the populations included in this study belong to the species *B. balcanicus*, with one haplotype detected - Ex65F1. Results of geometric morphometry confirmed the existence of dimorphism in size and shape, and morphological variability between populations, caused by habitat fragmentation. The lowest sperm motility values were detected in fragmented habitats and in population from the Petrovačka River, which is partially polluted. Within this doctoral dissertation, the first successful protocol for cryopreservation of the Danube barbel sperm was presented. Through the modified ESHIPPO-ILSFP-RP model was estimated a moderate risk of extinction for the populations from the Grošnička River, in the localities above and below the reservoir, as well as for the Petrovačka River population.

Based on the presented results, it can be concluded that habitat fragmentation affected the Danube barbel populations in terms of population structure, morphology, and reproductive status, which is represented by sperm motility.

Key words: Danube barbel, fragmentation, conservation, population structure, genetic characterization, geometric morphology, cryopreservation, ESHIPPO model.

Садржај

1. Увод	1
1.1. Фактори угрожавања акватичног биодиверзитета.....	3
1.2. Фрагментација станишта.....	4
1.3. Конзервационе методе у заштити биодиверзитета.....	5
1.4. Објекат истраживања.....	7
1.5. Досадашња истраживања.....	10
2. Циљеви истраживања	13
3. Материјал и методе	15
3.1. Истраживано подручје и његове карактеристике.....	16
3.1.1. Грошничка река.....	17
3.1.2. Борачка река.....	17
3.1.3. Петрвачка река.....	18
3.1.4. Река Осаоница.....	18
3.1.5. Река Јасеница.....	18
3.2. Методологија прикупљања узорака.....	19
3.3. Анализа структуре популација врсте <i>B. balcanicus</i>	20
3.4. Анализа дужинско - тежинског односа и кондиционог фактора врсте <i>B. balcanicus</i>	21
3.5. Генетичке анализе.....	22
3.5.1. Програмска анализа гена мтДНК.....	23
3.6. Методе геогеометријске морфометрије.....	23
3.6.1. Статистичке анализе.....	24
3.7.1. Анализа параметара покретљивости и криопрезервација сперматозоида врсте <i>B. balcanicus</i>	25
3.7.1. Експеримент 1. Различити криопротектанти.....	28
3.7.2. Експеримент 2. Концентрација криопротектаната.....	28
3.7.3. Експеримент 3. Различита брзина хлађења.....	28

3.7.4. Експеримент 4. Суплементација шећерима.....	28
3.7.5. Експеримент 5. Суплементација протеинима.....	29
3.7.6. Идентификација субпопулација сперматозоида.....	29
3.7.7. Статистичке методе.....	29
3.8. Статистичке методе обраде података.....	30
3.9. Процена ризика изумирања и приоритета конзервације истраживаних популација применом модификованог ESHIPPO модела.....	30
4. Резултати.....	38
4.1. Структура популација врсте <i>B. balcanicus</i>	41
4.2. Дужинско - тежински однос и кондициони фактор врсте <i>B. balcanicus</i>	47
4.3. Генетичка карактеризација.....	49
4.4. Геометријска морфометрија.....	52
4.4.1 Утицај фрагментације станишта на морфолошку варијабилност врсте <i>B. balcanicus</i>	57
4.5. Анализа параметара покретљивости и криопрезервација сперматозоида врсте <i>B. balcanicus</i>	59
4.5.1. Експеримент 1. Различити криопротектанти.....	59
4.5.2. Експеримент 2. Концентрација криопротектаната.....	60
4.5.3. Експеримент 3. Различита брзина хлађења.....	61
4.5.4. Експеримент 4. Суплементација шећерима.....	62
4.5.5. Експеримент 5. Суплементација протеинима.....	62
4.5.6. Субпопулациона структура.....	63
4.6. Резултати статистичке обраде података анализом главних компоненти (PCA)..	66
4.7. Процена ризика изумирања и приоритета конзервације истраживаних популација поточне мрене применом модификованог ESHIPPO-ILSFP-RP модела.....	67
5. Дискусија	70
5.1. Структура популација врсте <i>B. balcanicus</i>	71
5.2. Дужинско - тежински однос и кондициони фактор врсте <i>B. balcanicus</i>	73

5.3. Генетичка карактеризација.....	74
5.4. Геометријска морфометрија.....	74
5.5. Анализа параметара покретљивости и криопрезервација сперматозоида врсте <i>B. balcanicus</i>	77
5.6. Процена ризика изумирања и приоритета конзервације истраживаних популација поточне мрене применом модификованог ESHIPPO модела.....	80
6. Закључци	83
7. Литература	87
8. Прилози.....	105

Листа табела

Табела 1. Списак истраживаних локалитета.....	16
Табела 2. Протокол ESHIPPO модела са параметрима за процену Еколошке специјализације (ES) и Индекса локалне одрживости популација (ILSFP), преузето и прилагођено према Simić <i>et al.</i> (2014).....	32
Табела 3. Протокол „HIPPO“ фактора: елементи и систем бодовања елемената.....	34
Табела 4. Елементи коришћени у анализи репродуктивног потенцијала фрагментисаних популација.....	36
Табела 5. Бодовна скала за одређивање степена ризика од изумирања и приоритета заштите угрожених врста према модификованом моделу ESHIPPO.....	37
Табела 6. Хидролошки параметари, параметари квалитета воде и географске координате за истраживане локалитете.....	40
Табела 7. Параметри структуре популација: L_{sr} , W_{sr} , абунданца, биомаса, узрасна структура, полна структура, реална продукција и потенцијална продукција за поточну мрену на истраживаним локалитетима.....	43
Табела 8. Вредност von Bertalanffy-ијеве једначине за поточну мрену на истраживаним локалитетима.....	44
Табела 9. Дескриптивна статистика и параметри дужинско-тежинских односа и фактора кондиције за поточну мрену на 11 локалитета на рекама централне Србије.....	48
Табела 10. Двофакторска анализа варијанси (ANOVA) величине центроида (CS) (SS - сума квадрата, df - степени слободе, MS - варијанса, F - F вредности, p - статистичка значајност). Анализа варијабилности величине тела.....	52
Табела 11. Двофакторска анализа варијанси (ANOVA) величине центроида (CS) (SS - сума квадрата, df - степени слободе, MS - варијанса, F - F вредности, p - статистичка значајност). Анализа варијабилности облика тела.....	52
Табела 12. Резултати Mentel теста урађеног за сваки параметар посебно, као и за комбиноване хидролошке параметре квалитета воде и за географске дистанце.....	58
Табела 13. Параметри покретљивости сперматозоида на изабраним локалитетима.....	59
Табела 14. Вредности параметара покретљивости добијених у ISAS систему за све субпопулације. Узорак је анализиран у свежем и одмрзнутом стању након криопрезервирања, а вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна девијација (SD).....	64
Табела 15. Степен еколошке специјализације (ES), индекс локалне одрживости рибљих популација (ILSFP) и утицај HIPPO фактора у процени приоритета конзервација популација.....	67

Табела 16. Утицај елемената репродуктивног потенцијала (RP) у процени приоритета конзервације малих популација.....69

Листа слика

Слика 1. <i>Barbus balcanicus</i>	9
Слика 2. Дистрибуција поточне мрене.....	9
Слика 3. Мапа истраживаних локалитета: Б1 - Борачка река изнад бране, Б2 Борачка река - испод бране, П1 - Петровачка река - горњи ток, П2 - Петровачка река - доњи ток, Г1 - Groшничка река - горњи ток, Г2 - Groшничка река - изнад језера, Г3 - Groшничка река - испод језера, ЈС - Јасеница, ОС - Осаоница.....	17
Слика 4. и 5. Баријере на Groшничкој и Борачкој реци.....	18
Слика 6. Електрориболов.....	19
Слика 7. Конфигурација специфичних тачака коришћених за описивање морфолошке варијабилности тела <i>B. balcanicus</i> : 1. почетак горње вилице, 2. завршетак главе, 3. 4. почетак и завршетак основе леђног пераја, 5. 7. границе репног пераја, 6. основа репног пераја на бочној линији, 8. 9. границе аналног пераја, 10. 11. границе трбушног пераја, 12. основа грудног пераја, 13. највиша тачка оперкулума, 14. задња ивица ока.....	24
Слика 8. Приказ покретљивости сперматозоида поточне мрене у ISAS софтверу, при чему је приказана путања сваке ћелије и различитом бојом означена њена брзина (црвена - брзо покретни, зелена - споро покретни, плава - спори и жута - непокретни).....	27
Слика 9. и 10. Замрзавање узорка у криосламчицама на испарењима течног азота.....	28
Слика 11. и 12. Графички приказ дужинског раста поточне мрене на локалитетима Groшничка река - горњи ток и Groшничка река - изнад језера.....	44
Слика 13. и 14. Графички приказ дужинског раста поточне мрене на локалитетима Groшничка река - испод језера и Борачка река - испод бране.....	45
Слика 15. и 16. Графички приказ дужинског раста поточне мрене на локалитетима Борачка река - испод бране и Петровачка река - горњи ток.....	45
Слика 17. и 18. Графички приказ дужинског раста поточне мрене на локалитетима Петровачка река - горњи ток и Јасеница.....	45
Слика 19. Графички приказ дужинског раста поточне мрене на реци Осаоници.....	46
Слика 20. Филогенетско стабло хаплотипова врста рода <i>Barbus</i> . Стабло је конструисано од секвенци <i>COI</i> гена мтДНК методом максималне веродостојности	

(енг. Maximum Likelihood - ML) у програму MEGA7. Бројеви на чворовима представљају процентуалне вредности појаве приказане топологије на основу 1000 понављања. Сивом бојом означени су хаплотипови врсте *B. balcanicus* са подручја Балканског полуострва. Хаплотип детектован у дисертацији обојен је црвено. За сваки хаплотип на стаблу је приказан латински назив врсте, приступни број из NCBI базе и земља у којој је детектован. Као „outgroup“ укључена је секвенца *Barbus barbuis* заведена у Банци гена под приступним бројем KT369035.....50

Слика 21. Мрежа (енг. TCS network) конструисана на основу секвенци *COI* гена врста рода *Barbus*. Број мутацијских корака је представљен цртицама на спојним линијама између хаплотипова. Црни кругови представљају теоријски недостајуће или изумрле хаплотипове. Сивом бојом означени су хаплотипови врсте *B. balcanicus* са подручја Балканског полуострва. Хаплотип детектован у овој дисертацији означен је црвеном бојом. За сваки од хаплотипова на мрежи приказан је латински назив врсте и приступни број из NCBI базе.....51

Слика 22. Оквирни дијаграм визуализације промена облика тела између женки и мужјака *B. balcanicus*. Сиве линије приказују консензусни облик, док црне линије приказују одступање од консензуса.....53

Слика 23. Канонијска анализа варијансе (CVA) варијабилности облика популација женки по CV1 и CV2 оси, узрокована фрагментацијом станишта. Локалитети: Борачка река изнад бране (▲), Грошничка река изнад језера (●), Петровачка река горњи ток (□), Борачка река испод бране (Δ), Грошничка река испод језера (*), Петровачка река доњи ток (◆), Грошничка река горњи ток (○). Варијабилност облика је представљена оквирним дијаграмом где сиве линије приказују консензусни облик, док црне линије приказују варијације у односу на консензус дуж канонијских оса.....54

Слика 24. Канонијска анализа варијансе (CVA) варијабилности облика популација мужјака по CV1 и CV2 оси, узрокована фрагментацијом станишта. Локалитети: Борачка река изнад бране (▲), Грошничка река изнад језера (●), Петровачка река горњи ток (□), Борачка река испод бране (Δ), Грошничка река испод језера (*), Петровачка река доњи ток (◆), Грошничка река горњи ток (○). Варијабилност облика је представљена оквирним дијаграмом где сиве линије приказују консензусни облик, док црне линије приказују варијације у односу на консензус дуж канонијских оса.....55

Слика 25. UPGMA дијаграм за седам популација *B. balcanicus* за женке.....56

Слика 26. UPGMA дијаграм за седам популација *B. balcanicus* за мужјаке.....56

Слика 27. Ефекат метанола (MeOH), диметил сулфооксида (Me₂SO), етилен гликола (EG), пропилен гликола (PG) и 2-метоксиетанола (ME) на параметре покретљивости сперматозоида након одмрзавања. Све вредности су представљене као средња вредност ± стандардна девијација (SD). Различита слова изнад трака које означавају SD показују статистичку значајност. Вредности које не деле иста слова, значајно се разликују (Tukey's HSD, $p < 0.05$).....60

Слика 28. Ефекат различитих концентрација (5, 10 и 15%) диметил сулфооксида (Me₂SO) и 2-метоксиетанола (ME) на параметре покретљивости сперматозоида након одмрзавања. Све вредности су представљене као средња вредност ±

стандардна девијација (SD). Различита слова изнад трака које означавају SD показују статистичку значајност. Вредности које не деле иста слова, значајно се разликују (Tukey's HSD, $p < 0.05$).....61

Слика 29. Ефекат висине рама од стиропора (2, 3 и 5 cm) и времена хлађења (1, 2 и 3 min) на испарењима течног азота, на параметре покретљивости сперматозоида након одмрзавања. Све вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна девијација (SD). Различита слова изнад трака које означавају SD показују статистичку значајност. Вредности које не деле иста слова, значајно се разликују (Tukey's HSD, $p < 0.05$).....61

Слика 30. Ефекат додатне суплементације шећерима (0.1 и 0.3 M глукозе - Glu, сахарозе - Suc и трехалозе - Tre) на параметре покретљивости сперматозоида након одмрзавања. Све вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна девијација (SD). Различита слова изнад трака које означавају SD показују статистичку значајност. Вредности које не деле иста слова, значајно се разликују (Tukey's HSD, $p < 0.05$).....62

Слика 31. Ефекат суплементације протеинима (5 и 10% BSA и FBS) на параметре покретљивости сперматозоида након одмрзавања. Све вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна девијација (SD). Различита слова изнад трака које означавају SD показују статистичку значајност. Вредности које не деле иста слова, значајно се разликују (Tukey's HSD, $p < 0.05$).....63

Слика 32. Удео свих субпопулација сперматозоида (SP1 - SP4) у свежем и криопрезервираном узорку млечи поточне мрене.....65

Слика 33. Дистрибуција сперматозоида на основу линеарности (LIN) и криволинијске брзине (VCL), пре и након криопрезервације.....65

Слика 34. Графички приказ резултата анализе главних компоненти (PCA). ГР1 - Groшничка река - горњи ток, ГР2 - Groшничка река - изнад језера, ГР3 - Groшничка река - испод језера, БР1 - Борачка река - изнад бране, БР2 - Борачка река - испод бране, ПР1- Петровачка река - горњи ток, ПР2 - Петровачка река - доњи ток, ОС - Осаоница, ЈС - Јасеница.....66

1. Увод

Слатководни екосистеми су најразноврснији и најпродуктивнији екосистеми на планети (Nelson, 1994). Њихова станишта чине мали део (0,008%) од укупне запремине воде, и заузимају само око 0,8% површине Земље. И поред те чињенице, процењује се да у слаткој води живи око 10% од свих до сада описаних животињских врста и да се произведе око 3% укупне примарне продукције (Balian, 2010). Биолошка разноврсност слатководних екосистема представља виталну компоненту биосфере, са богатством врста које је знатно веће у односу на копнене и морске екосистеме. Несразмеран однос између великог броја врста које се налазе у релативно малој запремини слатке воде погодном за живот назива се „парадокс биодиверзитета слатке воде“ (Martens, 2010).

Рибе су значајни конституенти заједница у слатководним екосистемима и сматра се да 40% од укупног броја описаних врста живи у слатким водама (Kottelat & Whitten, 1996; De Silva *et al.*, 2007). Ови организми показују велики диверзитет у величини, облику, биологији и стаништима која насељавају. Велики део биомасе живих организама водених станишта чине рибе, и на бројне начине доприносе разноликости и функционисању екосистема које насељавају (Arthington *et al.*, 2016).

Ихтиофауна акватичних екосистема Балканског полуострва веома је разнолика и високо ендемична (Freyhof, 2011). Преко 80% свих европских слатководних врста риба је ендемично за Европу, односно пронађене су само на овом континенту. Многе од ових врста имају мале ареале и ограничене су на свега неколико водотокова. Висок ниво ендемизма је резултат комплексне геолошке историје у комбинацији са специфичним еколошким градијентом и климатским променама које су се дешавале на овом подручју (Tockner *et al.*, 2009).

Одређени делови Медитерана су идентификовани као важне „hotspot“ тачке биодиверзитета за речне рибе. То се објашњава ограниченим дисперзионим рутама за врсте које су везане искључиво за слатководне екосистеме, па су дуг временски период живеле окружене наметнутим границама које су чиниле слана вода и копно (Gante, 2011).

1.1. Фактори угрожавања акватичног биодиверзитета

Поред чињенице да се слатководни екосистеми истичу богатством диверзитета на свим нивоима, генетичком, специјском и екосистемском, они се сматрају и најугроженијим екосистемима на свету (Geist, 2011). Промене у структури и квалитету акватичних станишта су последица великог броја различитих антропогених активности (Groombridge & Jenkins, 1998).

Фактори који глобално угрожавају слатководни биодиверзитет могу се сврстати у пет интерактивних категорија: прекомерена експлоатација, загађење, унос инвазивних врста, модификације водотокова и уништавање и деградација станишта. Поред ових директних претњи, све већи негативни утицај на интегритет и функционисање водених екосистема имају и климатске промене (Dudgeon *et al.*, 2006).

Прекомерена експлоатација има велики утицај на смањење биолошког диверзитета водених станишта, пре свега риба, и многих бескичмењака (He *et al.*, 2017). У већем делу савременог друштва је употреба природних ресурса опортунистичка (Milankov, 2007). Комерцијални риболов који је економски значајна делатност на локалном и глобалном нивоу, оставља последице на циљане врсте, чак и на оне које спадају у случајни улов. Лоше управљање и недовољна контрола рибарства на отвореним водама је довела до ситуације да некада бројне популације сада буду на ивици опстанка (Allan *et al.*, 2005; Ruby *et al.*, 2011).

Раст хумане популације и активности повезане са развојем привреде су главни разлози који доприносе загађењу акватичних екосистема. Еколошке последице зависе од врсте супстанце која доспева у водене екосистеме, а еколошки ризици могући су код свих загађујућих материја када пређу граничне вредности и почињу да бивају опасни по организме и екосистеме у целини (Simić & Simić, 2000). Већина хидробионата је врло осетљива на било какве промене у станишту и реагују на загађење на различите начине, од метаболичких промена и смањења репродуктивне способности, до најдрастичнијих као што су миграције на друго станиште или нестанак (Bassem, 2020).

Намерно уношење алохтоних врста риба у нова водена станишта вршено је због развоја аквакултуре, рекреативног риболова и биолошке манипулације. Ненамерни уноси настају испуштањем баластне воде, ослобађањем мамаца од стране риболоваца и бегом из рибњака (Canonico *et al.*, 2005). Инвазивне врсте угрожавају аутохтоне конкуренцијом, предаторством, променом станишта, хибридизацијом и преношењем паразита и болести. Њихов утицај је велики, најмање контролисан и најмање раверзибилан антропогени утицај на водена станишта, који значајно мења структуру биодиверзитета, биогеохемију и економску употребу (Strayer, 2010).

Деградација акватичних станишта може се појавити у различитим облицима, а укључује и промене у терестричним екосистемима који се налазе у сливним подручјима. Може имати директне ефекте на животно окружење (попут експлоатације песка у речним токовима) или индиректно утицати на водени режим читавог речног слива. У потоцима и рекама, промене сложених образаца ерозије и седиментације могу имати велики утицај на функцију интерстицијске зоне, кључног

станишта у овим системима (Dudgeon *et al.*, 2006; Arthington *et al.*, 2016; Heinrich *et al.*, 2016).

1.2. Фрагментација станишта

Један од најутицајнијих антропогених процеса модификације станишта јесте фрагментација (Santos & Araújo, 2015). Овај процес је прво описан у терестричним екосистемима, и представља поделу једне области на више мањих, изолованих делова (Saunders *et al.*, 1991). У воденим екосистемима фрагментација настаје изградњом брана, најчешће у сврхе водоснабдевања, производње електричне енергије, наводњавања и контроле поплава (Seliger & Zeiringer, 2018). Конструкција брана са циљем контролisaња количине и времена протока воде, представља саставни део раста хумане популације и развоја технолошких иновација (Poff & Hart, 2002). Сматра се да је више од 60% свих водотокова регулисано (McAllister *et al.*, 2001).

У многим случајевима фрагментација река и потока доводи до значајне деградације станишта и смањује биолошку разноврсност и продуктивност екосистема (Kingsford 2000; Cortes *et al.*, 2002). Доминантне последице које фрагментација оставља на водотокове односе се на редукцију седимента, промене у температури и режиму протока воде, као и стварање препрека за кретање организама и хранљивих материја узводно и низводно (Poff & Hart, 2002).

Мање реке и потоци на којима су изграђене баријере брзо мењају своје карактеристике од релативно плитког станишта до дубљих и стајаћих вода које рибе нису искусиле током своје еволуције (Вахтер, 1977). Такве варијације у физичким условима утичу на организацију, структуру и процесе биотичких заједница (Franchi *et al.*, 2014). При физичкој подели станишта, спречена је експлоатација различитих ресурса средине од стране јединки великог броја врста (Milankov, 2007). Фрагментација утиче на многе кључне аспекте екосистема, попут хидролошке повезаности, што је од пресудног значаја за рибе и друге водене организме (Araújo *et al.*, 2013). Лимитирано кретање риба може довести до ограниченог протока гена и до диференцијације популација у фрагментисаним стаништима (AnvariFar *et al.*, 2011).

Баријере између фрагмената имплицирају и рестрикцију у проналажењу одговарајућег партнера за мрест, чиме се смањује репродуктивни потенцијал популација. Фрагментацијом се такође редукује потенцијал многих врста за дисперзију и колонизацију (Milankov, 2007).

Свака брана има јединствене карактеристике, и према томе природа промене животне средине је веома специфична за сваку локацију (McCartney, 2009). У литератури постоји низ студија које се баве променама облика тела риба у рекама и језерима или у високо лотичким или лентичким стаништима (Haas *et al.*, 2010; Franssen, 2011; Gaston & Lauer, 2015; Santos & Araújo, 2015), међутим, још увек недостаје информација у вези морфолошких реакција риба на баријере на мањим рекама и потоцима.

Дуже време пажња истраживача је углавном била усмерена на салмониде јер се сматрало да су остале рибље врсте мање угрожене фрагментацијом водених

токова (Thomson & Rahel, 1998; Morita & Yamamoto, 2002). Последњих година ово мишљење је промењено јер и рибе које нису салмониде мигрирају у потрази за храном, заклоном и због мреста, а појавила се и веза између узводних баријера и опадајуће бројности рибљих заједница (Petter, 1998).

1.3. Конзервационе методе у заштити биодиверзитета

Биолошки ентитети имају динамичну природу и због тога је њихова конзервација и дефинисање одговарајућег плана конзервације отежана (Milankov, 2007). За врсте које насељавају осетљиве екосистеме, подложне природним променама које су у интеракцији са антропогеним стресорима, неопходан је континуирани увид у стање популација и дистрибуцију.

Maitland (2004) дефинише основне принципе конзервације и указује да је пре свега неопходно извршити одређивање таксономског статуса врсте. По мишљењу овог аутора од кључне важности је да се одреди степен генетичке варијабилности врсте, добро упозна њена биологија и стекне увид у познавање структуре популација. За разликовање рибљих популација неопходно је одабрати одговарајуће молекуларно-генетичке и морфометријске методе (Sekulić, 2013; Cvijanović, 2016). Разумевање односа морфолошких целина организма и његовог окружења један је од кључних изазова у екологији (Gaston & Lauer, 2015; Silva *et al.*, 2016). За истраживања на морфолошком нивоу, поред класичних метода традиционалне морфометрије, све чешће се користе и савремене методе геометријске морфометрије којима се анализира варијабилност величине и облика морфолошких целина (Koehl, 1996; Sekulić, 2013).

Конзервациона биологија обухвата велики број метода које се генерално, на основу приступа, могу поделити на *in situ* и *ex situ* мере заштите (Lévêque, 1997).

In situ стратегија подразумева очување генетичког диверзитета популација у њиховим природним стаништима. Екосистеми, популације и врсте су веома динамични и променљиви у времену и простору. Очување *in situ* омогућава одвијање еволуционих и еколошких процеса и промовише генетичку варијабилност и прилагодљивост врста на променљиве услове природног окружења (Zegeye, 2016).

Поред заштите станишта, приступ заштите појединих таксона један је од најзначајнијих и често коришћен инструмент у конзервационој биологији (Petrović, 2014). Овај приступ се заснива на концепту интеграције знања о биологији врсте, потенцијалу станишта, као и познавању социо-економских прилика и могућих антропогених притисака (Geist & Hawkins, 2016). Да би се применио адекватан конзервациони приступ, од велике важности је процена степена угрожености и дефинисање категорије угрожености на основу критеријума Међународне уније за заштиту природе (енг. The International Union for Conservation of Nature - IUCN), као и дефинисање категорија на локалном нивоу.

Ex situ методе конзервације подразумевају заштиту врста ван њихових природних станишта, при чему је неопходна интервенција човека. Технике *ex situ* конзервације углавном се примењују на врстама које имају неке од следећих карактеристика: угрожене врсте, врсте са локалним значајем, врсте од значаја за обнову локалних екосистема, таксономски изоловане врсте и монотипски и

олиготипски родови (Nakansson, 2004). Конзервација и управљање популацијама може се реализовати на различите начине попут транслокација, вештачке репродукције, узгоја у заточеништву, формирање различитих типова банки гена (Kasso & Balakrishnan, 2013).

Једна од метода *ex situ* заштите је криопрезервација (Engelmann, 1998). Ова техника омогућава очување биолошког материјала (сперматозоида, јајних ћелија, ембриона и ткива) на ниским температурама са могућношћу да се поврати њихова функционалност након одмрзавања. Криопрезервација има велики потенцијал и успешну примену у репродуктивном менаџменту, што је од велике важности за аквакултуру и конзервациону биологију (Lahnsteiner *et al.*, 2000; Cabrita *et al.*, 2010; Martínez-Páramo *et al.*, 2017). Један од најпоузданијих параметара процене квалитета сперматозоида код риба је њихова покретљивост. Како су протоколи за криопрезервацију сперматозоида риба специфични за сваку врсту, њихов развој је кључан за очување јединствених генетичких ресурса природних популација. Успешност конзервације мушких полних продуката риба зависи од низа фактора, укључујући прикупљање сперматозоида високог квалитета, избора криопротектанта, режима замрзавања и одмрзавања које треба усагласити и прилагодити одређеној врсти (Koreika *et al.*, 2007).

Значај ове методе огледа се и у формирању криобанки гамета, које омогућавају сталну доступност криопрезервираних гамета, битног ресурса у програмима селекције гена, вештачкој оплодњи и конзервацији биодиверзитета (Lujic, 2015; Martínez-Páramo *et al.*, 2017).

1.4. Објекат истраживања

Породица Сурпринидае је велика породица слатководних риба распрострањених широм света са изузетком Мадагаскара, Аустралије, Новог Зеланда и Јужне Америке. Оно што је карактеристично за рибе из ове породице је присуство ждрелних зуба на петом шкржном луку, који им служе за дробљење хране јер им прави зуби у чељустима углавном недостају. Породица обухвата око 2100 познатих врста које се међусобно веома разликују по облику, станишту и начину живота (Kottelat & Freyhof, 2007).

Род *Barbus* (Cuvier & Clodet, 1816) је таксономски веома комплексна група која обухвата најмање 800 врста, распрострањених на три континента (Европа, Азија и Африка), са највећим диверзитетом у оквиру породице Сурпринидае. У Европи барбуси насељавају екосистеме од Шпаније до Црног мора, и од Средоземног мора до басена Дњепра на северу. Различите фенотипске особине, порекло, као и чињеница да су у оквиру рода укључене диплоидне, тетраплоидне и хексаплоидне врсте, веома компликује стандардну таксономију (Tsigenopoulos *et al.*, 1999). Howes (1987) је груписао све европске врсте заједно са неким врстама из Северне Америке и Блиског Истока у линију *Barbus sensu stricto*. Оно што је заједничко за све врсте у оквиру ове линије су тетраплоидно порекло, сличан кариотип, биохемијски маркери и паразитска фауна. Упркос великој биолошкој разноврсности, само 27 врста рода *Barbus* је аутохтоно за Европу, а неке од њих показују ограничене ареале дистрибуције и ендемски статус, са зоогеографске тачке гледишта (Bertoli *et al.*, 2019).

Banarescu (1973) сматра да барбуси на западном Палеартику потичу од заједничког источно-азијског предка, и да су на Медитеран доспеле сибирском рутом. Верује се да се ова миграција десила током касног миоцена и раног олигоцена, када је вероватно постојала широка географска и фаунистичка веза између Европе и Азије (Steininger & Rögl, 1984).

Са еколошког аспекта, барбуси су подељени на два екотипа, који се разликују по величини тела и типу станишта које насељавају. Реофилни, или искључиво речни, који чине врсте мале величине тела (максимална тотална дужина LT = 20-25 cm), које преферирају хладне планинске потоке, и турбулентне делове већих река. Други тип је флавио-лакустрини и обухвата крупније врсте (максимална тотална дужина LT > 50 cm) које насељавају широке мирне реке, са правилном струјом и вишим температурама воде (Economidis 1989; Tsigenopoulos *et al.*, 1999; Buonerba, 2015).

Врста *B. balcanicus* је формално описана 2002. године од стране аутора Kotlík, Tsigenopoulos, Ráb i Berrebi.

Regnum:	Animalia
Phylum:	Chordata
Subphylum:	Vertebrata
Superclassis:	Gnathostomata
Classis:	Osteichthyes
Subclassis:	Actinopterygii
Infraclassis:	Teleostei
Superordo:	Ostariophysi
Ordo:	Cypriniformes
Familia:	Cyprinidae
Genus:	<i>Barbus</i>
Species:	<i>Barbus balcanicus</i> Kotlík, Tsigenopoulos, Ráb & Berrebi, 2002.

Barbus balcanicus се разликује од осталих врста рода *Barbus* на основу следећих хаплотипова митохондријалне ДНК: AF112122, AF112409, AF112413-14, AF112438, AF248717-19 и AF274351. Иако постоје преклапања у већини морфолошких карактеристика, *B. balcanicus* се разликује од врста *B. petenyi* и *B. carpathicus* на основу тупо истакнуте њушке, браон-црних крупних мрља на глави, леђима и боковима, које се протежу од главе низ цело тело, и тамних мрља на перајима које су распоређене у редове (Kotlík & Berrebi, 2002).

Леђно пераје се састоји од 2-3 негранате жбице при чему је последња мекана и није назубљена. Садржи и 7-8 гранатих жбица, а последња је подељена у основи. Ивица пераја је равна, до благо конкавна. Трбушно пераје састоји се од 1-3 негранате жбице и 4-5 гранатих жбица, са последњом подељеном у основи. Доња усна је дебља, са кратким предњим режњевима. Има два пара бркова, при чему је предњи пар знатно краћи од задњег. Број крљушти у бочној линији је 49-57 + 3-4, између бочне линије и почетка леђног пераја 9-12, а између бочне линије и почетка грудног пераја је 8-10. Боја тела је сивкасто браон на леђима, жућкасто сива на боковима и жућкасто бела на абдомену (Слика 1) (Kotlík *et al.*, 2002).

Слика 1. *Barbus balcanicus*

(www.fishbase.com)

Поточна мрена насељава већи део Балканског полуострва, и делове северозападне Словеније, северозападну и источну Хрватску, северну Србију, јужну Мађарску и југозападну Румунију (Слика 2). Њено присуство је забележено у црноморском, јадранском и егејском сливу. Северозападна граница распрострањења и веза са јадранским сливом је река Соча, једним делом тока у Италији, а другим у Словенији. У дунавском сливу популације поточне мрене су забележене у горњем току Саве, Дрини, Крупаци, Нери и Власинском језеру. На северу Грчке, у оквиру егејског слива поточна мрена насељава реке Галикос, Вардар, Лоудиас и слив Алиакмона (Kottelat & Freyhof, 2007).



Слика 2. Дистрибуција поточне мрене

(Kottelat, M. & Freyhof, J. 2008. *Barbus balcanicus*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2020-1)

Поточна мрена живи у планинским и брдским потоцима и горњим токовима река, где је присутан брз проток хладније воде богате кисеоником. Ређе насељава доње токове река, шљунковитих и песковитих подлога са мањом брзином воде. Најактивније су у брзацима и слаповима у току дана. У време сезоне мреста, од маја до јула, јединке се окупљају у плићацима и мигрирају узводно у потрази за

одговарајућим стаништима за мрест. За полагање икре јединке бирају камениту или шљунковиту подлогу, са брзом воденом струјом. Мужјаци стичу полну зрелост обично између прве и друге године живота, док женке најчешће сазревају између треће и четврте године живота (Economidis *et al.*, 2003; Mrakovčić *et al.*, 2006; Kottelat & Freyhof, 2007; Simonović, 2010).

Спада у групу бентиворних риба, што значи да се храни фауном дна. Исхрана поточне мрене се заснива углавном на ларвама инсеката као и неким врстама *Gastropoda* и *Amphipoda* (Lenhardt *et al.*, 1996). Piria *et al.* (2007) констатују да се исхрана мањих узрасних категорија састоји од биљних и животињских компоненти, док у исхрани већих узрасних категорија преовладава храна животињског порекла.

Ова врста има одређени спортско-риболовни значај, али генерално са аспекта рибарства није економски важна. Према критеријумима Међународне уније за конзервацију природе категорисана је као „најмања брига” (енг. Least Concern - LC).

1.5. Досадашња истраживања

B. balcanicus се под овим именом први пут помиње у студији аутора Kotlík *et al.* (2002) где су представљене генетичке и морфолошке карактеристике које је издвајају као посебну врсту. Идентификацију на територији Србије аутори су потврдили на основу узорка из Крупајске реке, који представљају холотип ове врсте. Након тога није било опсежнијих истраживања која би обухватила већи број узорака и локалитета како би се потврдила њена дистрибуција на територији Србије. Постоји веома мало литературних података о врсти *B. balcanicus*, њеној биологији, екологији и генетичкој разноликости. Током ранијих истраживања, спомиње се под различитим синонимима међу којима су најчешћи *B. peloponnesius* (Valenciennes, 1844) и *B. peloponnesius petenyi* (Heckel, 1847).

Са циљем разјашњења таксономских недоумица и еволутивних односа, Karaman (1974) у својим истраживањима представља развојни пут врста мрена из рода *Barbus* са посебним освртом на проблематику балканских форми. Аутор је указао да се преко система Охрид-Дрим-Скадар *B. peloponnesius* распространила широм дунавског слива Балканског полуострва и демантује претходне тврдње да су *B. peloponnesius* и *B. meridionalis* (Risso, 1827) подврсте једне врсте.

Значајан допринос у истраживању ове врсте на територији Србије даје и Šorić (1989, 1992), који је прво описује под именом *B. meridionalis*, а касније као *B. peloponnesius petenyi*, анализирајући структуру популација и репродуктивни потенцијал.

Под именом *B. peloponnesius petenyi* помиње се и у студији Lenhardt *et al.* (1996) где је истраживан њен раст и исхрана на реци Градац. Simonović (1995) указује на крајње нејасан таксономски статус ове врсте, описује је као *B. peloponnesius* и напомиње да се често јавља под синонимом *B. meridionalis*. Аутор наводи да се за дунавски и вардарски слив води као подврста *B. p. petenyi*, а за јадрански *B. p. rebeli* (Koller, 1925).

Допринос бољем познавању екологије врсте *B. balcanicus*, дат је у студији Žutinić *et al.* (2014) проучавањем узрасне структуре, темпа раста и полног диморфизма популација у реци Илови у Хрватској. Ова група аутора извела је

закључак да постоји полни диморфизам, при чему су женке крупније од мужјака. Присутна је једнака заступљеност полова, као и изометријски раст. Сличне еколошке аспекте, анализирали су и Bertoli *et al.* (2019), у оквиру популација поточне мрене на северозападној граници ареала распрострања.

Marić *et al.* (2012) констатују присуство врсте *B. balcanicus* на територији Црне Горе, у рекама Лим, Тихотина и Тара. У оквиру истраживања представљене су значајне морфолошке карактеристике ових популација и указано је на велику морфолошку сличност са врстама *Barbus rebeli* и *Barbus barbuis* (Linnaeus, 1758), које насељавају водотокове Црне Горе. У резултатима је потврђено да се поточна мрена разликује на основу дебље доње усне са кратким средњим режњем, броја крљушти у бочној линији и негранатој жбици трбушног пераја која је знатно краћа од друге разгранате.

Морфолошка и молекуларна диференцијација између врста *B. balcanicus* и *B. strumicae* истраживана је у оквиру студије Simonović *et al.* (2018). Анализиране јединке из реке Пчиње су морфолошки биле сличније јединкама *B. strumicae* из реке Драговиштице, али је анализа на основу структуре цитохрома Б указала на ближу везу са јединкама *B. balcanicus* из Пчиње. Аутори су донели закључак да су потребна додатна истраживања филогенетских односа реофилних барбуса за област југоисточне Србије, коју сматрају једним од регионалних центара биодиверзитета.

Radojković *et al.* (2019) истраживали су морфолошку варијабилност популација поточне мрене на територији централне Србије, пратећи величину, облик и полни диморфизам. У оквиру ове студије констатоване су и разлике у морфолошким карактеристикама које су узроковане фрагментацијом речног тока.

Uzunova *et al.* (2012) истраживали су утицај фрагментације станишта на бројност и величину популација *B. petenyi* (Heckel 1852), реофилне циприниде која је по својој екологији веома слична поточној мрени. Констатовано је да популације у горњем току реке Искар у Бугарској имају тенденцију опадања бројности, а поред тога долази и до промене структуре популације.

Новија истраживања комплексности таксономског статуса и филогеније у оквиру рода *Barbus* обухватала су једним делом и врсту *B. balcanicus*. Студија Markova *et al.* (2010) се бави проблематиком филогенетске историје и ендемизма рода *Barbus* у хидролошким системима реликтних језера Балканског полуострва. Аутори врсту *B. balcanicus* описују као широко распрострањену у сливу Дунава и Вардара.

Проучавајући историју врсте *B. carpathicus* (Kotlík, Tsigenopoulos, Ráb *et al.* Berrebi, 2002) Konopiński *et al.* (2013) указују да је она најближи сродник са *B. balcanicus* и стога су биолошки веома сличне. Vuonerba *et al.* (2015) су анализирали факторе који утичу на структуру, дистрибуцију и специјацију барбуса у Италији, и спомињу *B. balcanicus* као врсту насталу у касном миоцену. У студији се наводи да је имигрирала у Падано-Венецијанску регију са подручја Динарида, што се потврђује ниском укупном нуклеотидном разноликошћу. Истраживања таксономије и дистрибуције реофилних барбуса на територији Мађарске потврђују блиску повезаност *B. balcanicus* са врстама *B. petenyi* и *B. carpathicus* као и горњу границу њеног ареала (Antal *et al.*, 2016).

Криопрезервација као конзервациона метода очувања биодиверзитета је успешно примењена код великог броја ципринидних врста. Неки од аутора који су писали на ову тему су: Kurokura *et al.* (1984); Lahnsteiner *et al.* (2003); Horváth *et al.* (2003); Urbáni *et al.* (2006); Yang *et al.* (2007); Žarski *et al.* (2014); Dietrich *et al.* (2015); Lujčić *et al.* (2015); Bernáth *et al.* (2018). До сада нема литературних података о примени ове методе за поточну мрену.

2. Циљеви истраживања

Циљеви овог рада су следећи:

- ❖ утврђивање структуре анализираних популација врсте *B. balcanicus* у односу на средњу вредност дужине, средњу вредност масе, абунданцу, биомасу, узрасну структуру, темпо раста, полну структуру, реалну продукцију и потенцијалну продукцију,
- ❖ анализа дужинско-тежинских односа и коефицијента кондиције популација врсте *B. balcanicus* на истраживаном подручју,
- ❖ генетичка карактеризација популација врсте *B. balcanicus* анализом *COI* гена митохондријалне ДНК,
- ❖ процена морфолошке варијабилности популација врсте *B. balcanicus* методом геометријске морфометрије између популација у фрагментисаним и нефрагментисаним стаништима,
- ❖ утврдити утицај фрагментације на квалитет сперматозоида мужјака и репродуктивни потенцијал популација врсте *B. balcanicus*,
- ❖ оптимизација протокола за конзервацију сперматозоида врсте *B. balcanicus*,
- ❖ процена ризика изумирања применом модификованог модела ESHIPPO (Simić *et al.*, 2007).

3. Материјал и методе

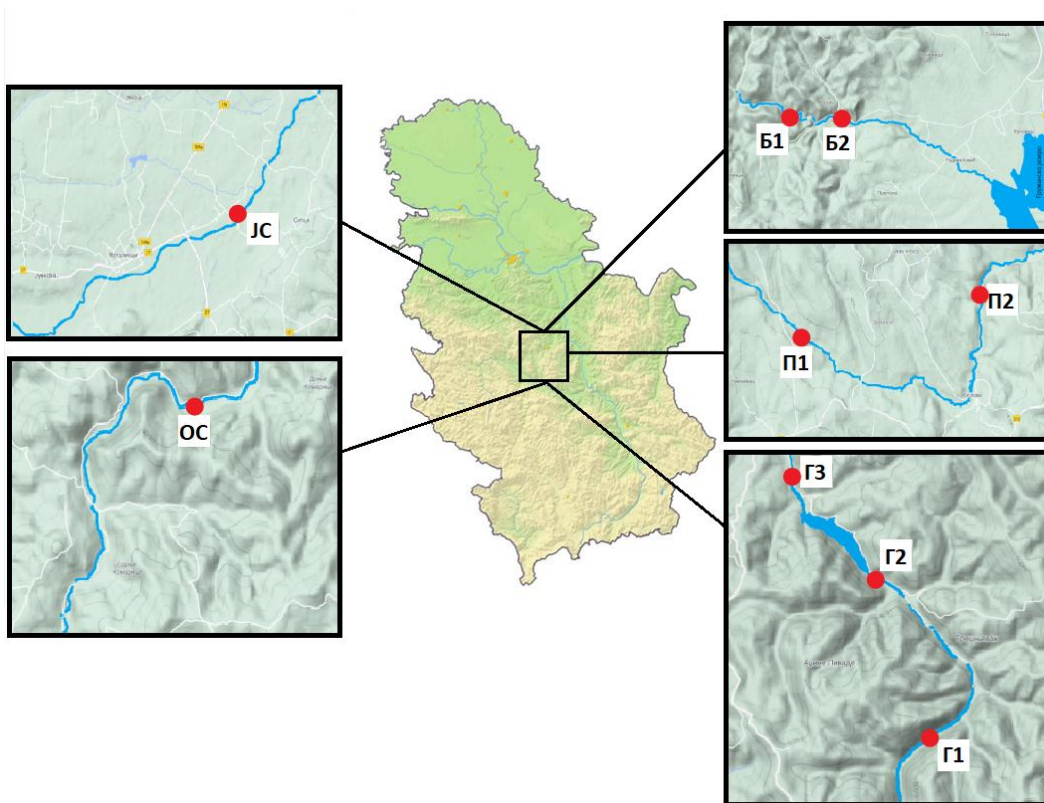
3.1. Истраживано подручје и његове карактеристике

У сладу са сазнањима о дистрибуцији поточне мрене истраживање је било усмерено ка брдским рекама, са разноврсним хидроморфолошким карактеристикама.

Истраживано је на пет река, сличних еколошких карактеристика, са подручја централне Србије: Грошничкој реци, Борачкој реци, Петровачкој реци, Јасеници и Осаоници. Све истраживане реке припадају сливу Велике Мораве (Табела 1, Слика 3). Карактеристично за све екосистеме је присуство поточне мрене, у мешовитим популацијама или као моноспецијске популације. Грошничка и Борачка река су фрагментисане са мањим или већим бројем баријера. Петровачка река је загађена на ушћу у Лепеницу и у том делу нема риба, а Осаоница и Јасеница су узете као референтне тачке јер су нефрагментисане. На истраживаном подручју су прикупљени подаци за анализу структуре популација и примену модификованог ESHIPPO модела. За морфометријске и генетичке анализе и за криопрезервацију гамета мужјака су узети узорци.

Табела 1. Списак истраживаних локалитета

Екосистем	локалитет	координате
1. Грошничка река	горњи ток	43.89705N 20.91309E
2. Грошничка река	изнад језера	43.91735N 20.89730E
3. Грошничка река	испод језера	43.95948N 20.87508E
4. Борачка река	изнад бране	43.96089N 20.58360E
5. Борачка река	испод бране	43.96139N 20.59222E
6. Петровачка река	горњи ток	44.08895N 20.80214E
7. Петровачка река	доњи ток	44.05264N 20.88130E
8. Јасеница	-	44.27451N 20.85638E
9. Осаоница	-	44.06327N 21130505E



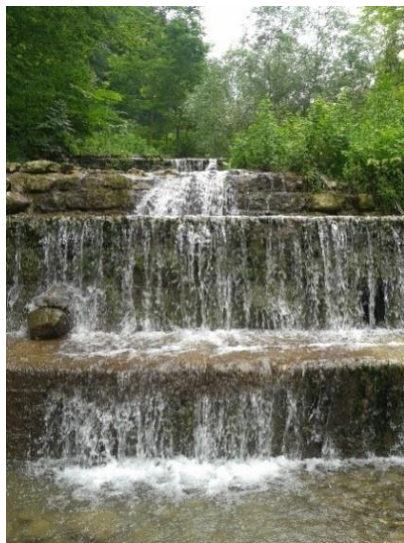
Слика 3. Мапа истраживаних локалитета: Б1 - Борачка река изнад бране, Б2 - Борачка река - испод бране, П1 - Петровачка река - горњи ток, П2 - Петровачка река - доњи ток, Г1 - Грошничка река - горњи ток, Г2 - Грошничка река - изнад језера, Г3 - Грошничка река - испод језера, ЈС - Јасеница, ОС - Осаоница.

3.1.1. Грошничка река

Примарни истраживани екосистем је Грошничка река, дужине тока 18 km. Грошничка река је десна притока Лепенице и припада црноморском сливу. Приближно на средини водотока је изграђена брана 1937. године чиме је формирано акумулационо језеро из којег се град Крагујевац снабдева водом. Због природе геолошке подлоге временом се велика количина седиментног материјала таложила испред бране. Ради успоравања ерозивног процеса, 1965. године изграђено је осам мањих предбрана дуж речног тока. Бране су од два до шест метара висине, једноставне или степенасте градње (Варашков, 1973). На тај начин је река подељена на велики број фрагмената различитих дужина (Слика 4).

3.1.2. Борачка река

Борачка река припада сливу Западне Мораве и дуга је 8,7 km. Површина слива је 38,5 km². Улива се у акумулацију Гружа и припада сливу реке Груже. Оријентациона количина протока воде износи 219 l/s (Čomić & Ostojić, 2005). Изградњом бране на Борачкој реци, ток јој је подељен на две целине (Слика 5). У горњем току реке, мрена се јавља у заједници са пијором.



Слике 4. и 5. Баријере на Грошничкој и Борачкој реци

(фото. Н. Којадиновић)

3.1.3. Петровачка река

Петровачка река је највећа притока Лепенице, дужине тока 31 km. Извире у Рамаћи испод Божурове главице и тече према истоку до ушћа у Лепеницу код Јовановца (Stipanović, 1974). Подручје слива реке Лепенице постало је окосница привредног и урбаног развоја Шумадијског округа (Milanović, 2006). Након интензивног развоја индустрије у Крагујевцу, шездесетих година прошлог века, долази и до константног загађења речних система овог подручја. То је у великој мери утицало на стање читаве хидробиоценозе, а нарочито је то имало ефекта на стање ихтиоценозе наведених река.

3.1.4. Река Осаоница

Река Осаоница припада сливу Велике Мораве. Извире на југозападним падинама Црног врха у атару села Доња Сабанта. Осаоница током летњих месеци махом пресушује. У атару села Багрдан улива се у Велику Мораву (Samardžić, 2013).

3.1.5. Река Јасеница

Јасеница, дужине 85 km, је највећа притока Велике Мораве. У горњем току, до села Божурње, речно корито има велики пад и Јасеница је брза планинска река. Низводно, она је усекла своје корито дуж бројних тектонских раседа који су јој одредили правац тока ка североистоку (Gavrilović & Đukić, 2002).

3.2. Методологија прикупљања узорака

Теренска истраживања чији су резултати представљени у докторској дисертацији, спроведена су у периоду од 2011. до 2016. године. За сваки истраживани локалитет прикупљени су и подаци који дефинишу карактеристике станишта како би разумели улогу различитих компоненти животне средине на морфолошку варијабилност облика тела риба. Од параметара који описују речно корито и водоток бележени су подаци о географским координатама (GARMIN's eTrex® Legend), дубини и ширини речног корита (мерени мерном траком и мерним штапом) и брзини протока (Aquatech GMH 3330). Основни параметри квалитета воде: температура воде, рН, електропроводљивост и тврдоћа мерени су помоћу инструмента HANNA HI 98130. Концентрација и сатурација кисеоника добијене су коришћењем инструмента Mettler Toledo, Seven Go pro. Одабрани параметри мерени су током пролећа и лета 2013. и 2014. године и за анализу је узета средња вредност свих мерења.

Риба је узоркована техником електрориболова, која се користи у научно-истраживачке сврхе. Ова техника се заснива на примени електричног поља између електрода, створеног агрегатом са исправљачем или акумулатором са индуктором. Електрориболов је извршен уз помоћ електроагрегата „Aquatech“ IG 1300 (2.6 kW, 80-470 V) (Слика 6). Дужина профила дуж речног тока на ком је вршен излов износила је 50 m. Свакој изловљеној јединки измерене су тотална и стандардна дужина (изражена у cm, тачност ± 0.1 cm) и маса (изражена у g, тачност ± 1 g).



Слика 6. Електрориболов

(фото. С. Ђуретановић)

Након излова, рибе су конзервиране у 95% етанолу. Пол је утврђен опсервацијом гонада уз помоћ микроскопа. Са сваке јединке изнад бочне линије

узета је крљушт, која је очишћена од мукуса, и анализирана под бинокуларном лупом (Nikon SMZ 800). Старост јединки је утврђена бројањем нараштајних зона, односно година на крљуштима риба.

3.3. Анализа структуре популација врсте *B. balcanicus*

Анализирано је неколико параметара структуре популација поточне мрене на сваком истраживаном локалитету. Абунданца и биомаса као главни квантитативни параметри, изражени су по километру речног тока. Средња дужина тела (L , cm) и средња тежина тела (W , g), израчунате су на основу измерене тоталне дужине и тежине свих узоркованих јединки. Узрасна структура популација представљена је као процентуална дистрибуција узрасних класа по локалитетима. Полна структура популација представљена је за сваки локалитет процентуалним односом полова.

Темпо дужинског раста анализиран је на основу измерених тоталних дужина тела (TL) и одређене старости јединки. Изведена је крива раста према моделу von Bertalanffy-ја, који представља најпознатији модел раста примењен у рибарству (Ricker, 1971, 1975). По овом моделу, дужина тела у било ком времену t , израчунава се као:

$$L_t = L_{\infty} (1 - e^{-K(t-t_0)})$$

где је L_{∞} максимална (асимптотска) величина којој тежи дужина рибе, K мера стопе при којој се дужина тела приближава вредности L_{∞} - тзв. Бродијев коефицијент раста (Brody, 1927, 1945, према: Ricker, 1975), а t_0 параметар који показује хипотетичко време у којем би дужина тела била једнака нули.

L_{∞} и коефицијент раста K добијају се из регресије L_{t+1} на L_t чија графичка презентација представља тзв. Валфордovu линију (Walford, 1946, према Ricker, 1975). Нагиб ове криве једнак је Фордовом коефицијенту раста $k = e^{-K}$ (Ford, 1933, према Ricker, 1975) одакле се може израчунати L_{∞} .

Да би се добио параметар t_0 потребно је урадити регресију $\ln(L_{\infty} - L_t)$ на t . Нагиб ове криве једнак је K , а одсечак на y оси је $\ln L_{\infty} + Kt_0$, одакле се може израчунати вредност t_0 . Вредност t_0 на y оси је обично негативна и не даје никакве корисне информације те се често сматра параметром сметње.

Повратно израчунавање дужина по моделу урађено је уз помоћ софтверског пакета Microsoft Excel 2010 и SPSS 15.0.

Процена реалне продукције извршена је према методи коју је описао Charman (1971), на основу следећих параметара: биомасе годишта B_1 , средње биомасе (Bst) између два годишта ($\Delta t = t + 1 - t$), број јединки годишта t (Nt), просечне масе (wt) и коефицијента пораста између годишта t и $t + 1$ (G). Укупна биомаса одређеног годишта се рачуна као $Bt = Ntwt$. Просечна биомаса између два годишта је $B = (Bt + 1 - Bt) * 2^{-1}$, док коефицијент пораста масе узима у обзир просечне масе јединки између два годишта $G = (\ln wt + 1 - \ln wt) * \Delta t - 1$. Напослетку, продукција између два годишта износи $P = G * B$. Након што се на овај начин израчуна продукција између свака два годишта, њихова сума ($\sum P$) даје укупну годишњу продукцију ихтиомасе.

Процена потенцијалне продукције извршена је према методи Leger Huet (Huet, 1964):

$$K = V * L * k$$

Где **K** представља годишњу продуктивност воде у килограмима по километру реке, **V** је биогени капацитет, **L** представља просечну ширину реке у метрима и **k** је коефицијент продуктивности.

Вредности за **V** су следеће:

1-3: воде са мало хране за рибе,

4-6: воде са просечним количинама хране,

7-10: воде које су посебно богате храном.

Коефицијент **K** је збир $k_1 + k_2 + k_3$ где је:

1) k_1 израз просечне годишње температуре чија се вредност одређује на следећи начин:

- просечна годишња температура °C: 7, 10, 16, 22, 28

- k_1 : 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0.

2) k_2 зависи од киселости или алкалности воде и њене могуће вредности су:

- за некарбонатне воде = 1,0

- за кречњачке воде = 1,5

3) k_3 сумира тип рибље популације са следећим вредностима:

- k_3 вредност за хладну воду (реофилна врста) = 1,0

- k_3 вредност за мешовите заједнице = 1,5.

3.4. Анализа дужинско - тежинског односа и кондиционог фактора врсте *B. balcanicus*

Анализа дужинско - тежинског раста рачуна се на основу измерене дужине (TL, изражена у cm, тачност ± 0.1 cm) и тежине тела (W, изражена у g, тачност ± 1 g). Алометријски однос тоталне дужине и тежине тела ради се према експоненцијалној функцији:

$$W = a L^b$$

која у логаритамској форми има облик:

$$\log W = \log a + b \log L$$

где **W** представља тежину тела (g), **L** дужину тела (cm), **a** константу (одсечак на y оси), и **b** фактор алометрије (Ricker, 1975). Изометријски раст је присутан када је вредност фактора **b** = 3. Уколико је вредност **b** > 3 раст се дефинише као позитиван алометријски раст, а у супротном случају, када је **b** < 3, раст се дефинише као негативан алометријски.

Фултонов индекс кондиције (Fulton, 1904) рачунат је по формули:

$$K = (W L^{-3}) * 100$$

где **W** представља тежину тела (g), а **L** дужину тела (cm).

Метода линеарне регресије урађена је коришћењем програмског пакета SPSS 15.0.

3.5. Генетичке анализе

Генетичка анализа рађена је у Лабораторији за молекуларну еволуцију и таксономију животиња Зоологијског завода, Биолошког одсека, Природословно-математичког факултета Универзитета у Загребу.

Укупно је анализирано 20 узорака из Грошничке, Борачке, Петровачке реке и Јасенице. Од сваке јединке узет је узорак мишићног ткива, запремине 1 cm³ и фиксиран је у 95% етанолу, за накнадну ДНК изолацију и амплификацију истраживаног гена.

Целокупан ДНК материјал изолован је из мишићног ткива поточне мрене помоћу *Chelex* методе (Walsh *et al.*, 1991). Концентрација и квалитет екстраховане ДНК проверени су на спектрофотометру NanoDrop ND-100 (NanoDrop Technologies, САД). Узорци изолованог ДНК материјала су чувани на температури од - 20 °C, до умножавања ДНК ланчаном реакцијом полимеразе - PCR (енг. Polymerase Chain Reaction).

За генетичку анализу коришћен је ген који кодира субјединицу I цитохром оксидазе митохондријске ДНК (енг. *COI* mtDNA). Фрагменти *COI* гена су амплифицирани уз помоћ прајмера FISH1F (5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3') и FISH1R (5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3') (Ward *et al.*, 2005). Смеша за PCR реакцију је припремљена са HotStarTaq Master Mix китом у укупној запремини од 20 µL и садржала је 0,8 U HotStarTaq DNA полимеразе, 1,5 mM MgCL₂, 0,2 mM dNTP, 200 nM сваког прајмера и 10-50 ng изоловане геномске ДНК.

Програм под којим се одвијала PCR амплификација састојао се из иницијалне денатурације (95 °C, 2 min), праћене са 30 циклуса денатурације (94 °C, 1 min),

хибридизације прајмера (54 °C, 1 min) и елонгације ДНК (72 °C, 1,30 min). Након 30 циклуса следила је завршна елонгација (72 °C, 10 min) (Perea *et al.*, 2010). Амплификација је урађена употребом апарата Eppendorf Mastercycler. Успешност амплификације PCR продуката проверена је уз помоћ 1,5% агарозног гела у 1x TAE пуферу.

Припрема узорака за секвенцирање, као и само секвенцирање PCR продуката мтДНК услужно је обављено од стране компаније Макроген (Macrogen Inc., Сеул, Јужна Кореја), на уређају ABI 3730XL DNA (Applied Biosystems, САД). За секвенцирање су коришћени исти прајмери као и при PCR амплификацији.

3.5.1. Програмска анализа гена мтДНК

Секвенце преузете са корисничке стране Macrogen Inc. упоређене су са осталим секвенцама из Банке Гена (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) у оквиру NCBI (eng. National Center for Biotechnology Information) базе коришћењем програма BLAST (енг. Basic Local Alignment Tool) (Altschul *et al.*, 1990). Секвенце су затим обрађене у SEQUENCHER 5.4.6 софтверу (Gene Codes Corp., САД) и поравнате у ClustalW програму (Thompson, Higgins & Gibson, 1994).

У програмском пакету MEGA7 (Kumar, Stecher & Tamura, 2016) према Бајесијанском критеријуму (енг. Bayesian Information Criterion - BIC) изабран је најбољи модел Tamura - Nei (енг. TN93 model, Tamura & Nei, 1993) уз предложену пропорцију еволуционо инваријабилних места (I). Филогенетска анализа урађена је применом одабраног модела (TN93 + I). У истом програму конструисано је стабло максималне веродостојности (енг. Maximum Likelihood - ML) са потпором формирања чворишта од 1000 bootstrap понављања.

Мрежа хаплотипова је конструисана у програму PopArt 1.7 (<http://popart.otago.ac.nz>) помоћу TCS алгоритма (Clement *et al.*, 2002).

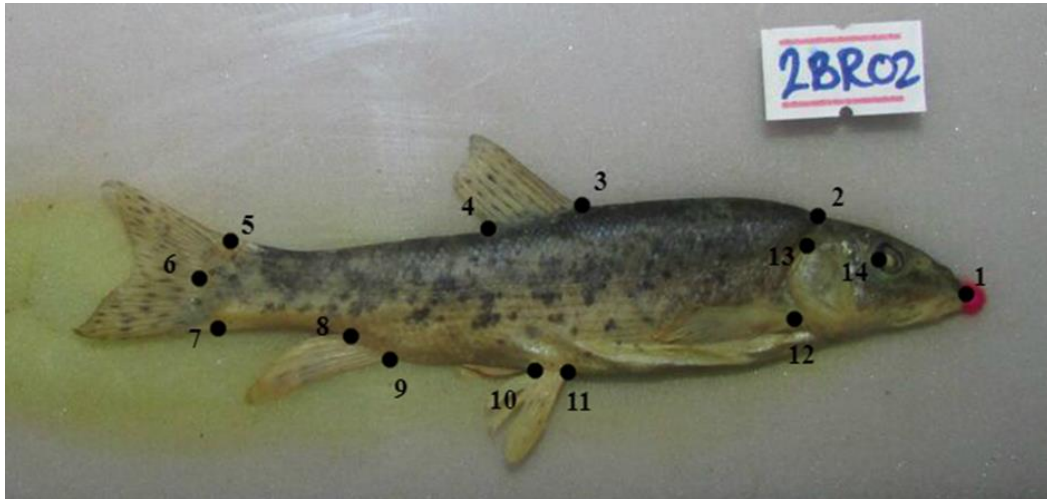
3.6. Методе геометријске морфометрије

Применом методе геометријске морфометрије анализирана је варијабилност величине и облика тела, полни диморфизам, као и варијабилност облика тела јединки са различитих локалитета.

Укупно је анализирано 200 адултних јединки са седам локалитета: Грошничка река - горњи ток, Грошничка река - изнад језера, Грошничка река - испод језера, Борачка река - изнад бране, Борачка река - испод бране, Петровачка река горњи ток, Петровачка река доњи ток. На сваком локалитету изловљено је по 30 јединки, сем на Петровачкој реци у доњем току где је изловљено 20 јединки.

Десна страна сваке јединке фотографисана је дигиталним фотоапаратом NIKON 3100, монтираним на статив у фиксном положају. Сви објекти били су под константним условима током фотографисања. Рибе су постављене на истој удаљености од фотоапарата, и истом положају како би се умањила могућност грешке.

Дигитализација специфичних тачака и припрема фајлова за генерализовану Прокрустову анализу (енг. Generalized Procrustes Analysis - GPA) рађена је у програмима из TPS серије, који служе за прикупљање дводимензионалних података, односно X и Y координата специфичних тачака. На свакој фотографији је позиционирано 14 дводимензионалних тачака коришћењем програма TPSDig (Rohlf, 2005) (Слика 7). У програму TPSUtil (Rohlf, 2008) извршена је манипулација TPS докумената (спајање докумената и уређивање тачака).



Слика 7. Конфигурација специфичних тачака коришћених за описивање морфолошке варијабилности тела *B. balcanicus*: 1. почетак горње вилице, 2. завршетак главе, 3. 4. почетак и завршетак основе леђног пераја, 5. 7. границе репног пераја, 6. основа репног пераја на бочној линији, 8. 9. границе аналног пераја, 10. 11. границе трбушног пераја, 12. основа грудног пераја, 13. највиша тачка оперкулума, 14. задња ивица ока.

(фото. Н. Којадиновић)

Тачке су одабране тако да на репрезентативан начин описују облик анализираних морфолошких структура. Према класификацији коју је дао Bookstein (1991) већина тачака припада типу I, односно најпрецизније се могу одредити и дефинисане су местима сустицања различитих морфолошких целина.

3.6.1. Статистичке анализе

Након обележавања тачака, урађена је статистичка анализа података. Применом Генерализоване Прокрустове Анализе (GPA), односно Прокрустовом суперимпозицијом конфигурација специфичних тачака, елиминисане су разлике у њиховој величини, положају и оријентацији (Rohlf & Slice, 1990; Rohlf, 1999; Mitteroesker *et al*, 2013.). За сваку јединку на нивоу целог узорка издвојене су величине центроида (CS), као варијабле величине, и Прокрустове координате, као варијабле облика.

Варијабилност величине центроида анализирана је помоћу двофакторске анализе варијансе (two-factor ANOVA). Као фактори који су могли утицати на варијабилност величине центроида тестирани су утицај пола и локалитета, као и

њихова интеракција. Мултиваријантном регресијом је анализирана варијабилност облика, при чему су као потенцијлни фактори тестирани величина, пол и локалитети. У ову сврху, урађене су три одвојене мултиваријантне регресије, где су Прокрустове координате биле постављене као зависно променљиве, док су величина ($\log CS$), пол (кодиран као 1 и 2) и модел локалитета (кодиран од 1 до 7) постављени као независне променљиве. Статистичка значајност овог теста је анализирана пермутационим тестом са 10000 понављања против нулте хипотезе независности ових параметара (Good, 1994). Додатно, тестиран је утицај пола и локалитета на варијабилност облика тела поточне мрене, коришћењем двофакторске анализе варијансе (two-factor ANOVA). На неким локалитетима је пронађен различити број мужјака и женки (на Грошничкој реци, испод језера само пет мужјака и 28 женки, и у горњем току Грошничке реке, само пет женки у односу на 20 мужјака) и постоји могућност да је варијабилност повезана са полом утицала на варијабилност повезану са локалитетом. Да би се ово испитало коришћени су резидуали мултиваријантне регресије варијабилности облика под утицајем локалитета. Коришћени подаци су представљали промену облика тела прилагођену локалитету. Након тога, урађена је једнофакторска анализа варијанси (one-way ANOVA) и мултиваријантна регресија, са прилагођеним подацима, како би се испитао утицај пола и локалитета на варијабилност у облику.

Варијабилност у облику тела риба између локалитета анализирана је применом Канонијске дискриминантне анализе (енг. Canonical Variate Analysis-CVA) (Klingenberg, 2011). Издвојене су канонијске осе (енг. *Canonical Variables - CV*) и добијен је графички приказ положаја јединки у односу на прве две издвојене осе ($CV1$ и $CV2$). Промене облика које доприносе дискриминацији анализираних група представљене су у облику TPS деформација (енг. Thin Plate Splin), дуж прве и друге канонијске осе. Величина разлика у облику тела квантификована је у квадратним Махаланобисовим дистанцама. Матрица израчунатих Махаланобисових дистанци коришћена је за конструкцију фенограма, применом UPGMA (енг. Unweighted Pair - Group Method Using Arithmetic Averages - UPGMA) кластер анализе.

Како би тестирали да ли на морфолошке промене утичу специфични параметри станишта, пре него фрагментација, анализирана је повезаност морфолошких растојања и растојања добијених за кључне хидролошке (ширина и дубина речног корита и брзина протока воде) и параметре квалитета воде (pH, електропроводљивост, тврдоћа воде, концентрација O_2 и сатурација O_2) коришћењем Mentel теста. Поред тога, анализирана је повезаност морфолошких растојања и географске удаљености између локалитета. Прокрустове и Махаланобисове дистанце су коришћене као морфолошка растојања, док су растојања између локалитета и кључни хидролошки и параметри квалитета воде и географске удаљености генерисани у R софтверу (<https://www.r-project.org/>). Mentel тест је примењен на сваком параметру посебно, као и за комбиноване хидролошке и параметре квалитета воде.

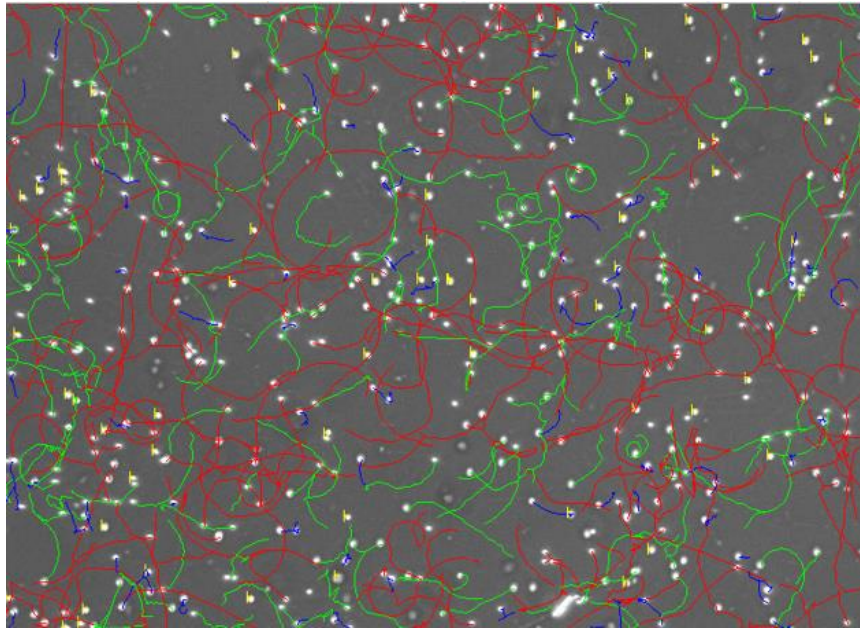
ANOVA и конструисање UPGMA фенограма је урађено у STATISTICA v12 софтверу (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA), док су све остале анализе урађене у MorphoJ v1.06a (Klingenberg, 2011).

3.7. Анализа покретљивости и криопрезервација сперматозоида врсте *B. balcanicus*

Јединке коришћене за експерименте криопрезервације изловљене су на Грошничкој, Борачкој, Петровачкој реци, као и на Јасеници и Осаоници, у јуну 2016. године. Изловљене јединке су аклиматизоване и чуване у акваријумима Центра за рибарство и конзервацију биодиверзитета копнених вода, Природно-математичког факултета у Крагујевцу. За потребе експеримента формиран су акваријуми запремине 160 L, са сталним дотоком кисеоника и температуром воде од 19 до 21°C. Поставка експеримента је прилагођена временском периоду када је природна сезона мреста поточне мрене. На тај начин је омогућена природна продукција гамета и није било потребе за додатном хормонском стимулацијом јединки. Током трајања експеримената рибе нису храњене.

Непосредно пре узорковања гамета, јединке су анестезиране 0,03% раствором уља каранфилића како би биле изложене мањем стресу и како би се спречиле евентуалне повреде (Намацкова *et al.*, 2006). Како би се избегла контаминација узорка урином, фецесом или водом, урогенитална пора мужјака се чисти дестилованом водом, па затим суши папирним убрусом. Нежним притисцима абдоминалне регије млеч се прикупља у претходно обележене шприцеве запремине 2 ml. Да би се спречило формирање гела у узорцима, што је честа појава код ципринидних врста риба, узорци су растворени у глукозном екстендеру (GBE; 40 mM KCl, 30 mM Tris, 200 mM glucose; Horváth *et al.*, 2003; Лујић *et al.*, 2015), коме је додато 20 µg/ml DNase I (Pan-Reac AppliChem A3778). Обележени растворени узорци су чувани на леду до анализе покретљивости свежих сперматозоида и почетка експеримената.

За процену параметара покретљивости сперматозоида коришћен је Интегрисани систем за анализу сперматозоида ISAS (Proiser R+D, S.L., Spain). Као најрелевантнији параметри покретљивости праћени су тотална покретљивост, VCL - криволинијска брзина сперматозоида и LIN - линеарност кретања сперматозоида (Слика 8). Анализирани узорци су стављени на специфичну предметну плочицу, одговарајуће дубине, која поседује свој поклопац (SPERMTRACK-20). Узорци су затим активирани активационим раствором ((45 mM NaCl, 5 mM KCl, 30 mM Tris, pH 8.0; Saad & Billard, 1987) обогаћен са 1% BSA), и анализирани фазно-контрасним објективом Nikon E-200 микроскопа, на увећању 20× и снимани дигиталном камером (XIMEA C13-ON) што је омогућило рад у ISAS софтверу. За потребе анализе параметри покретљивости се снимају пет секунди након активације, и за сваки узорак су рађене по три активације.



Слика 8. Приказ покретљивости сперматозоида поточне мрене у ISAS софтверу, при чему је приказана путања сваке ћелије и различитом бојом означена њена брзина (црвена - брзо покретни, зелена - споро покретни, плава - спори и жута - непокретни)

(фото Н. Којадиновић)

Анализирана је покретљивост сперматозоида код седам популација поточне мрене на локалитетима Грошничка река - изнад језера, Грошничка река - испод језера, Борачка река - изнад бране, Борачка река - испод бране, Петровачка река - доњи ток, Јасеница и Осаоница. Из сваке популације, анализирана је покретљивост сперматозоида код три мужјака, при чему је сваки узорак анализиран три пута како би се грешке приликом извођења процедуре свеле на минимум.

За потребе утврђивања оптималног протокола за конзервацију сперматозоида поточне мрене, урађено је неколико експеримената. Процедура криопрезервације подразумева формирање медијума који садржи екстендер на бази глукозе и криопротектант (метанол - MeOH, диметил сулфоксид - Me₂SO, етилен гликол - EG, пропилен гликол - PG или 2-метоксиетанол - ME) у одређеној концентрацији (5%, 10% или 15%) у зависности од поставке експеримента. Млеч је разблажена у криомедијуму у односу 1:9. Након периода еквилибрације од 15 минута на собној температури, пуњене су криосламке запремине 0,25 ml. Кутија од стиропора напуњена је течним азотом до висине од 10 cm, и затворена је поклопцем на 10 минута како би се испарења стабилизовала. Када се поклопац склони, узорци који су постављени на оквир од стиропора се стављају на површину течног азота. Након одређеног временског периода који је предвиђен експериментом сламке су урођене у течни азот и чуване у канистеру за складиштење до одмрзавања (Слике 9 и 10). Узорци су одмрзавани у воденом купатилу на температури од 40 °C, у трајању од пет секунди. Три додатна мерења покретљивости свежих сперматозоида су урађена као контрола.



Слике 9. и 10. Замрзавање узорка у криосламчицама на испарењима течног азота
(фото Н. Којадиновић)

У сваком експерименту је модификован један од параметара криопрезервације, и процењени су ефекти те модификације на покретљивост сперматозоида. У наредним експериментима коришћени су параметри који су дали најбоље резултате, односно највећу покретљивост сперматозоида.

3.7.1. Експеримент 1. Различити криопротектанти

Тестиран је утицај пет различитих криопротектаната који су најчешће коришћени у овим процедурама код риба: метанол - MeOH, диметил сулфоксид - Me₂SO, етилен гликол - EG, пропилен гликол - PG или 2-метоксиетанол - ME. Концентрација криопротектанта је била 10%. Узорак млечи је помешан са криомедијумом.

3.7.2. Експеримент 2. Концентрација криопротектаната

Два криопротектанта која су дала највећи проценат покретљивости сперматозоида након одмрзавања, Me₂SO и ME, су коришћена у наредним експериментима. Тестиран је ефекат концентрације од 5%, 10% и 15% криопротектаната на покретљивост сперматозоида. Узорци су замрзнути на исти начин као што је већ описано.

3.7.3. Експеримент 3. Различита брзина хлађења

Након што је претходним експериментима утврђено који криопротектант и у којој концентрацији има најбоље резултате (5% Me₂SO), тестирана је брзина хлађења упоређивањем удаљености узорка од површине течног азота. Удаљеност узорка је прилагођена висином рама од стиропора на ком се налазе узорци и износила је 2, 3 и 5 cm. Истовремено је тестиран и утицај времена које узорак проведе на испарењима, пре него што се урони у течни азот. На овај начин тестирано је девет група узорака.

3.7.4. Експеримент 4. Суплементација шећерима

Како би се добио што већи проценат покретљивих сперматозоида након процедуре криопрезервације, тестирана је и могућности обогаћивања криомедијума шећерима, што је у неким случајевима код риба дало позитивне резултате. Испитивано је додавање три различита типа шећера: глукозе - Glu, сахарозе - Suc и трехалозе - Tre, у две концентрације: 0,1 М и 0,3 М. Паралелно је урађена криопрезервација контролне групе, односно узорка у који није додат шећер. Као и у претходном експерименту као криомедијум је коришћен 5% Me₂SO, док је методологија замрзавања и одмрзавања била иста као и у првом и другом експерименту.

3.7.5. Експеримент 5. Суплементација протеинима

Тестиран је ефекат додавања протеина: BSA и FBS у концентрацијама 5% и 10%. Слично претходном експерименту, коришћен је 5% Me₂SO као криопротектант, а као суплемент у криомедијум је додата 0,1 М глукоза. Контролна група је замрзавана без додавања протеина. Методологија замрзавања и одмрзавања је била иста као и у претходним експериментима.

3.7.6. Идентификација субпопулација сперматозоида

За анализу субпопулација сперматозоида, ISAS систем је мерио осам параметара покретљивости за сваки сперматозоид: VCL (криволинијска брзина, $\mu\text{m/s}$), VSL (праволинијска брзина, $\mu\text{m/s}$), VAP (брзина просечне путање), STR (правилност), LIN (линеарност, просечна вредност односа VSL/VCL), WOB (вобулација, однос просечне и криволинијске путање, рачуна се као (VAP/VCL) \times 100), ALH (амплитуда главе) и BCF (унакрсна фреквенција). Подаци за све одабране параметре код покретних сперматозоида добијени евалуацијом свежих и одмрзнутих узорака убачени су у један сет података. Све даље статистичке анализе вршене су на подацима за 3055 сперматозоида.

Анализа главних компоненти урађена је како би се смањио број варијабли, а задржало што више информација из оригиналног скупа података. Број главних компоненти изабраних за хијерархијско груписање изабран је према Каисеровом критеријуму (одабиром само главних компоненти са својственим вредностима већим од један, Vázquez *et al.*, 2015). Након тога је урађена кластер анализа, која групише јединице посматрања у групе (субпопулације), тако да се сличне јединице нађу у истој групи. Појединачни сперматозоиди додељени су специфичним субпопулацијама на основу Еуклидових дистанци, где су сперматозоиди груписани у субпопулације на основу сличности параметара покретљивости.

3.7.7. Статистичке методе

Подаци о процентуалној покретљивости преведени су у аркус синус (\arcsin), док су параметри за брзину преведени у природни логаритам (\ln), пре даље статистичке анализе. Током оптимизације протокола, упоређивање параметара у

сваком експерименту урађено је једнофакторском анализом варијанси (ANOVA), праћеном Tukey's HSD тестом (енг. Honestly Significant Difference), осим у трећем експерименту где је коришћена двофакторска ANOVA (удаљеност од површине течног азота и време хлађења). За поређење свежих и одмрзнутих субпопулација сперматозоида коришћен је χ^2 тест. Све статистичке анализе урађене су у софтверу STATISTICA v12 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

3.8. Статистичке методе обраде података

Анализа главних компонената (*Principal Component Analysis*, PCA) коришћена је како би се графички представио однос између анализираних локалитета и њихових вредности структуре популација, срединских варијабли и покретљивости сперматозоида. Ова анализа је најчешће примењивана мултиваријантна метода, чији је циљ груписање испитиваних узорака према сличности (Ristivojević, 2014). Матрица података која је коришћена као улаз за PCA методу садржала је девет срединских параметара: температуру воде (t), pH, електропроводљивост ($\mu\text{S}/\text{cm}^3$), тврдоћу воде (mg/l), концентрацију O_2 (mg/l), сатурацију O_2 (%), ширину речног корита (m), дубину речног корита (m) и брзину протока (m/s). Улазна матрица садржала је и податке који се односе на структуру популација: абунданцу (N/km), биомасу (kg/km), средњу дужину - Lsr (cm) и средњу тежину тела - Wsr (g), реалну продукцију (kg/km), потенцијалну продукцију (kg/km), коефицијент b, кондициони фактор, као и вредности покретљивости сперматозоида за сваки истраживани локалитет.

3.9. Процена ризика изумирања и приоритета конзервације истраживаних популација применом модификованог модела ESHIPPO-ILSFP - RP

Процена ризика изумирања и одређивање приоритета конзервације популација на националном и локалном нивоу урађена је применом модификованог модела ESHIPPO (Simić *et al.*, 2014). Коришћена је верзија модела за процену одрживости популација комерцијалних врста риба која укључује Индекс локалне одрживости рибљих популација (ILSFP). Модел је додатно прилагођен за мале популације које насељавају осетљива станишта, са тенденцијом природног и антропогеног нарушавања. Код таквих популација и минималне промене у репродукцији могу да одреде негативан тренд даљег стања и одржања. Из тог разлога је моделу ESHIPPO додат елемент који се односи на репродуктивни потенцијал (RP).

Модел ESHIPPO се заснива на квантитативном мерењу елемената модела као што је еколошка специјализација врсте (ES) у односу на: станиште, исхрану, репродуктивну стратегију, величину тела, ниво ендемизма и угрожавајућих фактора диверзитета дефинисани акронимом »HIPPO«, који је изведен из почетних слова следећих речи: **H** - habitat alteration (измене/промене станишта), **I** - invasive species (инвазивне врсте), **P** - pollution (загађење), **P** - population growth (раст хумане популације), **O** - over-exploitation (прекомерена експлоатација) (Brennan & Withgott, 2005).

Индекс локалне одрживости екосистема се заснива на развоју специфичних адаптивних карактеристика локалних популација риба, које настају као резултат прилагођавања карактеристичним условима станишта (Schnell *et al.*, 2013). Израчунавање ILSFP се заснива на параметрима који дефинишу индикаторе рибљег фонда у односу на основну структурну јединицу ES. Систем бодовања 5 - 3 - 1 се користи за квантификацију локација ILSFP:

$$\text{ILSFP} = 5 \sum (d + f + bm + fsm\% + sh\% + nAge + Lmean) + \sum (epa\% + ppa\%) > 38$$

$$\text{ILSFP} = 3 \sum (d + f + bm + fsm\% + sh\% + nAge + Lmean) + \sum (epa\% + ppa\%) 24-38$$

$$\text{ILSFP} = 1 \sum (d + f + bm + fsm\% + sh\% + nAge + Lmean) + \sum (epa\% + ppa\%) < 24$$

(Скраћенице објашњене у Табели 2).

Анализирани елементи основног модела и њихова квантификација приказани су у Табели 2 и 3, док су критеријуми коришћени у анализи репродуктивног потенцијала, као квантификација сваког појединачног параметра представљени у Табели 4.

$$\text{ESHIPPO} - \text{ILSFP} - \text{RP} = \Sigma(\text{ES} + \text{HIPPO} + \text{ILSFP} + \text{RP})$$

Степен приоритета заштите 3 карактерише малу вероватноћу изумирања популација на националном нивоу. Степен приоритета заштите 2 карактерише умерену вероватноћу изумирања популација на националном нивоу. Ове врсте се морају суцесивно истраживати како би се предузеле мере заштите уколико то буде потребно. Степен приоритета заштите 1 указује да врста има приоритет у заштити и да је потребно одмах предузети адекватне мере заштите на националном нивоу. Степен приоритета заштите 0 означава да је изумирање врсте у њеном природном станишту у току и да је један од могућих начина њеног очувања примена *ex-situ* заштите (Табела 5).

Табела 2. Протокол ESHIPPO модела са параметрима за процену Еколошке специјализације (ES) и Индекса локалне одрживости популација (ILSFP), преузето и прилагођено према Simić *et al.* (2014).

Елементи ES	Ознака	Индикатор ознака*	Бодови ES	Елементи ILSFP	Индикатор ознака**	Вредност ILSFP	Број бодова
Станиште (Habitat)	H	h1, h2, h3, h4, h5	1 - (h)(d)(rs); ниско специјализован, толерантан, еуривалент (еуритоп) за све или > 3 индик. h. (d): d1. (rs): rs1.1, rs2.1, rs3.1, rs3.2, rs4.3, rs5.1, rs6.1 (lc): lc1.1, lc1.3, lc2.1, lc3.1, lc3.4, lc4.1, lc4.4, lc6.2. (bs): bs1.1. (re): re1.	Станиште (Habitat)	Доминантност (d)	d > 10%	1
						d 2 - 9.99%	3
Исхрана (Diet)	D	d1, d2, d3	3 - (h)(d)(rs); умерено специјализован, осетљив. Стеновалент (умерен) за 1 - 3 индик. h. (d): d2; (rs): rs1.1, rs2.2, rs3.3, rs4.2, rs5.2, rs6.2, rs7.2, (lc): lc1.2, lc2.2, lc3.2, lc3.5, lc4.2, lc4.5; (bs): bs1.2; (re): re2.	Исхрана (Diet)	Биомаса (bm)	Rасте	1
						Стагнира	3
Репродуктивни систем (Reproduction strategy)	Rs	rs1, rs2, rs3, rs4, rs5, rs6	5 - (h)(d)(rs); високо специјализован. Стеновалент (стенотоп) за све или > 3 индик. h. (d): d3, (rs): rs1.3, rs2.3, rs4.1, rs5.3, rs6.3; (lc): lc1.3, lc3.3, lc3.6, lc4.3, lc4.6, lc6.1; (bs): bs1.3; (re): re3.	Репродуктивна стратегија (Reproduction strategy)	*Процент репродуктивно активних женки (fsm%)	> 30	1
						10 - 29.9	3
Животни циклус (Life cycle)	Lc	lc1, lc2, lc3, lc4		Животни циклус (Life cycle)	Број класа (nAge)	< 10	5
						> 1	1
Величина тела (Body size)	Bs	bs1		Величина тела (Body size)	Просечна дужина рибе (Lmean)	= 1	3
						< 1	5
Ниво ендемизма и изолација популација / статус угрожености IUCN (Range endemic)	Re	re1, re2		Ниво ендемизма	Процент популација у заштићеном подручју(ра), (ера%) (pp%)	> 3	1
						2 - 3	3
				Статус угрожености IUCN		< 2	5
						> 70	1
						50 - 70	3
						< 20, није ендемит	5
						> 70	1
						50 - 70	3
						< 20	5

***(h)**: h1) дистрибуција по екорегиионима; h2) надморска висина: < 200, 200 - 500, 500 - 800, 800 - 1500 и > 1500; h2.1) тип екосистема и еколошка зона: текуће воде: еукренон, хипокренон, епиритрон, метаритрон, хипоритрон, епипотамон, метапотамон, хипопотамон, стајаће воде: литорал, сублиторал,

профундал, баре, мочваре, ефемерне воде и друго; h3) морфометријски параметри водених екосистема: дубина (m), карактер дна (%); h4) физички и хемијски параметри: температура (°C), брзина воде, електропроводљивост, кисеоник (mg/l, %), pH, тврдоћа воде (dH), BPK₅ (mg/l), h5) квалитет воде: Посебне прилагођености или осетљивост на одређене хемијске, токсичне или радиоактивне материје. Навести карактеристике: трофичност - олиготрофне, мезотрофне, еутрофне, дистрофне. Сапробност - ксеносапробне, олигосапробне, бетамезосапробне, алфамезосапробне и полисапробне. **d**): d1) еурифаг-омниватор; d2) еурифаг-хербивор, карниватор, специфичан тип исхране, специфичне морфометријске адаптације на исхрану; d3) стенофаг, специфичне прилагођености за исхрану или монофаг. **(rs)**: rs1) репродукција - није специфичан тип репродукције (ововивипарни, изолована јаја, цементирана изолована јаја, полажу јаја на вегетацију или неки супстрат, rs1.1) специфичан тип репродукције, rs1.2) строго специфичан тип репродукције, rs1.3), rs2), време репродукције и фреквентност: rs2.1) флексибилне или мултиволтине, rs2.2) триволтине, биволтине, rs2.3) семиволтине или униволтине; rs3) трајање периода емергенције и/(године): дуг > 3 месеца rs3.1) 1 - 3 месеца rs3.2), кратак rs3.3), rs4) појава у великом броју (rs4.1), да, ретко (rs4.2), да, сваке године (rs4.3), rs5) акватичне фазе: адулт (rs5.1), ларва (rs5.2), јаје (rs5.3), rs6) стадијум трајања ларве/циклус развића ларве > 2 године/целе године (rs6.1), 1-2 године/2-3(rs6.2), један циклус (rs6.3). **bs**): величина тела (cm): < 0.5 (bs1.1), 0.6-3(bs1.2), > 3(bs1.3). **re**) re1) није ендем и није угрожен, re2) ендем за један екорегиион, рањив, re3) стеноендем за релативно мале или веома мале територије (један екосистем, један биотоп), и изоловане популације угрожене и критично угрожене. **lc**) lc1) животни циклус (година), (lc1.1) < 1, (lc1.2) приближно 1, (lc1.3) > 1, (lc2.1) покретљивост/тип кретање - веома покретне/пливање, (lc2.2) умерено покретни/пливање, lc3) социјални живот, (lc3.1) солитарни, (lc3.2) формирају периодичне агрегације, (lc3.3) живе у заједници, (lc3.4) ван територије, (lc3.5) понекад територијалне, (lc3.6) трајно територијалне, lc4) брига о потомству, (lc4.1) не постоји, (lc4.2) чувају јаја и ларве, (lc4.3) брига о јувенилима, (lc4.4) нема сексуалног диморфизма, (lc4.5) сексуални диморфизам током репродукције, (lc4.6) присутан сексуални диморфизам.

** d, f, bm, fsm%, sh%, nAge, Lmean - током последњих 10 година.

Табела 3. Протокол „НПРО“ фактора: елементи и систем бодовања елемената

Промена станишта			
Вредност	Промене (без фрагментације)	Деструкције	Фрагментација и изолација
1	Тешко применљиво, неке промене су настале вероватно услед природних/антропогених утицаја (дивља природа и/или незаштићена)	Тешко применљиво, неке промене су настале вероватно услед природних/антропогених утицаја (заштићено подручје)	Не постоји и веома су мале шансе да ће се догодити у скоријој будућности (заштићено подручје)
3	Могуће, разлог је услед природног деловања или антропогеним утицајем (предвиђене или планиране активности у скоријој будућности)	Могуће, разлог природне промене или антропогени утицај (ако су планиране активности указале на то или су предвиђене промене могуће)	Процеси који се дешавају под антропогеним утицајем, још увек нису завршени, али не поштује се принцип комуникације између популација
5	Врло вероватно, пре свега због антропогеног утицаја или антропогени утицај који већ постоји и траје	Врло вероватно, пре свега због планираног антропогеног утицаја и/или ако је већ примећена осетљивост екосистема	Већ постоји и немогућа је било каква комуникација између популација
Инвазивне врсте			
Вредност	Већ уношене раније	Повремено уношење нових врста	Намерно уношење нових врста
1	Нема ефекта	Вероватно не	Вероватно понекад
3	Могуће последице	Могуће да постоји	Планирано је
5	Велике последице	Већ уношене, ефекти и даље трају	Већ уношене, ефекти и даље трају
Загађење			

Вредност	Еутрофизација	Органско загађење	Токсично загађење	Радиоактивно загађење	Ацидификација	Мешано загађење
1			Могућност настанка			
3			Вероватни феномен или/и умерени ефекти			
5			Присутни негативни ефекти			
Раст популације						
Вредност						
1			Без суштинских промена и могућности опадања (у свим биотопима где је врста евидентирана)			
3			Лаган (умерен) раст на макар једном биотопу где врста живи или у биотопима где је популација витална			
5			Убрзан раст на макар једном биотопу где врста живи или у биотопима где је популација од виталног значаја			
Прекомерна експлоатација						
Вредност						
		Антропогена			Природна	
1		Не занимају се за тренутну експлоатацију и неће се изводити			Немају индексе или су веома мали	
3		Заинтересованост за експлоатацију, али се још увек не дешава или се дешава без контроле			Могућа је због повећања броја предатора, или појаве канибализма, или болести, или фармског такмичења	
5		Заинтересованост за експлоатацију и дешава се без контроле			Већ присутан негативни ефекат предатора или канибализма или болести или фармског такмичења	

Табела 4. Елементи коришћени у анализи репродуктивног потенцијала фрагментисаних популација

Елементи/ бодови	5	3	1
однос полова	> 1:3	1:2 - 1:3	< 1:2
број узрасних класа	< 2	2	> 2
% репродуктивно активних женки	< 10%	10 - 29.9%	> 30%
% покретљивости сперматозоида	< 40%	40 - 60%	> 60%
Старосна и популациона структура	доминација старих, пост репродуктивних јединки, опадање популација	старосне групе приближно уједначене, популација стагнира или споро расте	доминација младих, пре репродуктивних јединки, популација расте

Табела 5. Бодовна скала за одређивање степена ризика од изумирања и приоритета заштите угрожених врста према модификованом моделу ESHIPPO

Број бодова				
Еколошка специјализација (ES)	< 10	11 - 20	21 - 30	> 30
Ниво еколошке специјализације	мали	умерен	истакнут	веома истакнут
Индекс локалне одрживости популација (ILSFP)	< 20	20 - 40	40 - 60	> 60
Ниво вредности индекса локалне одрживости популација	мали	умерен	истакнут	веома истакнут
Утицај HIPPO фактора	< 20	21 - 35	36 - 50	50 - 60
Ниво утицаја фактора	мали	умерен	истакнут	веома истакнут
Репродуктивни потенцијал	< 10	11 - 15	16 - 20	> 20
Ниво утицаја репродуктивног потенцијала	мали	умерен	истакнут	веома истакнут
Укупан број бодова (ES + ILSFP + HIPPO + RP)	< 70	70 - 85	85 - 90	> 100
Ниво ризика од изумирања	мали	умерен	висок	веома висок
	3	2	1	0

4.Резултати

На истраживаним локалитетима, у току две године праћени су параметри квалитета воде: температура ($^{\circ}\text{C}$), рН, електропроводљивост ($\mu\text{S}/\text{cm}^3$), тврдоћа воде (mg/l), концентрација O_2 (mg/l), сатурација O_2 (%) и основни хидролошки параметри: ширина речног корита (m), дубина речног корита (m) и брзина протока воде (m/s) (Табела 6). Највише вредности брзине протока воде констатоване су у горњим токовима Грошничке реке и Борачке реке, док је најмања брзина протока била на Грошничкој реци - испод језера, Петровачкој реци у доњем току и реци Јасеници. Највећа ширина и дубина речног тока констатоване су на рекама Јасеници и Осаоници.

Најниже температуре воде забележене су на Борачкој реци, на оба локалитета. Варирања рН вредности је у опсегу од 8,34 до 8,82, и овај параметар је прилично уједначен на свим локалитетима. Електропроводљивост је имала високе вредности на локалитетима на Петровачкој реци и на Грошничкој реци - испод језера. Ове вредности су у складу са вишим вредностима тврдоће воде која је констатована на истим локалитетима. Најнижа вредност концентрације O_2 била је на Грошничкој реци испод језера. Нешто више вредности забележене су на рекама Јасеници, Осаоници и на Петровачкој реци у доњем току. Највиша вредност концентрације O_2 била је на Грошничкој реци у горњем току. Концентрација кисеоника кретала се у опсегу од 80,5% до 104,1%, колико је забележено на Грошничкој реци у горњем току.

Табела 6. Хидролошки параметри, параметри квалитета воде и географске координате за истраживане локалитете.
Средње вредности \pm стандардна девијација

Параметри	Јединице	Грошничка река горњи ток	Грошничка река изнад језера	Грошничка река испод језера	Борачка река изнад броне	Борачка река испод броне	Петровачка река горњи ток	Петровачка река доњи ток	Јасеница	Осаоница
<i>Хидролошки параметри</i>										
Ширина речног корита	m	2,3	2,7	3,2	2,1	2,2	2,3	3,1	3,2	3,3
Дубина речног корита	m	0,5	0,7	0,7	0,4	0,7	0,7	0,8	1,1	0,9
Брзина протока	m/s	0,9	0,8	0,7	0,9	0,8	0,8	0,7	0,7	0,8
<i>Параметри квалитета воде</i>										
T	°C	17,15 \pm 2,65	19,07 \pm 2,64	17,25 \pm 1,23	14,12 \pm 0,29	15,27 \pm 0,49	17,75 \pm 2,08	17,9 \pm 1,98	18,01 \pm 2,11	17,85 \pm 1,95
pH	-	8,38 \pm 0,07	8,79 \pm 0,13	8,65 \pm 0,17	8,54 \pm 0,63	8,45 \pm 0,52	8,69 \pm 0,41	8,82 \pm 0,23	8,34 \pm 0,23	8,52 \pm 0,43
Електропроводљивост	$\mu\text{S}/\text{cm}^3$	399 \pm 16,14	348 \pm 11,87	714,5 \pm 78,87	137,6 \pm 26,21	143 \pm 23,73	746 \pm 44,88	974 \pm 14,42	412 \pm 2,32	387 \pm 16,11
Тврдоћа воде	mg/l	201 \pm 15,55	172,33 \pm 8,73	341,25 \pm 50,64	69 \pm 5,44	67 \pm 4,96	357,33 \pm 31,03	407 \pm 58,83	289 \pm 8,21	302 \pm 12,43
Концентрација O ₂	mg/l	9,44 \pm 0,77	7,87 \pm 0,21	6,705 \pm 1,09	8,46 \pm 0,19	8,93 \pm 0,28	8,977 \pm 0,24	7,53 \pm 0,49	7,78 \pm 6,87	7,23 \pm 7,92
Сатурација O ₂	%	104,1 \pm 15,39	93,56 \pm 2,86	82,57 \pm 15,17	96,76 \pm 2,26	95,5 \pm 0,86	96,46 \pm 6,05	80,5 \pm 8,63	86 \pm 3,45	83 \pm 4,87
<i>Географске координате</i>										
N	-	43.897051	43.917350	43.959483	43.960894	43.961393	44.088957	44.052649	44.27451	44.06327
E	-	20.913093	20.897309	20.875088	20.583605	20.592229	20.802140	20.881309	20.85638	21.130505

4.1. Структура популација врсте *B. balcanicus*

Анализирана је структура девет популација поточне мрене у односу на абунданцу, биомасу, средњу дужину, средњу тежину, узрастну структуру, темпо раста, полну структуру, потенцијалну продукцију и реалну продукцију. Локалитети на којима се уочавају високе вредности абунданце су Грошничка река - испод језера, Борачка река - испод бране, Јасеница и Осаоница. На овим локалитетима абунданца је износила изнад 500/km. На локалитетима који се налазе у фрагментисаним екосистемима, изнад великих баријера и у Петровачкој реци забележене су знатно ниже вредности абунданце. Највиша вредност биомасе констатована је на реци Осаоници, што је у складу са резултатима абунданце. Најниже вредности биомасе су на Петровачкој реци, на оба локалитета, и на Грошничкој реци, у горњем фрагментисаном току.

Највише вредности средње дужине (L_{sr}) и средње тежине тела (W_{sr}) констатоване су на локалитетима Јасеница и Осаоница. На Петровачкој реци у горњем току забележена је најнижа вредност средње дужине тела, а у Грошничкој реци, на локалитету изнад језера најнижа вредност средње тежине тела.

На локалитетима Грошничке реке - испод језера, Борачкој реци - испод бране и изнад бране, Јасеници и Осаоници констатоване су узрастне класе од 0+ до 5+. У Грошничкој реци - испод језера и Борачкој реци - испод бране процентуално доминира узрастна категорија 2+ (41,38%; 42,31%). Ова узрастна класа најзаступљенија је и на локалитету Грошничке реке у горњем току, а у анализираном узорку није било јединки узрастних категорија 0+ и 5+. Слична ситуација је и на горњем току Петровачке реке где недостају узрастне категорије 0+ и 5+, док су равномерно распоређене категорије 3+ и 4+, као и категорије 1+ и 2+, које су и најзаступљеније. На локалитету Грошничке реке изнад језера, недостаје узрастна категорија 5+, а доминантно је процентуално учешће категорије 3+. На локалитету Борачке реке изнад бране у узорку нису пронађене јединке узрастне категорије 0+, а најзаступљенија категорија је 3+. Ово се разликује од локалитета испод бране на истој реци, где су најзаступљеније узрастне категорије 2+ и 1+. На свим истраживаним локалитетима, највеће процентуално учешће имају узрастне категорије 2+ и 3+.

Резултати анализе полне структуре популација поточне мрене указују да од девет истраживаних локалитета, на пет су бројније женке а на четири мужјаци. Најбољи резултати су констатовани на Јасеници и на Петровачкој реци у доњем току, где су женке у незнатној мери бројније (43:57; 45:55). Мужјаци су процентуално бројнији на локалитетима Грошничке реке у горњем току, Борачке реке изнад бране и на Осаоници. На Петровачкој реци, у горњем току, мужјаци су више од два пута бројнији од женки, док је иста ситуација само у корист женки констатована на Борачкој реци испод бране. Највећа разлика у процентуалном односу мужјака и женки забележена је на локалитету Грошничке реке испод језера, где су женке биле четири пута бројније у односу на мужјаке.

Анализа је показала да су вредности потенцијалне продукције на свим локалитетима знатно веће у односу на вредности реалне продукције. Најниже вредности реалне продукције, испод килограма по километру речног тока забележене су на оба локалитета Петровачке реке. Ниске вредности реалне продукције констатоване су и на локалитетима Грошничке реке изнад језера (1,65

kg/km и 1,37 kg/km). Највише вредности и реалне и потенцијалне продукције забележене су на рекама Јасеници и Осаоници. Најниже вредности потенцијалне продукције констатоване су на локалитетима Борачке реке.

Табела 7. Параметри структуре популација поточне мрене на истраживаним локалитетима (абунданца, биомаса, Lsr, Wsr, узрасна структура, полна структура, реална продукција и потенцијална продукција)

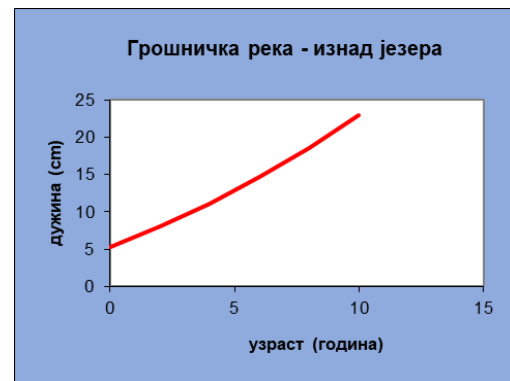
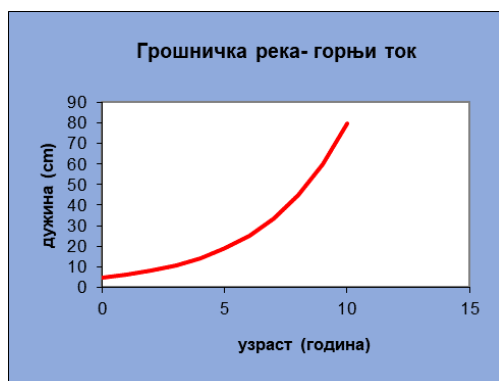
Локалитети	Абунданца (N/km)	Биомаса (kg/km)	Lsr ± SD (cm)	Wsr ± SD (cm)	Узрасна структура%						Полна структура (М:Ж %)	Реална продукциј а (kg/km)	Потенцијалн а продукција (kg/km)
					0+	1+	2+	3+	4+	5+			
Грошничка река - горњи ток	240	2,6	9,9 ± 3,09	10,83 ± 8,64	-	8,33	41,67	33,33	16,67	-	63:37	1,65	16,1
Грошничка река - изнад језера	420	3,78	9,26 ± 1,43	9,02 ± 3,73	4,76	9,52	19,05	47,61	19,05	-	37:63	1,37	18,9
Грошничка река - испод језера	580	5,65	9,29 ± 2,21	9,74 ± 6,35	6,89	6,89	41,38	27,59	13,79	3,45	20:80	3,05	22,4
Борачка река - изнад бране	444	5,72	9,29 ± 2,63	12,67 ± 11,44	-	22,73	13,64	31,82	27,27	4,55	67:33	3,33	14,7
Борачка река - испод бране	520	6,59	10,38 ± 3,37	17,65 ± 17,47	7,69	23,08	42,31	11,54	7,69	7,69	27:73	4,21	15,4
Петровачка река - горњи ток	320	2,35	8,99 ± 3,7	7,38 ± 8 21	-	31,25	31,25	18,75	18,75	-	77:33	0,97	16,1
Петровачка река - доњи ток	220	1,92	9,55 ± 1,87	9,44 ± 6,21	9,09	18,18	18,18	27,27	27,27	-	45:55	0,86	21,7
Јасеница	600	7,55	10,05 ± 3,43	12,59 ± 13,91	10	20	23,33	33,34	20	10	43:57	4,66	27,2
Осаоница	660	11,65	10,36 ± 2,79	17,65 ± 16,69	6,06	24,24	18,18	36,36	9,09	3,03	63:37	6,78	25,6

SD - стандардна девијација

Дужински раст јединки поточне мрене на истраживаним локалитетима анализиран је на основу измерених (емпиријских) вредности дужина тела, затим на основу повратно израчунатих (теоријских) вредности дужина тела помоћу von Bertalanffy-ијевог модела раста (Слике 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 и 19). Коефицијент раста (К) показује којом брзином рибе достижу највећу дужину коју могу имати у популацији (L_{∞}). Највиша вредност за L_{∞} забележена је за реку Јасеницу, а након ње за Борачку реку - изнад бране. Највише вредности коефицијента раста К су на Грошничкој реци, на локалитетима у горњем току и испод језера, као и на локалитетима у горњим токовима Борачке и Петровачке реке.

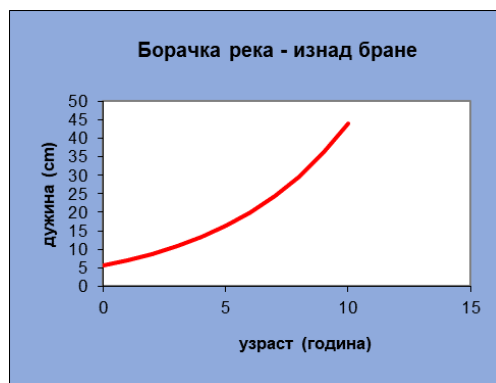
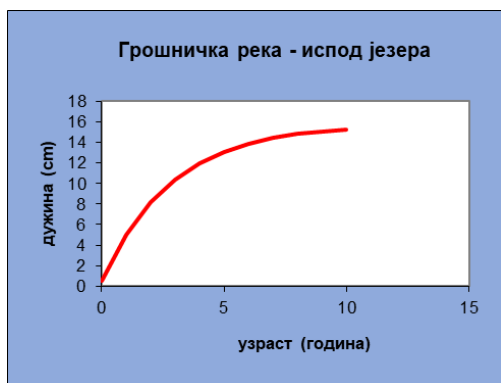
Табела 8. Вредност von Bertalanffy-ијеве једначине за поточну мрену на истраживаним локалитетима

Локалитет	Вредност von Bertalanffy-ијеве једначине
Грошничка река - горњи ток	$L_t = 12.906 (1 - e^{-0.285(t + 0,114)})$
Грошничка река - изнад језера	$L_t = 17.055 (1 - e^{-0.058(t + 4,601)})$
Грошничка река - испод језера	$L_t = 15.714 (1 - e^{-0.349(t + 0,103)})$
Борачка река - изнад бране	$L_t = 24.103 (1 - e^{-0.212(t + 0,034)})$
Борачка река - испод бране	$L_t = 13.34 (1 - e^{-0.019(t + 1,181)})$
Петровачка река - горњи ток	$L_t = 11.967 (1 - e^{-0.215(t + 0,391)})$
Петровачка река - доњи ток	$L_t = 12.671 (1 - e^{-0.163(t + 0,928)})$
Јасеница	$L_t = 43.793 (1 - e^{-0.061(t + 0,981)})$
Осаоница	$L_t = 11.365 (1 - e^{-0.094(t + 4,095)})$

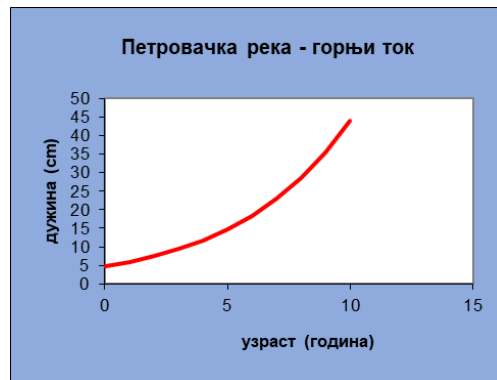


Слика 11. и 12. Графички приказ дужинског раста поточне мрене на локалитетима

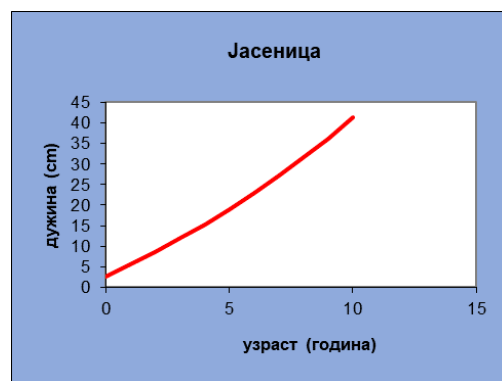
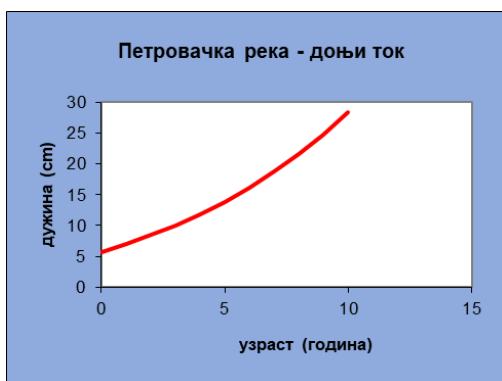
Грошничка река - горњи ток и Грошничка река - изнад језера



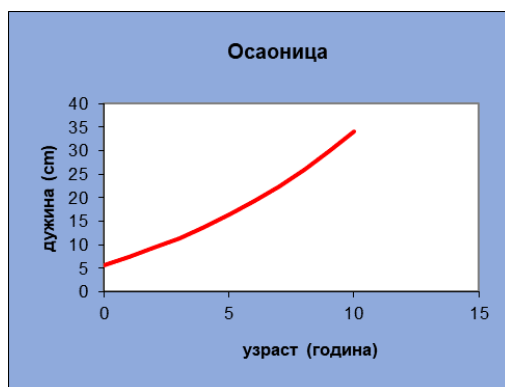
Слика 13. и 14. Графички приказ дужинског раста поточне мрене на локалитетима Грошничка река - испод језера и Борачка река - изнад бране



Слика 15. и 16. Графички приказ дужинског раста поточне мрене на локалитетима Борачка река - испод бране и Петровачка река - горњи ток



Слика 17. и 18. Графички приказ дужинског раста поточне мрене на локалитетима Петровачка река - доњи ток и Јасеница



Слика 19. Графички приказ дужинског раста поточне мрене на реци Осаоници

4.2. Дужинско - тежински однос и кондициони фактор врсте *B. balcanicus*

Дужинско-тежински односи и кондициони фактор израчунати су за укупно 887 јединки, са девет локалитета. У Табели 4 приказане су географске координате сваког локалитета на коме је узорковано, број јединки у узорку, минимална и максимална дужина јединки забележена у узорку и параметри дужинско - тежинских односа и кондиционог фактора. На локалитетима Грошничке реке, који се налазе узводно изнад језера констатован је негативни алометријски раст, односно коефицијент регресије је $b < 3$. Тенденција негативног алометријског раста се примећује и на локалитету изнад бране на Борачкој реци, као и на оба локалитета Петровачке реке. Позитивни алометријски раст, који је по вредности коефицијента b најприближнији изометријском расту, констатован је на локалитету Грошничке реке испод језера. На истом локалитету је измерена и јединка са максималном тоталном дужином тела ($\max TL = 19,8$ cm). Позитиван изометријски раст је забележен и на Осаоници, Јасеници и на локалитету испод бране Борачке реке.

Просечна вредност кондиционог фактора на истраживаним локалитетима кретала се од $0,835 \pm 0,186$ до $1,143 \pm 0,265$. На четири локалитета су констатоване вредности које су незнатно веће од 1 (Грошничка река горњи ток и испод језера, Борачка река испод бране и Осаоница). На осталим локалитетима вредност коефицијента кондиције је нижа од 1, а најнижа вредност је констатована на локалитетима на доњем току Петровачке реке и на Јасеници.

Табела 9. Дескриптивна статистика и параметри дужинско-тежинских односа и фактора кондиције за поточну мрену на истраживаним локалитетима

Локалитет	n	minTL	maxTL	a	b	SEb	r ²	K	SEK
Грошничка река - горњи ток	51	3,5	15,5	0,011	2,932	0,142	0,947	1,008	0,257
Грошничка река - изнад језера	176	4,1	16,5	0,012	2,916	0,060	0,965	0,979	0,224
Грошничка река - испод језера	123	3,8	19,8	0,009	3,032	0,062	0,976	1,028	0,262
Борачка река - изнад бране	77	3,9	16,5	0,013	2,868	0,057	0,986	0,959	0,156
Борачка река - испод бране	93	5,2	19,4	0,009	3,028	0,073	0,974	1,009	0,222
Петровачка река - горњи ток	53	4,2	16,6	0,015	2,786	0,124	0,953	0,949	0,161
Петровачка река - доњи ток	28	3,7	17,6	0,020	2,635	0,122	0,973	0,883	0,112
Осаоница	59	6,2	17,2	0,005	3,307	0,125	0,962	1,143	0,263
Јасеница	60	5	18,4	0,006	3,146	0,050	0,993	0,863	0,989

* n - број јединки; minTL - минимална тотална дужина; maxTL - максимална тотална дужина; a - константа; b - коефицијент регресије; r² - коефицијент детерминације; SEb - стандардна грешка; K - кондициони фактор; SEK - стандардна грешка

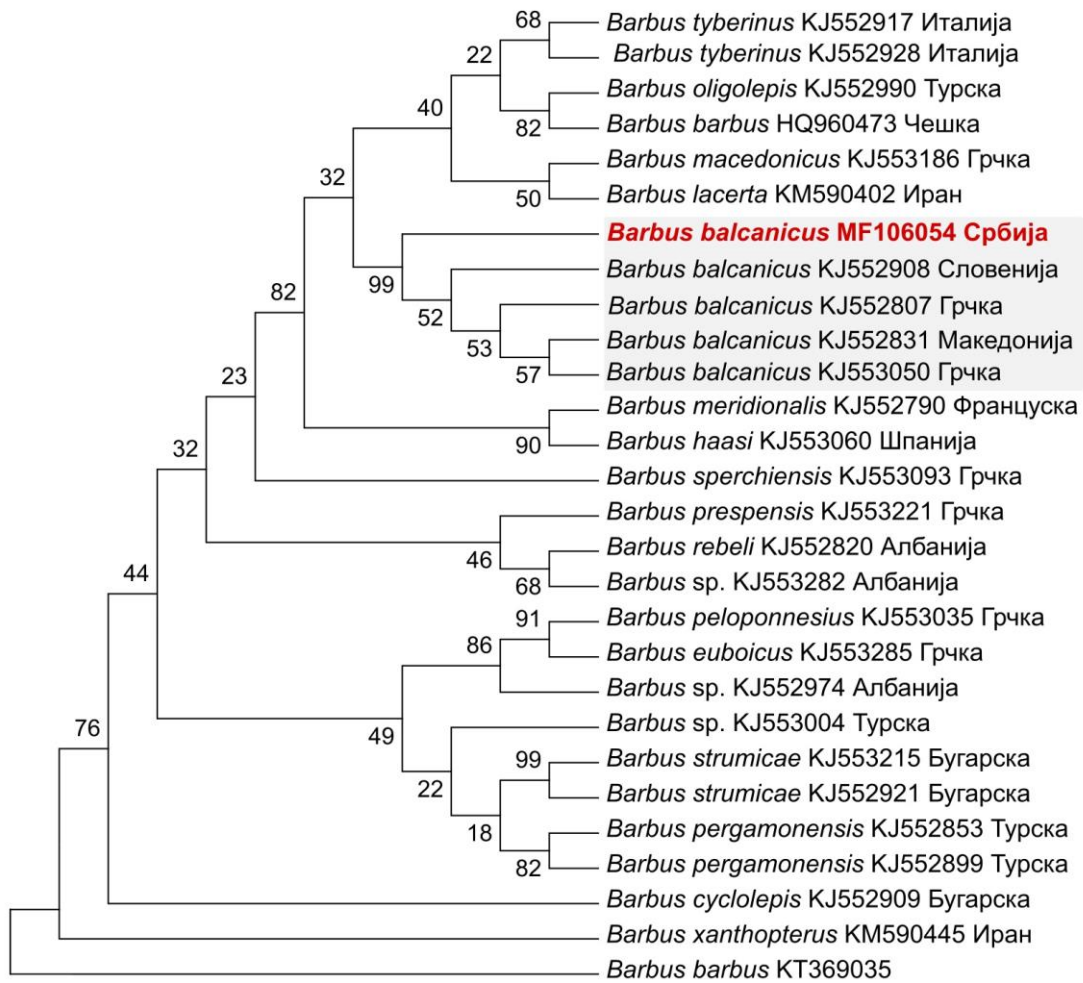
4.3. Генетичка карактеризација

На основу анализе секвенци *COI* гена мтДНК потврђено је да популације обухваћене истраживањем припадају врсти *B. balcanicus*. Укупно је анализирано 20 узорака са четири локалитета: Грошничка река - изнад језера - 7; Борачка река - 7; Петровачка река - 4; Јасеница - 2. Дужина секвенци је износила од 387 до 396 базних парова и детектован је само један хаплотип **Ex65F1** заведен у Банци гена под присућним бројем MF106054.

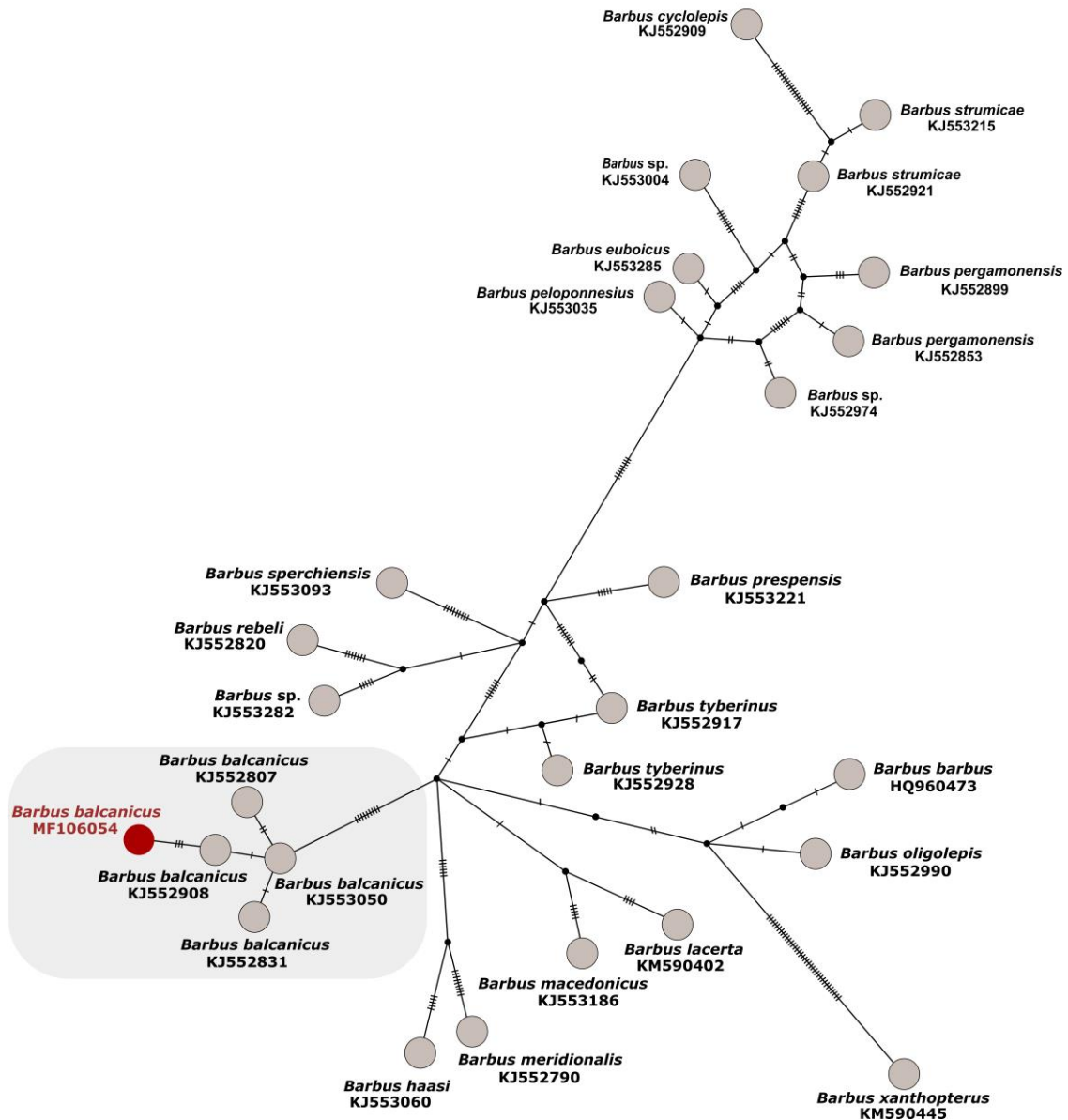
Конструисано је филогенетско стабло (Слика 20) на основу секвенци *COI* гена мтДНК врста рода *Barbus* методом максималне веродостојности (енг. Maximum Likelihood - ML). На стаблу се јасно уочава груписање хаплотипова врсте *B. balcanicus* детектованих у земљама Балканског полуострва. У тој групи налази се хаплотип из ове дисертације заједно са хаплотипом из слива реке Соче у Словенији, хаплотипом из слива реке Вардар у Македонији и два хаплотипа забележена у сливу реке Алиакмон у Грчкој. Висока вредност *bootstrap* подршке (99%) за балканску групу потврђује генетичку карактеризацију анализираних узорака.

Мрежа хаплотипова (енг. TCS network) конструисана од секвенци *COI* гена мтДНК илуструје односе између хаплотипа детектованог у овој дисертацији и других хаплотипова врста рода *Barbus*. Мрежа указује на јасно раздвајање хаплотипова (Слика 21). Број мутацијских корака представљен је цртицама на спојним линијама између хаплотипова. Хаплотип детектован у овој дисертацији јасно је груписан са преостала четири хаплотипа врсте *B. balcanicus*, који су констатовани у земљама Балканског полуострва. Исти хаплотипови који чине ову групу, издвојили су се у посебну целину и на филогенетском стаблу. Најсроднији хаплотипу **Ex65F1** је хаплотип забележен у реци Сочи, у Словенији (KJ552908). Број мутационих корака забележен између њих је три. Између хаплотипа **Ex65F1** и хаплотипа под приступним бројем KJ553050 са територије Грчке, било је четири мутациона корака. Пет мутационих корака је констатовано између хаплотипа **Ex65F1** и хаплотипа под приступним бројем KJ552831 из Македоније, док је удаљеност од хаплотипа Грчке под приступним бројем KJ552807 шест мутационих корака.

На мрежи хаплотипова уочава се велики број мутационих корака између група које припадају различитим врстама рода *Barbus*.



Слика 20. Филогенетско стабло хаплотипова врста рода *Barbus*. Стабло је конструисано од секвенци *COI* гена мтДНК методом максималне веродостојности (енг. Maximum Likelihood - ML) у програму MEGA7. Бројеви на чворовима представљају процентуалне вредности појаве приказане топологије на основу 1000 понављања. Сивом бојом означени су хаплотипови врсте *B. balcanicus* са подручја Балканског полуострва. Хаплотип детектован у дисертацији обојен је црвено. За сваки хаплотип на стаблу је приказан латински назив врсте, приступни број из NCBI базе и земља у којој је детектован. Као „outgroup“ укључена је секвенца *Barbus barbatus* заведена у Банци гена под приступним бројем KT369035.



Слика 21. Мрежа (енг. TCS network) конструисана на основу секвенци *COI* гена врста рода *Barbus*. Број мутацијских корака је представљен цртицама на спојним линијама између хаплотипова. Црни кругови представљају теоријски недостајуће или изумрле хаплотипове. Сивом бојом означени су хаплотипови врсте *B. balcanicus* са подручја Балканског полуострва. Хаплотип детектован у овој дисертацији означен је црвеном бојом. За сваки од хаплотипова на мрежи приказан је латински назив врсте и приступни број из NCBI базе.

4.4. Геометријска морфометрија

Применом методе геометријске морфометрије анализиран је утицај пола и локалитета на величину (изражен кроз величину центроида) и облик целог тела риба. Величина центроида (CS) је коришћена као зависна варијабла, а популација, пол и интеракција оба (популација x пол) као независне варијабле. Двофакторском анализом варијанси (ANOVA) утврђене су статистички значајне разлике између величине тела мужјака и женки, као и одсуство значајних ефеката локалитета и интеракције пола и локалитета на варијабилност величине (Табела 10). Иста анализа показала је да на варијабилност облика тела статистички значајан ефекат имају пол и локалитети, као и интеракција оба (Табела 11).

Табела 10. Двофакторска анализа варијанси (ANOVA) величине центроида (CS) (SS - сума квадрата, df - степени слободе, MS - варијанса, F - F вредности, p - статистичка значајност). Анализа варијабилности величине тела.

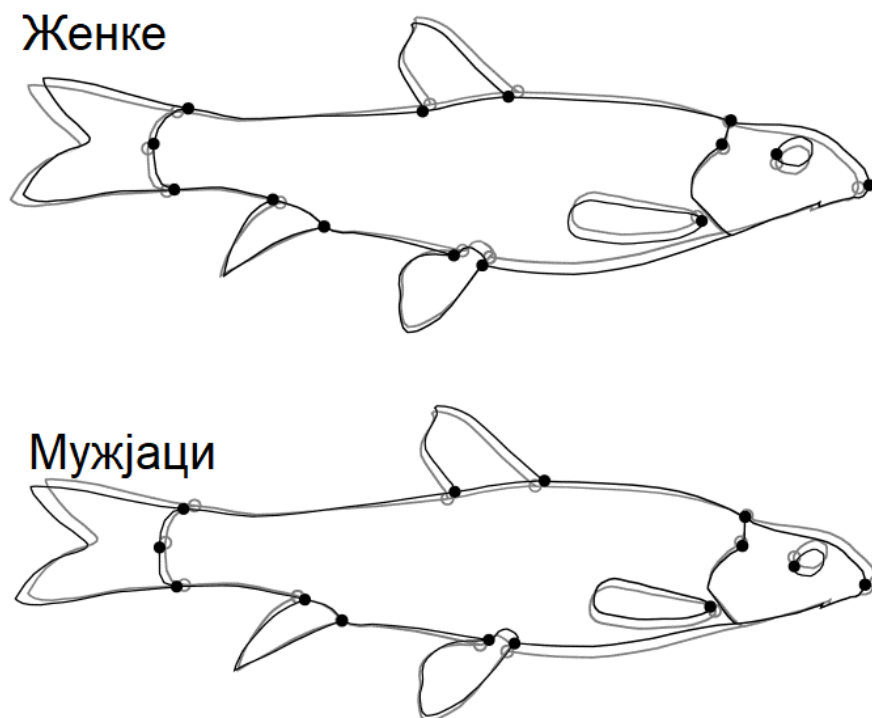
	SS	df	MS	F	p
Пол	1	2	174	52,8	0,001
Локалитет	6	7	174	0,32	0,32
пол x локалитет	6	7	174	1,6	0,15

Табела 11. Двофакторска анализа варијанси (ANOVA) величине центроида (CS) (SS - сума квадрата, df - степени слободе, MS - варијанса, F - F вредности, p - статистичка значајност). Анализа варијабилности облика тела.

	SS	df	MS	F	p
Пол	24	2	151	5	0,001
Локалитет	144	2	89	6	0,001
пол x локалитет	144	7	89	1	0,01

Мултиваријантна регресија показала је да је утицај локалитета на варијабилност облика тела највећи са 7,50% од укупне варијансе ($p < 0,001$). У односу на укупну варијабилност облика, варијабилност условљена величином описује 1,22%. Међутим, регресија није била статистички значајна након пермутационог теста ($p = 0,07$), што указује да алометрија није утицала на облик тела. Због тога је урађена накнадна анализа опште варијабилности облика. Као што је већ наведено, пол је имао значајан утицај на величину тела риба, при чему су женке генерално веће од мужјака. Пол је имао статистички значајан утицај и на варијабилност општег облика тела. Мултиваријантна регресија је указала да пол утиче са 2,16% ($p = 0,01$) од укупне варијабилности облика.

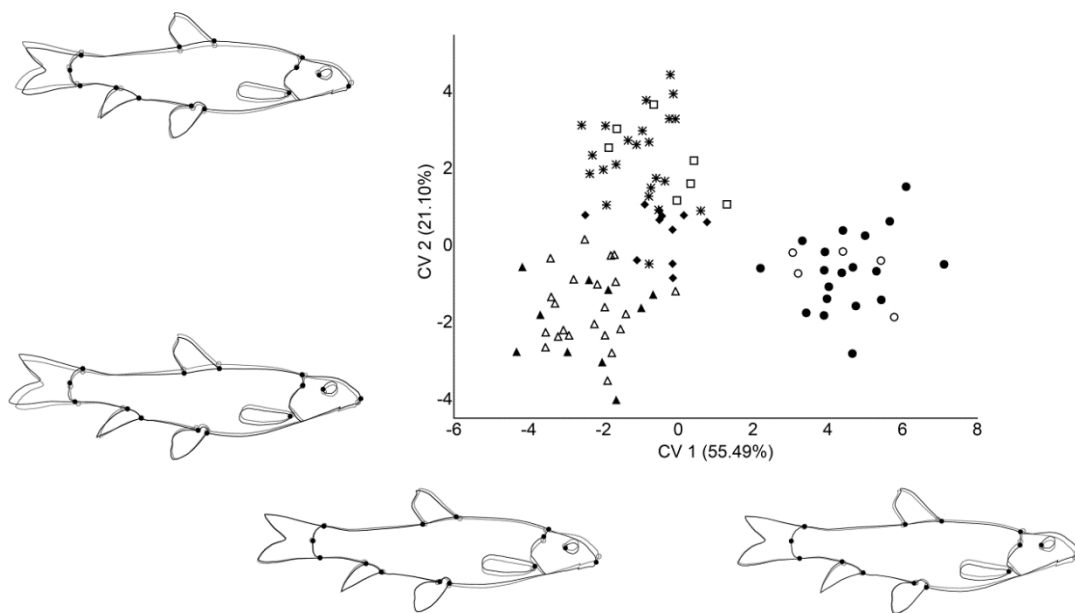
Након локалних прилагођавања, пол је имао утицај на варијабилност тоталног облика тела са 1,89% од укупне варијабилности ($p = 0,017$). Једнофакторска анализа варијанси (ANOVA) је показала да је то статистички значајно за локално прилагођени облик ($F_{(24, 163)} = 6, p < 0.001$). Морфолошка карактеристика која највише утиче на разлике у облику тела између мужјака и женки је висина тела, при чему женке имају виша тела, као и знатно већи главени регион. Леђно и трбушно пераје код мужјака су постављени више антериорно. Код женки је растојање између леђног пераја и горње основе репног пераја краће у односу на мужјаке, и репна дршка је краћа. Мужјаке карактерише и ужа основа трбушног и аналног пераја (Слика 22). На основу ових резултата све накнадне анализе су рађене одвојено за полове.



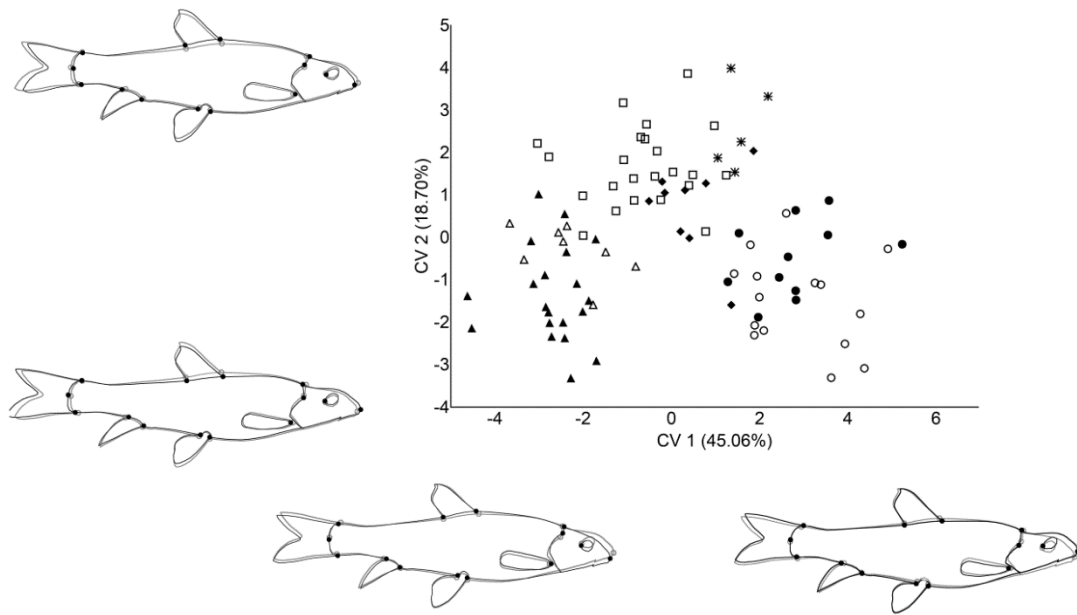
Слика 22. Оквирни дијаграм визуализације промена облика тела између женки и мужјака *B. balcanicus*. Сиве линије приказују консензусни облик, док црне линије приказују одступање од консензуса.

Статистички значајан ефекат на варијабилност облика тела има фактор локалитета, и код женки износи $F_{(144, 399)} = 5$ ($p < 0.01$), а код мужјака $F_{(144, 364)} = 4$ ($p < 0.01$). Применом канонијске анализе варијансе (CVA) издвојене су канонијске осе које највише доприносе раздвајању анализираних популација. Положај јединки у односу на прву (CV1) и другу (CV2) канонијску осу, заједно са променама облика тела који су представљени у виду TPS деформација дуж ових оса, приказани су одвојено за женке на Слици 23 и за мужјаке на Слици 24. Код женки CV1 оса описује 55,49% разлика између анализираних популација, док оса CV2 описује 21,10% разлика. Прва канонијска оса (CV1) описује највећи проценат разлика и код мужјака 45,06%, док је за осу CV2 вредност нешто ниже и описује 18,70% разлика.

Слична раздвајања анализираних популација су примећена код оба пола. На оба дијаграма уочене су три главне групе: 1) Борачка река изнад и испод бране; 2) оба локалитета на Петровачкој реци и локалитет на Грошничкој реци испод језера и 3) оба локалитета на Грошничкој реци изнад језера. И женке и мужјаке из последње групе одликује високо постављен врх њушке и леђно пераје постављено више антериорно. Јединке из Борачке реке се од осталих разликују по нижој висини тела и спуштенијом главом. Насупрот њима, јединке са Петровачке реке и локалитета Грошничке реке испод језера имају виша тела, краћу репну дршку и леђно пераје померено више постериорно.

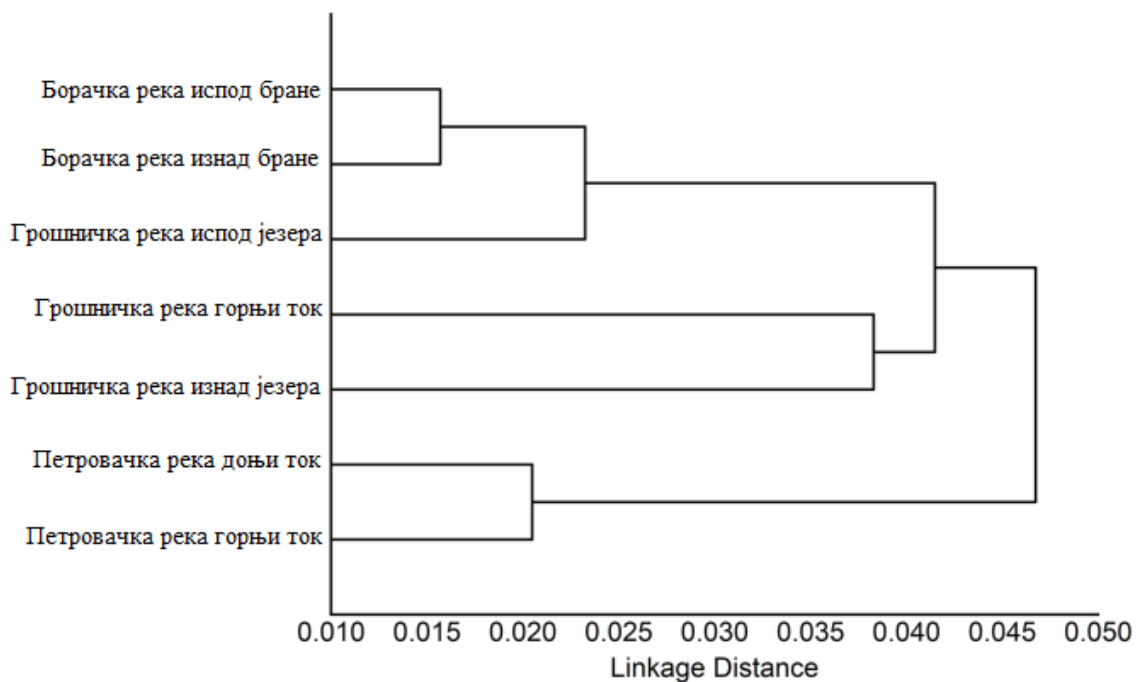


Слика 23. Канонијска анализа варијансе (CVA) варијабилности облика тела популација женки по CV1 и CV2 оси. Локалитети: Борачка река изнад бране (▲), Грошничка река изнад језера (●), Петровачка река горњи ток (□), Борачка река испод бране (Δ), Грошничка река испод језера (*), Петровачка река доњи ток (◆), Грошничка река горњи ток (○). Варијабилност облика је представљена оквирним дијаграмом где сиве линије приказују консензусни облик, док црне линије приказују варијације у односу на консензус дуж канонијских оса.

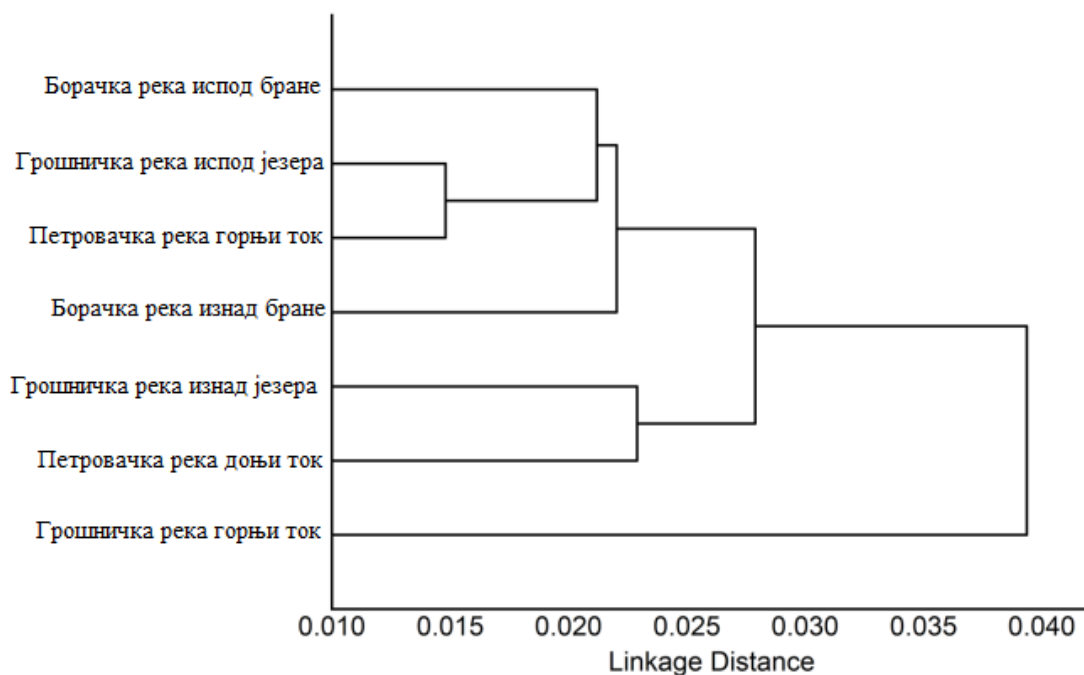


Слика 24. Канонијска анализа варијансе (CVA) варијабилности облика тела популација мужјака по CV1 и CV2 оси. Локалитети: Борачка река изнад бране (▲), Грошничка река изнад језера (●), Петровачка река горњи ток (□), Борачка река испод бране (△), Грошничка река испод језера (*), Петровачка река доњи ток (◆), Грошничка река горњи ток (○). Варијабилност облика је представљена оквирним дијаграмом где сиве линије приказују консензусни облик, док црне линије приказују варијације у односу на консензус дуж канонијских оса.

Применом UPGMA кластер анализе на основу матрице Махаланобисових дистанци, формиран је дијаграм (Слика 25 и 26). Из дијаграма се уочава да се издвајају три групе код женки на основу облика тела: 1) Борачка река изнад и испод бране и Грошничка река испод језера; 2) горњи ток Грошничке реке и Грошничка река изнад језера и 3) горњи и доњи ток Петровачке реке. Три групе су издвојене и код мужјака: 1) Грошничка река испод језера, горњи ток Петровачке реке и Борачка река изнад и испод бране; 2) Грошничка река изнад језера и доњи ток Петровачке реке и 3) Грошничка река горњи ток.



Слика 25. UPGMA дијаграм за седам популација *B. balcanicus* за женке



Слика 26. UPGMA дијаграм за седам популација *B. balcanicus* за мужјаке

Заједнице риба на истраживаним локалитетима се нису одликовале великом разноврсношћу врста и све су из породице Cyprinidae. На оба локалитета Петровачке реке је забележено присуство гавчице (*Rhodeus sericeus* Pallas, 1776) и

кркуше (*Gobio gobio* Linnaeus, 1758). Кркуша је пронађена и у Грошничкој реци испод језера у заједници са поточном мреном и бркицом (*Barbatula barbatula* Linnaeus, 1758). У горњем току Грошничке реке није забележено присуство других врста сем поточне мрене, док су на локалитету изнад језера ловљене и јединке бркице. На Борачкој реци је констатовано присуство пијора (*Phoxinus phoxinus* Linnaeus, 1758), на оба локалитета, док је бркица пронађена само на локалитету испод бране.

4.4.1. Утицај фрагментације станишта на морфолошку варијабилност врсте *B. balcanicus*

Резултати Mentel теста показују да ниједан од тестираних хидролошких параметара и параметара квалитета воде (Табела 6) није имао статистички значајан ефекат на морфолошку варијабилност популација мужјака и женки (Табела 12). Tukey's HSD тест није показао статистички значајне разлике између параметара квалитета воде на различитим локалитетима ($p > 0.05$). Географска дистанца између локалитета није имала статистички значајан ефекат на основу Mentel теста.

Табела 12. Резултати Mentel теста урађеног за сваки параметар посебно, као и за комбиноване хидролошке параметре квалитета воде и за географске дистанце.

Особина	Женке		Мужјаци	
	Махаланобисове дистанца	Прокрустове дистанце	Махаланобисове дистанца	Прокрустове дистанце
<i>Хидролошки параметри (ХП)</i>				
Ширина речног корита	0,916	0,923	0,151	0,563
Дубина речног корита	0,542	0,776	0,697	0,554
Брзина протока	0,820	0,921	0,379	0,815
ХП комбиновано	0,933	0,978	0,151	0,632
<i>Параметри квалитета воде (ПКВ)</i>				
температура				
рН	0,389	0,661	0,509	0,365
Електропроводљивост	0,330	0,180	0,515	0,589
Тврдоћа воде	0,240	0,124	0,235	0,560
Концентрација O ₂	0,741	0,906	0,141	0,774
Сатурација O ₂	0,678	0,827	0,408	0,721
ПКВ комбиновано	0,325	0,170	0,487	0,586
<i>Географска дистанца</i>				
	0,069	0,094	0,166	0,183

*р вредности су наведене у табели

4.5. Анализа покретљивости и криопрезервација сперматозоида врсте *B. balcanicus*

Параметри покретљивости сперматозоида поточне мрене су генерално на свим изабраним локалитетима имали високе вредности (Табела 13). Највеће вредности тоталне покретљивости имале су анализирани хелије са реке Осаонице и оне су коришћене за експерименте стандардизације протокола за криопрезервацију. Најниже вредности тоталне покретљивости су забележене на Петровачкој реци и на Грошничкој реци испод језера. Вредности параметра криволинијске брзине (VCL) су биле прилично уједначене на свим локалитетима, док је вредност параметра која се односи на линеарност (LIN) била виша на локалитетима Борачка река - изнад бране и Грошничка река - испод језера.

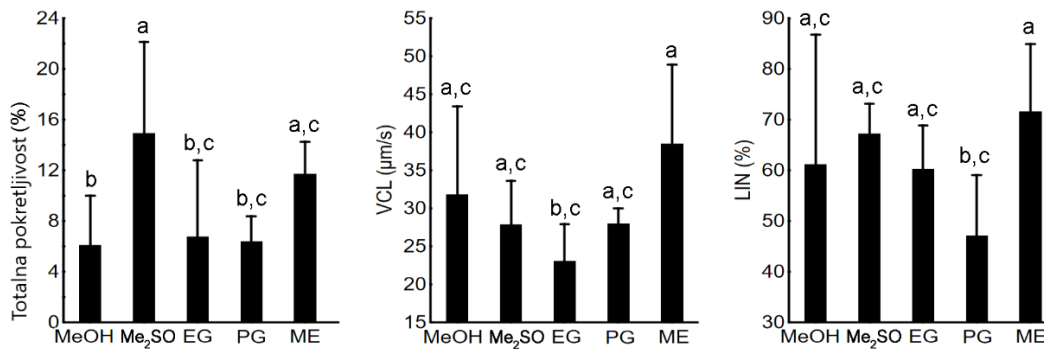
Табела 13. Параметри покретљивости сперматозоида на изабраним локалитетима

	Тотална покретљивост	VCL	LIN
Грошничка река - изнад језера	67,46 ± 21,21	69,68 ± 26,47	71,29 ± 5,61
Грошничка река - испод језера	59,66 ± 25,52	86,58 ± 25,15	80,47 ± 7,01
Борачка река - изнад бране	68,61 ± 11,00	76,13 ± 10,61	80,41 ± 5,48
Борачка река - испод бране	62,32 ± 17,13	66,47 ± 19,45	72,66 ± 20,47
Петровачка река	55,82 ± 24,22	88,48 ± 30,69	77,41 ± 8,21
Река Јасеница	72,31 ± 12,83	82,24 ± 20,73	68,87 ± 6,51
Река Осаоница	88,72 ± 6,85	83,72 ± 17,96	71,67 ± 9,44

4.5.1. Експеримент 1. Различити криопротектанти

Криопрезервација утиче на смањење покретљивости сперматозоида у односу на свеж узорак (81,34 ± 3,40). Утицај различитих криопротектаната на покретљивост сперматозоида је био статистички значајан ($F_{(4,40)} = 6.44, p < 0.001$). Узорци који су били замрзнути са Me₂SO и ME су показали знатно већи проценат укупне

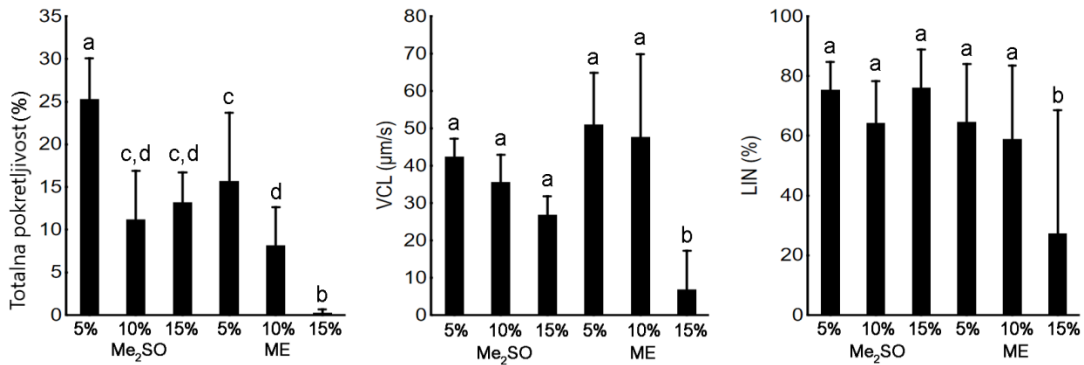
покретљивости (Слика 27; Tukey's HSD тест $p < 0.05$) и задржали су приближно 18%, односно 14% покретљивости у поређењу са свежим узорцима. Није било значајне разлике између ова два криопротектанта, тако да су оба укључена у наредне експерименте. Примећене су значајно ниже вредности параметра VCL у криопрезервираним узорцима у односу на свеже ($111,80 \pm 14,64$), док код вредности параметра LIN није било великих промена ($61,24 \pm 1,48$). Једнофакторска ANOVA је показала статистички значајне разлике које су последица процеса криопрезервације ($p < 0.05$), међутим Tukey's HSD тест није показао значајне разлике између група.



Слика 27. Ефекат метанола (MeOH), диметил сулфоксида (Me₂SO), етилен гликола (EG), пропилен гликола (PG) и 2-метоксиетанола (ME) на параметре покретљивости сперматозоида након одмрзавања. Све вредности су представљене као средња вредност ± стандардна девијација (SD). Различита слова изнад трака које означавају SD показују статистичку значајност. Вредности које не деле иста слова, значајно се разликују (Tukey's HSD, $p < 0,05$).

4.5.2. Експеримент 2. Концентрација криопротектаната

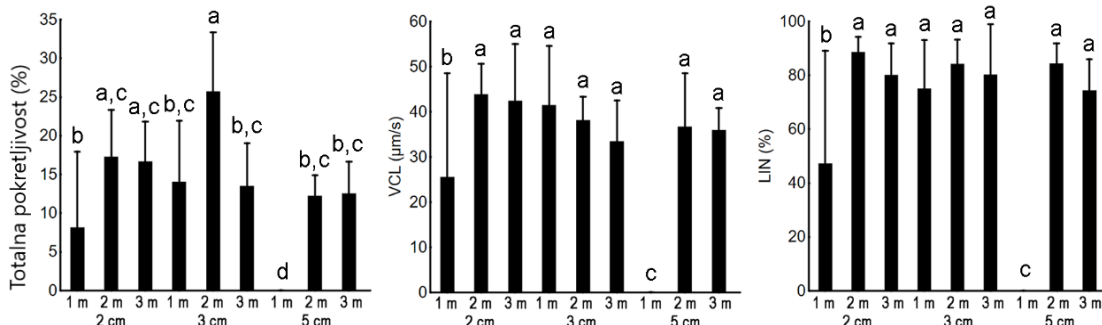
Поређењем ефеката три различите концентрације Me₂SO и ME на покретљивост сперматозоида након одмрзавања, најбољи резултати добијени су са 5% концентрацијама у случају оба криопротектанта. Узорци који су замрзнути са 5% Me₂SO имали су знатно већу покретљивост у поређењу са осталим групама (Слика 28; Tukey's HSD тест $p < 0.05$), и задржали су 32% покретљивости у односу на свежи узорак ($79,33 \pm 8,39$). Лошији резултати су били у групи где су се узорци замрзавали са 15% ME ($0,27 \pm 0,4$). Због добрих резултата 5% Me₂SO је коришћен у наредним експериментима. Варирања вредности параметара VCL и LIN између група су значајна само код група са нижим средњим вредностима (Tukey's HSD, $p < 0,05$).



Слика 28. Ефекат различитих концентрација (5, 10 и 15%) диметил сулфоксида (Me₂SO) и 2-метоксиетанола (ME) на параметре покретљивости сперматозоида након одмрзавања. Све вредности су представљене као средња вредност ± стандардна девијација (SD). Различита слова изнад трака које означавају SD показују статистичку значајност. Вредности које не деле иста слова, значајно се разликују (Tukey's HSD, $p < 0,05$).

4.5.3. Експеримент 3. Различита брзина хлађења

Оба параметра која утичу на брзину хлађења имају статистички значајан ефекат на покретљивост одмрзнутих сперматозоида. Удаљеност узорка од површине течног азота $F(2, 72) = 25,35$ ($p < 0,001$) за време хлађења $F(2, 72) = 43,93$ ($p < 0,001$). Висина рама од 3 cm и време хлађења од 2 минута су дали највећу покретљивост сперматозоида након примене криопрезервације ($25,71 \pm 7,63$). Са овом методологијом брзине хлађења очувано је 34% покретљивости сперматозоида у односу на свеже узорке ($75,5 \pm 8,15$). Није било статистички значајне разлике између група хлађених на 3 cm висине и 2 минута, односно 3 минута хлађења (Слика 29; Tukey's HSD тест, $p > 0,05$). Сличне ефекте, удаљеност узорка од површине азота и дужина хлађења имају и на вредности параметара VCL и LIN, али нису примећене значајне разлике између испитиваних група (Tukey's HSD тест, $p > 0,05$). На основу ових резултата за даље експерименте је коришћена висина рама од 3 cm и време хлађења 2 минута.

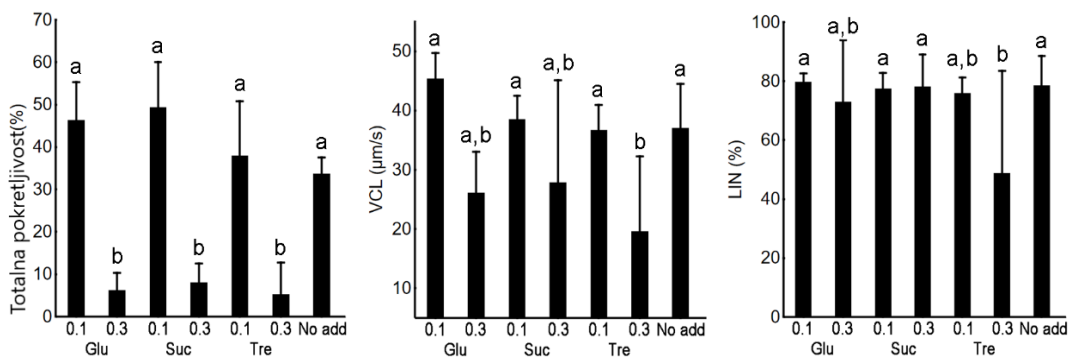


Слика 29. Ефекат висине рама од стиропора (2, 3 и 5 cm) и времена хлађења (1, 2 и 3 min) на испарењима течног азота на параметре покретљивости сперматозоида након одмрзавања. Све вредности су представљене као средња вредност ± стандардна девијација (SD). Различита слова изнад трака које означавају SD показују

статистичку значајност. Вредности које не деле иста слова, значајно се разликују (Tukey's HSD, $p < 0,05$).

4.5.4. Експеримент 4. Суплементација шећерима

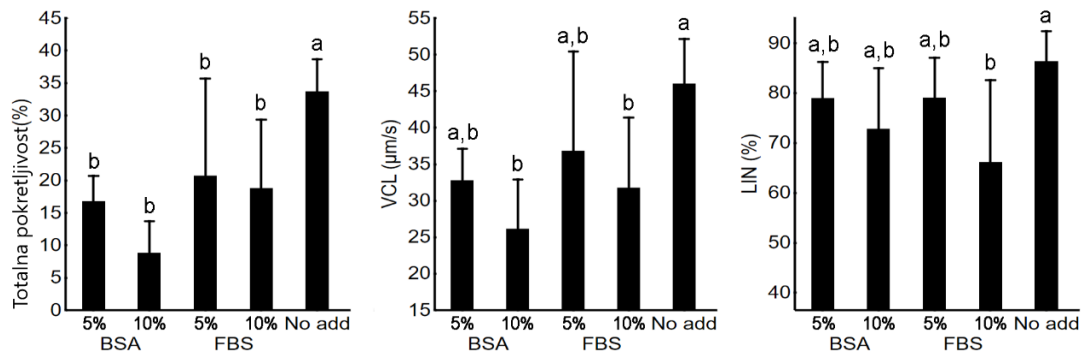
Резултати показују да додавање шећера у криомедијум у концентрацији 0,1 М доводи до повећања покретљивости сперматозоида, док концентрација од 0,3 М доводи до значајне редукције покретљивости одмрзнутих сперматозоида (Слика 30; Tukey's HSD, $p < 0,01$). Иако повећање није било статистички значајно, додавање 0,1 М глукозе и 0,1 М сахарозе утицало је на опоравак анализираних ћелија. Контролна група која је замрзавана без шећера је имала очувано 36% покретљивости свежих сперматозоида, док је тај проценат био знатно већи након суплементације шећерима: 49% за 0,1 М глукозу и 53% за 0,1 М сахарозу. Слични резултати су добијени и за вредност параметра VCL, док су вредности за параметар LIN биле уједначене и без значајних разлика. Сви параметри су показали да је ефекат 0,3 М трехалозе негативно утицао на параметре покретљивости сперматозоида након замрзавања ($5,28 \pm 7,51$). За наредне експерименте у криомедијум је као суплемент додата 0,1 М глукоза, зато што се она већ налазила у формулацији криомедијума (нови криомедијум је назван 0,3 ГБЕ).



Слика 30. Ефекат додатне суплементације шећерима (0,1 и 0,3 М глукозе - Glu, сахарозе - Suc и трехалозе - Tre) на параметре покретљивости сперматозоида након одмрзавања. Све вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна девијација (SD). Различита слова изнад трака које означавају SD показују статистичку значајност. Вредности које не деле иста слова, значајно се разликују (Tukey's HSD, $p < 0,05$).

4.5.5. Експеримент 5. Суплементација протеинима

Супротно суплементацији шећерима, суплементација протеинима је негативно утицала на покретљивост одмрзнутих сперматозоида у свим експерименталним групама ($F(4, 40) = 7,59$, $p < 0,001$). Контролна група у коју нису додати протеини имала је највећу покретљивост након одмрзавања ($93,5 \pm 5,17$) и имала је највећи проценат очуване покретљивости свежег узорка 40% (Слика 31; Tukey's HSD, $p < 0,01$). Слични резултати су забележени и у случају вредности параметра VCL, док за параметар LIN није било значајних разлика између узорка суплементираних протеинима и контролног узорка.



Слика 31. Ефекат суплементације протеинима (5 и 10% BSA и FBS) на параметре покретљивости сперматозоида након одмрзавања. Све вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна девијација (SD). Различита слова изнад трака које означавају SD показују статистичку значајност. Вредности које не деле иста слова, значајно се разликују (Tukey's HSD, $p < 0,05$).

4.5.6. Субпопулациона структура

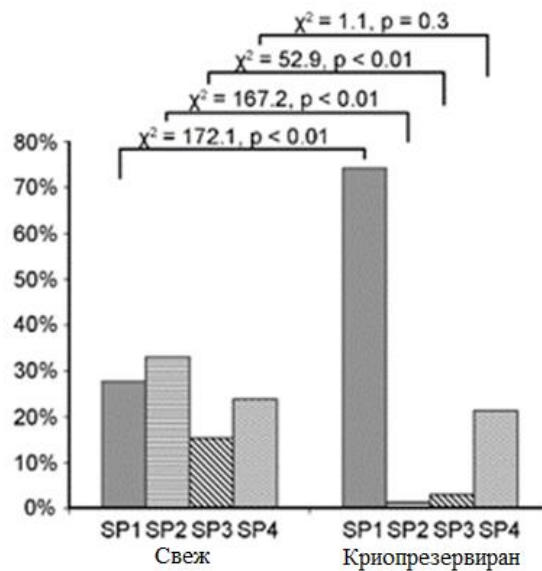
Покретни сперматозоиди хијерархијски су груписани на основу параметара покретљивости у четири субпопулације (СП) (Табела 14). Субпопулације се могу разликовати и класификовати на основу два главна параметра покретљивости: криволинијске брзине VCL и линеарности LIN. Прва субпопулација (СП1) дефинисана је ниским вредностима параметара који се односе на брзину (VCL, VSL, VAP), али високом укупном линеарношћу, чинећи ове сперматозоиде спорим линеарним. Другу субпопулацију (СП2) чине брзи нелинеарни сперматозоиди који се одликују високим вредностима брзине, а ниским вредностима за линеарност. Брзи линеарни сперматозоиди карактеришу трећу субпопулацију (СП3), са високим вредностима брзине и линеарности. Четврта субпопулација (СП4) групише споре нелинеарне сперматозоиде, који су имали ниске вредности и параметра брзине и линеарности.

Табела 14. Вредности параметара покретљивости добијених у ISAS систему за све субпопулације. Узорак је анализиран у свежем и одмрзнутом стању након криопрезервирања, а вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна девијација (SD)

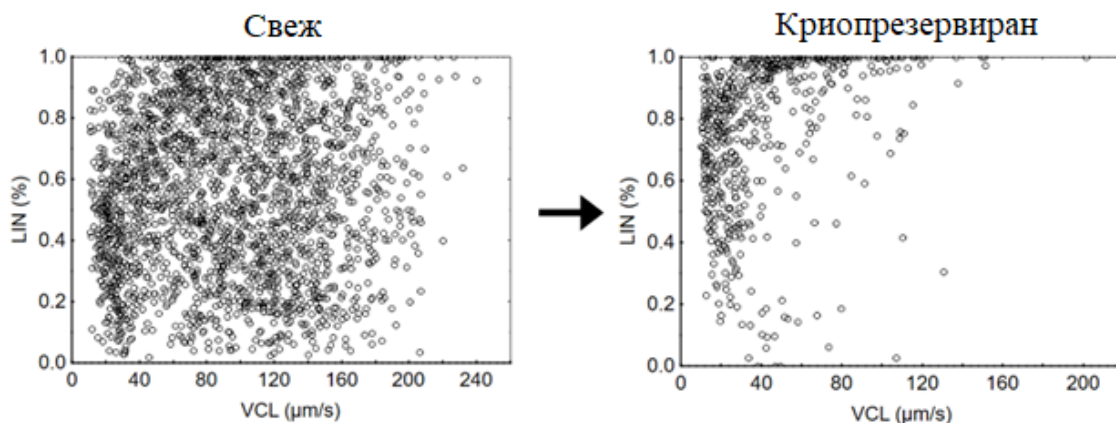
	СП1		СП2		СП3		СП4	
	Свеж узорак	Одмрзнути узорак	Свеж узорак	Одмрзнути узорак	Свеж узорак	Одмрзнути узорак	Свеж узорак	Одмрзнути узорак
VCL	66,6 \pm 27,5	41,6 \pm 25,7	124,2 \pm 33,5	86,3 \pm 23,6	147,2 \pm 27,2	130,8 \pm 23,2	42,5 \pm 22,3	26,6 \pm 10,9
VSL	56,8 \pm 27,1	38,0 \pm 26,3	49,5 \pm 25,2	44,1 \pm 82	126,3 \pm 33,6	130,6 \pm 29,0	14,1 \pm 8,8	9,0 \pm 4 3
VAP	60,8 \pm 26,6	39,3 \pm 25,7	100 0 \pm 29,5	79 1 \pm 24,2	137,0 \pm 26,4	128,1 \pm 18,4	29,3 \pm 7,9	17,4 \pm 11,8
LIN	0,8 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1	0,4 \pm 0,2	0,5 \pm 0,1	0,8 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0,4 \pm 0,2
STR	0,9 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1	0,5 \pm 0,2	0,6 \pm 0,2	0,9 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1	0,5 \pm 0,2	0,6 \pm 0,3
AHL	1,5 \pm 0,5	1,1 \pm 0,3	3,4 \pm 1,0	2,0 \pm 0,3	2,5 \pm 0,8	1,6 \pm 0,5	1,8 \pm 0,7	1,4 \pm 0,6
BCF	6,4 \pm 2,6	5,6 \pm 2,9	4,5 \pm 2,6	4,3 \pm 1,6	6,5 \pm 2,8	7,9 \pm 2,4	4,0 \pm 2,2	3,4 \pm 2,3

* VCL - криволинијска брзина; VSL - праволинијска раздаљина; VAP - брзина просечне путање; LIN - линеарност; STR - правилност путање; AHL - амплитуда главе сперматозоида; BCF - унакрсна фреквенција покрета бича сперматозоида

Када је у питању свеж узорак млечи, највећи удео са 33% имала је СП2, док је СП3 коју карактерише брзо линеарно кретање имала најмањи удео од 15% у укупном броју ћелија. Након криопрезервације, структура субпопулација се изменила и све субпопулације сем СП4, су имале статистички значајно различит процентуални однос (Слика 32). Најочигледније је било повећање процентуалног удела СП1 на рачун смањења процената СП2 и СП3, што указује да се брзина сперматозоида смањила након замрзавања. Слично запажање се може приметити и на дијаграму који показује промене параметара VCL и LIN за појединачне сперматозоиде у свежем узорку и узорку након криопрезервације (Слика 33). Док се у свежем узорку сперматозоиди распоређују по читавој површини дијаграма, након криопрезервације већина сперматозоида је имала ниске вредности параметра VCL, испод 40 $\mu\text{m/s}$ са различитим вредностима LIN.



Слика 32. Удео свих субпопулација сперматозоида (SP1 - SP4) у свежем и криопрезервираном узорку млечи поточне мрене

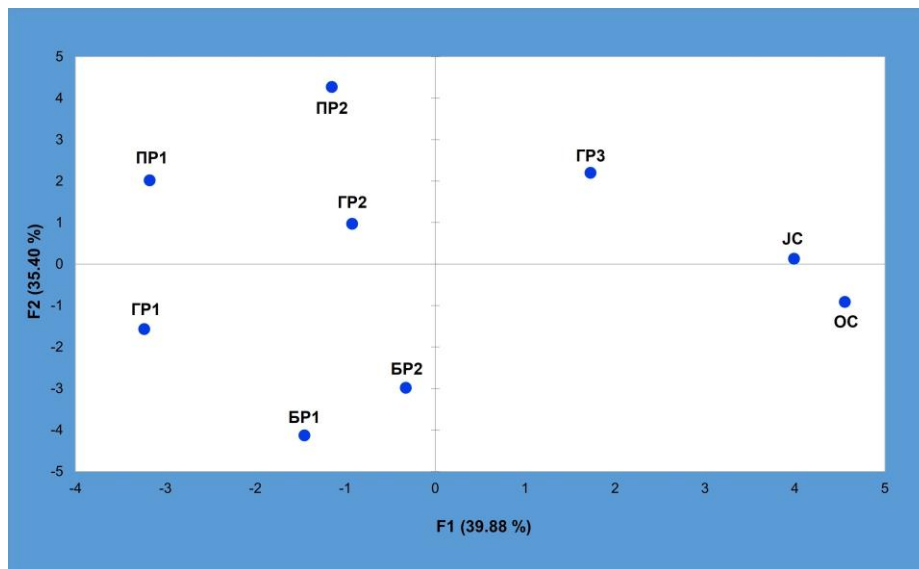


Слика 33. Дистрибуција сперматозоида на основу линеарности (LIN) и криволинијске брзине (VCL), пре и након криопрезервације

4.6. Резултати статистичке обраде података анализом главних компоненти (РСА)

Резултати анализе главних компоненти (РСА) показују да збирна варијабилност садржана у прве две осе износи 75,28%, са највећим уделом прве осе од 39,88%. Прва оса је у највећој мери дефинисана параметрима абунданце, биомасе, реалне продукције, потенцијалне продукције, коефицијентом β , покретљивошћу сперматозоида као и концентрацијом и сатурацијом кисеоника. Друга оса је повезана са средњим вредностима дужине тела и тежине тела, као и хидролошким параметрима попут температуре, електропроводљивости, тврдоће воде и брзине протока.

Уочљиво је издвајање популација са локалитета Јасеница и Осаоница, на основу биомасе, абунданце, реалне и потенцијалне продукције и покретљивости сперматозоида. Популације са Борачке реке, са оба локалитета, испод и изнад бране, издвајају се у посебну групу коју карактеришу вредности средња дужина тела, средња тежина тела као и брзина протока воде. Дистрибуцијом на првој и другој оси, у посебну групу се могу издвојити популације на Петровачкој реци, и на Грошничкој реци у горњем току и изнад језера. Хидролошки параметри су направили разлику унутар ове групе, па се Петровачка река одликује високим вредностима електропроводљивости, док се Грошничка река издваја по високом вредностима концентрације и сатурације кисеоника. Популација са локалитета Грошничка река – испод језера се издвајају на основу вредности параметара температуре и тврдоће воде (Слика 34).



Слика 34. Графички приказ резултата анализе главних компоненти (РСА). GR1 - Грошничка река - горњи ток, GR2 - Грошничка река - изнад језера, GR3 - Грошничка река - испод језера, BR1 - Борачка река - изнад бране, BR2 - Борачка река - испод бране, PR1 - Петровачка река - горњи ток, PR2 - Петровачка река - доњи ток, OS - Осаоница, JC - Јасеница.

4.7. Процена ризика изумирања и приоритета конзервације истраживаних популација поточне мрене применом модификованог ESHIPPO модела

Процена ризика изумирања и приоритета конзервације истраживаних популација поточне мрене урађена је тестирањем према модификованом моделу ESHIPPO (Табела 15).

Табела 15. Степен еколошке специјализације (ES), индекс локалне одрживости рибљих популација (ILSFP) и утицај HIPPO фактора у процени приоритета конзервације популација

	Грошничка река - изнад језера	Грошничка река - испод језера	Борачка река - изнад брале	Борачка река - испод брале	Петровачка река	Река Јасеница	Река Осаоница
Станиште (Hb)	3	3	3	3	3	3	3
Исхрана (Dt)	3	3	3	3	3	3	3
Репродуктивна стратегија (Rs)	3	3	3	3	3	3	3
Животни циклус (Lc)	3	3	3	3	3	3	3
Величина тела (Bs)	5	5	5	5	5	5	5
Ниво ендемизма (Re)	1	1	1	1	1	1	1
Укупан резултат ES	18	18	18	18	18	18	18
d	1	1	1	1	1	1	1
f	3	3	3	3	3	3	3
bm	3	3	3	1	3	1	1
fm%	3	1	1	1	3	3	1
sh%	1	1	1	1	1	1	1

nAge	1	1	1	1	1	1	1
Lmean	5	3	3	3	5	3	3
pa%	5	5	5	5	5	5	5
Eps%	5	5	5	5	5	5	5
Укупан резултат ILSFP	27	23	23	21	27	23	21
Промена станишта - без фрагментације (H)	3	3	3	3	3	3	3
Деструкција	3	3	3	3	3	3	3
Фрагментација и изолација станишта	5	5	5	5	1	1	1
Инвазивне врсте (I)	1	1	1	1	1	1	1
Загађење (P) - Еутрофизација, сапробност, токсичност	1	3	1	1	3	1	1
Демографски раст становништва (P)	3	3	3	3	3	3	3
Претерана експлоатација (O)	1	1	1	1	1	1	1
Укупан резултат HIPPO	17	19	17	17	15	13	13
Укупан резултат ES + ILSFP + HIPPO	62	60	58	56	60	54	52

Табела 16. Утицај елемената репродуктивног потенцијала (RP) у процени приоритета конзервације малих популација

Репродуктивни потенцијал (RP)	Грошничка река - изнад језера	Грошничка река - испод језера	Борачка река - изнад бране	Борачка река - испод бране	Петровачка река	Река Јасеница	Река Осаоница
однос полова	1	3	1	1	3	1	1
број узрасних класа	1	1	1	1	1	1	1
% репродуктивно активних женки	3	1	1	1	3	3	1
% покретљивости сперматозоида	3	3	3	3	3	1	1
старосна и популациона структура	3	3	3	3	3	3	3
Укупан резултат (RP)	11	11	9	9	13	9	7
ES + ILSFP+ HIPPO + RP	73	71	67	65	73	63	59
Приоритет конзервације	2	2	3	3	2	3	3

На основу укупног броја бодова еколошке специјализације ES, индекса локалне одрживости рибљих популација ILSFP, HIPPO фактора и репродуктивног потенцијала RP, процењен је приоритет конзервације најугроженијих популација (Табела 16). За популације из Грошничке реке, на локалитетима изнад и испод језера, као и за Петровачку реку, одређен је умерени ризик од изумирања, односно степен приоритета заштите **2**, при чему је укупан број бодова анализираних фактора износио 73, односно 71. Мала вероватноћа изумирања, на основу укупног броја бодова, констатована је за Борачку реку на оба локалитета, Јасеницу и Осаоницу. У овим популацијама дефинисан је степен приоритета заштите **3**.

5. Дискусија

Реке су мултидимензионални и динамични системи који се мењају под природним и антропогеним утицајем (Shen *et al.*, 2017). Акватични организми развијали су се у односу на дистрибуцију станишта и прилагођавали обрасце животне историје као одговор на њихову повезаност у простору и времену (Seliger & Zeiringer, 2018). Разумевање главних фактора који утичу на опстанак и успешан развој популација риба је од суштинског значаја за очување природних аутохтоних генетичких ресурса (Frankham *et al.*, 2002).

Фрагментација популација је од кључног значаја у конзервационој биологији (Milankov, 2007). Vuonerba *et al.* (2015) указују на популациону диференцијацију код речних риба малих димензија, која настаје као последица еколошког дисконтинуитета и специфичних преференци станишта. Генерално, ендемске врсте могу бити изложене већем притиску од изумирања због релативно ограничене дистрибуције и специјализације станишта (De Silva *et al.*, 2007).

Истраживања спроведена у оквиру ове докторске дисертације имала су за циљ да омогуће информације о структурним елементима популација, генетичкој карактеризацији и морфолошким карактеристикама фрагментисаних популација поточне мрене. Истраживање је обухватило и популације у нефрагментисаним стаништима, за потребе поређења података. Други део дисертације се односи на процену ризика изумирања популација и развој протокола за конзервацију сперматозоида поточне мрене, као потенцијалне конзервационе методе.

5.1. Структура популација врсте *B. balcanicus*

Популације представљају реалне облике постојања врсте и чине динамичке системе прожете многобројним интеракцијама (Stanković, 1962). Оне, као просторно и временски интегрисана група јединки, могу да се окарактеришу одређеним елементима структуре популација. Услед индивидуалних процеса развића и променљивог утицаја спољашњих и унутрашњих услова средине, непрекидно се мења структура популација (Pešić, 2011).

Ниже вредности абунданце и биомасе анализираних популација констатоване су у горњим токовима фрагментисаних река: Grošничка река - горњи ток, Grošничка река - изнад бране, Борачка река - изнад бране и на оба локалитета Петровачке реке. Претпоставља се да је на ниже вредности биомасе и абунданце у Grošничкој и Борачкој реци утицала фрагментација тока јер је слична ситуација забележена у студији аутора Uzunova *et al.* (2012). У поменутој студији представљен је негативан утицај фрагментације на абунданцу и узрасну структуру врсте *B. petenyi*, на реци Искар, на територији Бугарске. Ова врста је по свим карактеристикама веома слична врсти *B. balcanicus*. Аутори наводе да иако су барбуси добри пливачи, за њих су препреке веће од 0,4 m непремостиве. Према Gerking (1953), у потоцима и рекама са већим бројем баријера, сваки део може се сматрати више или мање изолованом јединицом, која садржи сопствену природну популацију. Веза између ових субпопулација игра важну улогу у формирању и функционисању метапопулације (Schmutz & Jungwirth, 1999). Ниже вредности биомасе у фрагментисаним популацијама резултат су комбинације ниже бројности и мањих величинских класа риба (Valentine-Rose *et al.*, 2007).

Резултати указују да су вредности средње дужине и средње тежине тела поточне мрене на истраживаним локалитетима биле у распону од 8,99 - 10,38 cm и 7,38 - 17,65 g. Слични резултати представљени су и у студији аутора Adrović *et al.* (2018) за популацију из реке Гостеле на територији Босне и Херцеговине. Највише вредности средње дужине и тежине забележене су на локалитетима Јасенице, Осаонице и Борачке реке - испод бране. Јасеница и Осаоница, као нефрагментисана, референтна станишта имају високе вредности и осталих анализираних параметара структуре популација. Популација која се налази на локалитету Борачке реке - испод бране је у контакту са јединкама које живе у притокама Гружанског језера у које се и она улива. Јединке које живе у реци Грузи имају већу стандардну дужину и тежину што је потврђено студијом Šorić & Janković (1989).

На Петровачкој реци, нарочито у доњем делу тока, и ушћу у Лепеницу констатовано је загађење, што је вероватно утицало на величину и тежину јединки ових популација. У студији Bertoli *et al.* (2019) наводи се да је узрок органичног раста поточне мрене могуће загађење и ограничено станиште.

Анализа структуре популација у контексту старости јединки за све истраживане локалитете показала је присуство шест узрасних категорија: 0+ до 5+. Ови резултати указују да је на локалитетима централне Србије забележен већи број узрасних класа, односно у узорцима су присутне јединке веће старости у односу на истраживане локалитете у Хрватској (Žutinić *et al.*, 2014) где су забележене три класе и локалитете у Словенији (Bertoli *et al.*, 2019) где су забележене четири класе. На свим локалитетима процентуално су биле најзаступљеније узрасне категорије 2+ и 3+. На Осаоници, Јасеници, Грошничкој реци - испод бране и Борачкој реци - испод бране су заступљене све узрасне категорије, што указује на стабилну структуру ових популација. На Петровачкој реци, и на локалитетима Грошничке реке изнад језера и Борачке реке изнад бране махом недостају узрасне класе 5+ и 0+.

На пет од девет истраживаних локалита, процентуално су биле бројније женке у односу на мужјаке. Ови резултати су у складу са резултатима представљеним у студији аутора Žutinić *et al.* (2014). У фрагментисаним екосистемима, на локалитетима у горњим токовима, мужјаци су бројнији од женки. Мужјаци су знатно бројнији и у горњем току Петровачке реке. На локалитетима Грошничке и Борачке реке испод бране, констатована је већа бројност женских јединки. На овим локалитетима женке су биле два, односно четири пута бројније у односу на мужјаке.

Продукција представља одличан показатељ квантитативних перформанси популација, јер интегрише биомасу, раст, време развоја и морталитет (Le Cren 1972; Almodovar *et al.*, 2006). Негативан тренд продукције може да се јави услед негативних промена у окружењу (Myers *et al.*, 2017). На свим истраживаним локалитетима однос реалне и потенцијалне продукције је неповољан, и свуда су забележене веће вредности потенцијалне у односу на реалну продукцију. У складу са осталим резултатима, највеће вредности реалне и потенцијалне продукције забележене су на рекама Јасеница и Осаоница. Иако не постоји велика разлика у хидролошком смислу између истраживаних локалитета, на овим рекама је забележен највећи биолошки потенцијал, и најстабилније популације поточне мрене. На локалитетима Грошничке и Борачке реке изнад бране, констатоване су ниже вредности продукције, у односу на локалитете низводно. Најниже вредности реалне продукције забележене су на Петровачкој реци, на оба локалитета. Ово се

може објаснити утицајем деградације станишта која се јавља у виду фрагментације и загађења.

Коефицијент раста (K), показује којом брзином рибе достижу највећу дужину коју могу имати у популацији (L_{∞}). Највиша вредност за L_{∞} забележена је за реку Јасеницу, а након ње за Борачку реку - изнад бране и Грошничку реку - изнад језера. На Јасеници је забележена највећа вредност за L_{∞} , а у исто време и најнижа вредност коефицијента раста. Ово је у складу са резултатима који су објављени у студији Reynolds (1985) где је констатовано да рибе што су веће, расту спорије и да током животног века достижу одређени проценат своје максималне дужине. Највише вредности коефицијента раста K забележене су на Грошничкој реци, на локалитетима у горњем току и испод језера, као и на оба локалитета Петровачке реке. На овим локалитетима нису забележене високе вредности за L_{∞} .

5.2. Дужинско-тежински однос и кондициони фактор врсте *B. balcanicus*

Резултати дужинско-тежинског односа риба откривају многе значајне еколошке одлике самих екосистема као и животну историју анализираних врста (Sekulić, 2013). Кроз вредност фактора алометрије b , могу се добити корисне информације о расту риба (Tarkan *et al.*, 2006), зато и ова анализа представља важну аналитичку процедуру у биологији, физиологији, екологији риба и рибарству (Sekulić, 2013). Позитивна или негативна алометрија указује на заобљено или витко тело, док изометријски раст показује да тело расте истим темпом и у дужину и у ширину (Jobling, 2008).

У оквиру резултата ове докторске дисертације уочено је да је поточна мрена на свим фрагментисаним стаништима показала негативан алометријски раст, што значи да јединке више расту у дужину. Негативан алометријски раст имају и јединке из популација са Петровачке реке. Сличан резултат ($b = 2,91$) забележен је у студији Žutinić *et al.* (2014) код популације поточне мрене у реци Илова (Хрватска). Вредности коефицијента регресије за примерке у нефрагментисаним стаништима су веће од три, што указује на позитиван алометријски раст. На различите вредности коефицијента може утицати комбинација већег броја фактора: број испитиваних узорака, сезонски ефекат, станиште, степен пуноће стомака, зрелост гонада, пол, здравље и опште стање риба (Wooten, 1998).

Кондициони индекс представља релативну количину енергетских залиха које се пореде са одређеним мерама величине тела и битна је мера адаптивне вредности јединке (Green, 2000). Енергетске залихе могу бити усмерене на одржање, раст или репродукцију (Perrin & Sibly, 1993; Heino & Kaitala, 1999). Ако кондициони индекс масе показује колике су енергетске резерве тела, онда даје и индиректне информације о квалитету станишта и могућности улагања у репродукцију (Stevenson & Woods Jr, 2006).

Више вредности фактора кондиције ($K > 1$) присутне су у Грошничкој реци изнад бране, на Грошничкој и Борачкој реци на локалитетима испод брана и на Осаоници што значи да су рибе на овим стаништима у доброј кондицији. На кондиционо стање риба може утицати низ фактора као што су: стрес, пол, сезона, доступност хране и други параметри квалитета воде (Khallaf *et al.*, 2003). Bertoli *et al.* (2019) наводе да је фактор кондиције виши у првим годинама раста јединки, и већ у трећој и четвртој години живота има вредности испод јединице. Резултати поменуте студије се односе на јединке из реке Соче (итл. Isonzo) и аутори наводе да

локалитет са ког су узорковане јединке поточне мрене представља загађено станиште са смањеном доступношћу воде. Аутори ове студије сматрају редуковани животни простор и загађење главним факторима који ограничавају морфолошке димензије риба. Вредности фактора кондиције у овој докторској дисертацији биле су најниже у Петровачкој реци и реци Осаоници. Ситуација у Петровачкој реци се делимично може објаснити загађењем које је присутно у доњем току реке.

5.3. Генетичка карактеризација

Род *Barbus* је познат по широкој распрострањености, великом броју врста и њиховој морфолошкој пластичности (Machodrom & Doadrio, 2001). Већина ових врста има сличне морфолошке карактеристике (Kottelat & Freyhof, 2007), што доприноси грешкама у разумевању њихових односа и таксономског статуса (Buonerba, 2010). Пример грешке из прошлости је погрешно детектована врста *B. caninus* уместо врсте *B. balcanicus* коју су уочили Bertoli *et al.* (2019) на северозападној граници дистрибуције поточне мрене, у сливу реке Соче (итл. Isonzo). Штури подаци о генетичком диверзитету рода *Barbus* на територији Србије, као и велика морфолошка сличност са сродним врстама, подстакли су истраживања о таксономском статусу врсте на истраживаним локалитетима.

Генетичка карактеризација урађена на основу *COI* гена митохондријалне ДНК потврдила је да анализирани узорци припадају врсти *B. balcanicus*. Бројне студије су показале да је ген који кодира субјединицу I цитохром оксидазе значајан и често коришћен у идентификацији рибљих врста (Perea *et al.*, 2010). Хаплотип, **Ex65F1**, детектован у истраживаном узорку констатован је први пут у студији Knaefi *et al.* (2017) на територији Румуније у оквиру дунавског слива. Присуство истог хаплотипа код јединки истраживаних за потребе ове докторске дисертације може да се објасни чињеницом да су анализирани јединке изловљене у рекама које такође припадају дунавском сливу. Ову претпоставку потврђује и студија Simonović *et al.* (2018) о диференцијацији врста рода *Barbus* на подручју централног Балкана. На основу морфолошких анализа и анализом секвенци *cut b* код јединки из реке Врла (југ Србије - систем Јужне Мораве, Црноморски слив), утврђено је да се ради о врсти *B. balcanicus*. У истој области, у реци Драговиштици, која припада систему реке Струме (Егејски слив), забележено је присуство врсте *B. strumicae* (Karaman, 1955), док је у реци Пчињи, која припада сливу Вардара констатована *Barbus* sp., која је по морфолошким параметрима сличнија врсти *B. strumicae*, а на основу генетичких анализа сличнија врсти *B. balcanicus*.

Детектовани хаплотип је показао највећу сличност са хаплотипом који је констатован у реци Сочи, на територији Словеније, описаном од стране Geiger *et al.* (2014). Јасно груписање хаплотипова са територије Србије, Грчке, Македоније и Словеније на филогенетском стаблу и на мрежи хаплотипова, потврђује диференцираност врсте *B. balcanicus* у односу на друге врсте рода *Barbus*.

5.4. Геометријска морфометрија

Бројна истраживања у претходном периоду су показала да слатководне рибе често одликује полни диморфизам у облику и величини тела (Caldecutt *et al.*, 2001;

McGuigan *et al.*, 2003; Hendry *et al.*, 2006). Резултати ове докторске дисертације показали су да је полни диморфизам присутан код поточне мрене и уочено је да су женке веће од мужјака. Ови резултати су у складу са студијом Žutinić *et al.* (2014) која је пружила прве податке о постојању диморфизма у погледу величине тела поточне мрене. Исти резултат примећен је и код сличних врста *B. peloponesius* и *B. cyclolepis*, у студији Vasiliou & Economidis (2005). Крупније тело и већа абдоминална регија вероватно су последица селекције за повећану плодност женки (Jacquemin & Pyron, 2014). Генерално полни диморфизам најчешће рефлектује ефекте полне селекције, еколошке диференцијације међу половима или индиректне ефекте разлике у величини тела мужјака и женки (Oliveira & Almada 1995; Fairbairn *et al.*, 2007; Hassell *et al.*, 2012). Сексуални диморфизам може да се јави и због природне селекције која делује различито на полове (Lostrom *et al.*, 2015).

Резултати представљени у дисертацији показују и постојање полног диморфизма у облику тела. Највеће разлике примећене су у позиционирању врха њушке и пераја. Уочене разлике облика тела међу половима могу имати утицаја на различиту екологију ових риба, преваходно у исхрани. Према Lenhardt *et al.* (1996) и Piria *et al.* (2005), поточна мрена се храни углавном фауном дна, а главна храна ове врсте су ларве Chironomidae и Trichoptera. Sapounidisa *et al.* (2015) истраживали су исхрану врсте *B. strumicae*, веома блиске *B. balcanicus*, и уочена је висока специјализација у исхрани ларвама Chironomidae које су, како се чини, главни извор хране током целе године. Nass *et al.* (2010) сугеришу да промене у начину исхране и расположивости ресурса хране могу да доведу до морфолошких разлика које су у вези са перформансама храњења, као што су примећене промене у пределу главе. Такође, склоност мужјака и женки према различитом типу хране може утицати на разлике у положају уста, што је евидентирано у оквиру овог истраживања. Будући да има мало података о специфичностима исхране поточне мрене, потребна су додатна истраживања да би се ова претпоставка потврдила.

Узроке морфолошких разлика међу популацијама са различитих станишта, сличних еколошких услова, често је веома тешко објаснити (Poulet *et al.*, 2004). Претходне студије су показале да морфолошке карактеристике могу показати високу пластичност као одговор на разлике у условима станишта (Swain *et al.*, 1991; Romprei *et al.*, 2016). Јаки селективни притисци у вези са кондиционим стањем, могу изазвати брзу дивергенцију у морфологији између популација риба, пре него што дође време за накупљање неутралних генетичких разлика између група (Sequeira *et al.*, 2011). Разлике у типу и доступности плена између различитих станишта могу довести до морфолошке разноликости карактеристика као што су положај уста и величина главе (Foster *et al.*, 2015), што може бити уочљиво и међу групама оба пола.

Околина са великим притиском предатора може да доведе до морфолошких промена, попут веће висине задњег дела тела и каудалне дршке, у циљу повећања стартног убрзања приликом пливања (Brönmark & Pettersson, 1994; Langerhans, 2008; Santos & Araújo, 2015). Заједница риба на истраживаним локалитетима је типична за мале реке на овом подручју Балкана, и повезана је са параметрима животне средине (Giannetto *et al.*, 2013). Забележено је присуство само четири врсте риба малих димензија, које се хране углавном бескичмењацима, и којима поточна мрена није плен. На основу ових чињеница претпоставља се да присуство предатора не може бити узрок варијабилности облика тела.

Хетерогеност еколошких параметара животне средине потенцијално може створити просторне и временске разлике у селекционим притисцима или олакшати варијабилне морфолошке одговоре код риба (Franssen, 2011). Јединке из горњих токова Борачке и Грошничке реке имају мању висину тела, оштрију њушку и вретенастије тело од примерака из доњих токова Петровачке и Грошничке реке. Ово је специфично за лотичка окружења која имају тенденцију селекције облика тела које пружа мањи отпор води, омогућавајући ефикасно кретање и одржавање брзине, уз нижи утрошак енергије (Webb, 1984; Langerhans & Reznick, 2009; Foster *et al.*, 2015). Одређени степен разлике је уочен и између јединки на локалитетима Грошничке реке изнад и испод језера. Брана и вештачко језеро које се налази на речном току представља непремостиву баријеру за кретање риба. Недавна истраживања подржала су ову тврдњу да су речне деонице изнад брана лоши миграцијски коридори који утичу на смањени проток гена и доводе до фенотипских разлика (Franssen 2011; Hudman & Gido 2013).

Као што је и очекивано, најмања морфолошка одступања примећена су на два локалитета Петровачке реке и на локалитету Грошничке реке испод бране. Поменути локалитети су хидролошки повезани и јединке које живе у њима имају несметани контакт. Разлике у морфологији поточне мрене са локалитета у Борачкој и Петровачкој реци могле би бити последица тога што припадају различитим сливовима и недовољне повезаности.

Физички фактори унутар станишта, попут брзине воде и раствореног кисеоника, могу проузроковати промене у фенотипу (Crispo & Chapman, 2010; Cureton & Broughton, 2014). Резултати докторске дисертације засновани на Mantel тесту потврдили су да улога хидролошких и параметара квалитета воде не утиче на морфолошку варијабилност. Поред тога, Mantel тест није показао значајну повезаност између географских удаљености и морфолошке дивергенције, што се може објаснити чињеницом да се истраживани екосистеми не налазе тако далеко један од другог. Ово указује на чињеницу да на облик тела риба утичу и други фактори, а један од њих је и фрагментација станишта.

С обзиром на то да услови животне средине између локалитета нису били знатно различити (Tukey's HSD, $p > 0,05$), уочена морфолошка дивергенција може се делимично објаснити фрагментацијом станишта, која делује као стресор, перманентно мењајући станиште, при чему се ствара нови еколошки медијум (Zhang *et al.*, 2018).

Варијабилност облика тела је у потпуности повезана са многим аспектима екологије риба, укључујући кретање, ограничење доступних ресурса у простору, тактике храњења, и може указивати на функционалну разноликост рибљих заједница (Ingam, 2015).

Морфолошке промене изазване факторима животне средине могу помоћи бољем разумевању процеса фенотипске пластичности као резултат индукованих фактора (Mohaddasi *et al.*, 2013; Jalili *et al.*, 2015). Стога се може очекивати да облик тела риба буде од посебне еколошке и еволуцијске важности (Klingenberg *et al.*, 2003).

5.5. Анализа покретљивости и криопрезервација сперматозоида врсте *B. balcanicus*

Покретљивост сперматозоида је један од најчешће коришћених параметара за процену њиховог квалитета и углавном је у корелацији са фертилитетом (Kime *et al.*, 2001). Резултати ове докторске дисертације указују да су параметри тоталне покретљивости имали највише вредности код јединки из река Осаонице и Јасенице. Најниже вредности параметара тоталне покретљивости забележене су на Петровачкој реци. Ово се може објасни присутним загађењем у доњем току ове реке, које негативно утиче на покретљивост сперматозоида риба што је потврђено у бројним истраживањима (Singh *et al.*, 1988; Lahnsteiner *et al.*, 2004; Abascal *et al.*, 2007). Ниже вредности покретљивости сперматозоида констатоване су и у фрагментисаним рекама. На тим екосистемима, на обе реке, већу покретљивост су имали сперматозоиди јединки које насељавају локалитете изнад баријера.

Криопрезервација је метода која има широку примену у репродуктивном менаџменту, а нарочито је значајна у конзервацији генетичких ресурса (Lahnsteiner *et al.*, 2000; Cabrita *et al.*, 2010; Martínez-Páramo *et al.*, 2017).

Како су протоколи за криопрезервацију сперматозоида риба генерално специфични за врсту, њихов развој је кључан за очување јединствених генетичких ресурса природних популација. Неколико методолошки различитих приступа је успешно тестирано приликом криопрезервације млечи ципринидних врста риба, али до сада није било доступних информација о примени ове технике за поточну мрену.

Успех криопрезервације млечи риба зависи од великог броја различитих фактора, али у основи најбитнији је избор одговарајућег криопротектанта, екстендера и протокола замрзавања (Viveras *et al.*, 2000). Да би се максимално побољшао квалитет гамета након одмрзавања, ови фактори се морају прецизно усагласити, а понекад се укључује и допуна специфичним једињењима (Cabrita *et al.*, 2010; Ciereszko *et al.*, 2013; Martínez-Páramo *et al.*, 2013).

Изотоничност семиналне плазме инхибира покретљивост сперматозоида риба у гениталном тракту и тек излагање хипертоничности слатке воде подстиче кретање у току мреста (Marić, 2019). Због природе и функције сперматозоида, они не долазе у контакт са ниским температурама, па је процес криопрезервације за њих изузетно стресан (Љујић, 2014).

Екстендер се користи за разблаживање узорка, штити ћелије од физичких и хемијских промена или контаминације и обезбеђује оптималне услове за оплодњу.

Криопротектанти се додају криомедијуму како би ублажили негативан ефекат ниских температура на ћелије сперматозоида. Механизам њиховог деловања је у везивању воде што смањује стварање кристала леда, као и везивање електролита што ограничава стварање концентрованих заосталих раствора, и на тај начин смањују тачку замрзавања (Yamaner *et al.*, 2015; Koreika *et al.*, 2007; Linhart *et al.*, 2006). Криопротектанти се могу поделити на пермеабилне и непермеабилне, на основу њихове способности да прођу кроз ћелијску мембрану (Suquet *et al.*, 2000).

Криомедијум који садржи Me₂SO и екстендер на бази глукозе (GBE) је показао највећу успешност и допринео је очувању 50% покретљивости сперматозоида у односу на свеж узорак. Међу тестираним криопротектантима

Me₂SO је показао најбоље резултате у криопрезервацији поточне мрене. Слични резултати забележени су и код шарана (Lahnsteiner *et al.*, 2000), караша (Alvarez *et al.*, 2008), пастрмке (Cabrita *et al.*, 2001), штуке (Glogowski *et al.*, 2008) и јегуље (Asturiano *et al.*, 2003). Успешност Me₂SO може се објаснити способношћу да брзо продире кроз ћелијску мембрану сперматозоида, и остварује интеракцију са фосфолипидима мембране, па се тако ствара равнотежа између интрацелуларног и екстрацелуларног медијума (Anchordoguy *et al.*, 1987; Suquet *et al.*, 2000). Са друге стране, Horváth *et al.* (2003) су у својој студији показали да сперматозоиди шарана криопрезервирани са метанолом имају много већу покретљивост него они замрзнути са Me₂SO. Метанол има успешну примену у криопрезервацији млечи других ципринидних врста риба као што су лињак (Lujic *et al.*, 2015) и зебрице (Yang *et al.*, 2007). Избор најбољег одговарајућег криопротектанта варира у зависности од саме врсте, интеракције са екстендером као и брзине замрзавања узорка (Vuthiphandchai *et al.*, 2014). Резултати докторске дисертације су показали да Me₂SO, а после њега и ME у задовољавајућој мери пружају заштиту сперматозоидима поточне мрене приликом замрзавања, за разлику од осталих тестираних криопротектаната (EG, PG). Из тог разлога за даље експерименте коришћена су ова два криопротектанта, док се за остале сматра да су имали токсичан ефекат на ћелије пре замрзавања, или су утицали на смањену покретљивост након одмрзавања.

Што се тиче коришћених концентрација, ниже концентрације криопротектаната (5%) дају веће стопе покретљивости након одмрзавања у односу на веће концентрације (10% и 15%). Ово запажање је нарочито уочљиво у случају ME где сперматозоиди са 15% криопротектантом, након одмрзавања једва да показују кретање. Ови резултати указују на токсично дејство криопротектаната и да су ниже концентрације повољније за криопрезервацију млечи поточне мрене.

Једна од кључних ставки у току криопрезервације је брзина замрзавања, услед њеног утицаја на осмотску равнотежу интрацелуларних и екстрацелуларних течности током замрзавања (Yang *et al.*, 2007). Уколико је брзина замрзавања спора, онда и сувише воде изађе из ћелије и долази до њене дехидратације и смрти. Уколико је брзина замрзавања велика, онда мала количина воде изађе из ћелије а од преостале воде се формирају велики кристали леда који механички оштећују ћелију (Mazur, 2004; Yang *et al.*, 2007). За поточну мрену, резултати указују да је комбинација од 2 минута хлађења и висина рама од 3 cm имала најбољи заштитни ефекат на ћелије. Брзина хлађења је била довољна да спречи дехидратацију ћелије а опет довољно спора да умањи интрацелуларно формирање кристала леда.

Током последњих година развијају се различите стратегије како би се побољшао квалитет сперматозоида након криопрезервације. Широко прихваћена експериментална метода у истраживањима је инкорпорација једињења са специфичним карактеристикама које позитивно утичу на очување интегритета и функционалности гамета у екстремним стањима изазваним ниским температурама (Martinez-Paramo *et al.*, 2017).

Позитиван ефекат на покретљивост сперматозоида који су остварили шећери већ је описан код различитих врста риба као што су афрички сом (Urbány *et al.*, 1999), шаран (Horvat *et al.*, 2003), поточна пастрмка (Nynca *et al.*, 2014), штука (Dietrich *et al.*, 2016). Сматра се да шећери као непермеабилни криопротектанти омогућавају заштиту од замрзавања кроз директну интеракцију са поларним фосфолипидним групама, повећавајући флуидност ћелијске мембране (Labbe *et al.*,

1996; Athurupana *et al.*, 2015.). Резултати ове студије показали су да суплементација криомедијума шећерима, као и концентрација додатих шећера у великој мери утичу на покретљивост сперматозоида. Глукоза и сахароза су показале сличну успешност у заштити ћелија, што сугерише да је механизам који стоји у основи криопротективних ефеката моносахарида и дисахарида сличан код ове врсте. То је у складу са резултатима у студији Нупса *et al.* (2016), који су констатовали да глукоза и сахароза обезбеђују највећу покретљивост сперматозоида након одмрзавања код неколико салмонидних врста. Генерално, суплементација концентрацијама шећера од 0,1М значајно побољшава покретљивост сперматозоида након одмрзавања, док концентрација од 0,3М доводи до драматичног смањења (Којадиновић *et al.*, 2020). Механизам који узрокује успоравање брзине кретања сперматозоида при високим концентрацијама шећера још увек није познат (Judyska *et al.*, 2020).

Додавање специфичних протеина у састав криомедијума са функцијом заштите ћелијске мембране од ниских температура је било предмет истраживања више студија (Cabrita *et al.*, 2008). У те сврхе ФБС и БСА су често коришћени за криопрезервацију сперматозоида јер смањују токсичности и стабилизују осмотски притисак (Tian *et al.*, 2015). Супротно очекивањима, резултати указују да ове супстанце нису имале утицаја на заштиту ћелија од негативних ефеката замрзавања. Слични резултати забележени су и за липљена, где додавање БСА у екстендер није имало утицаја на очување стабилности ћелијске структуре (Lihnsteiner *et al.*, 1992). Као могуће објашњење De Leeuw *et al.* (1993) наводе да је заштита од БСА делимична, али има синергетички ефекат када се користи у комбинацији са липидним везикулима због својих емулгаторских својстава. Иако су ФБС и БСА показали лош потенцијал за криопрезервацију поточне мрене, они се успешно користе код других слатководних врста риба (Marco-Jiménez *et al.*, 2006; Cabrita *et al.*, 2008; Koh *et al.*, 2010; Aoki *et al.*, 1997).

Постојање сперматозоида са различитом покретљивошћу у истом узорку и анализа субпопулација значајан је алат за процену плодности мужјака. У оквиру ове докторске дисертације утврђено је да код поточне мрене постоје четири субпопулације сперматозоида са различитим карактеристикама покретљивости. Слична структура субпопулација сперматозоида идентификована је и код бикова (Muiño *et al.*, 2008; Muiño *et al.*, 2009), паса (Dorado *et al.*, 2011), коња (Quintero-Moreno *et al.*, 2003) и код рибе лист (Martínez-Pastor *et al.*, 2008).

Сперматозоиди који су сврстани у различите субпопулације, карактеришу различита физиолошка стања, што се одражава на њихову покретљивост. Сперматозоиди који највише доприносе оплодњи се налазе у групи брзих линеарних - СПЗ. Субпопулације које такође могу допринети оплодњи, али највероватније у мањем обиму су из СП1 групе која се састоји од спорих линеарних сперматозоида и СП2 групе која се састоји од брзих нелинеарних сперматозоида. У студијама Gallego *et al.* (2017) на паку пирани и Veirão *et al.* (2011) на риби лист, приказано је да су само сперматозоиди велике брзине у корелацији са успешном оплодњом, без обзира на линеарност. Стога се сматра да су субпопулације које би допринеле успешној оплодњи код поточне мрене СП2 и СП3, и оне чине 48% сперматозоида. СП4 групу карактеришу спори нелинеарни сперматозоиди који су метаболички угрожени и који највероватније убрзано губе покретљивост (Dorado *et al.*, 2011). Тачан узрок постојања овакве групе сперматозоида није познат, може бити последица неправилне сперматогенезе, дефективне мембране повезане са ензимском

активношћу, лошим метаболизмом шећера или поремећајем дусања у митохондријама (Martínez-Pastor *et al.*, 2008).

Резултати докторске дисертације показују да је криопрезервација имала значајан утицај на параметре покретљивости сперматозоида. Слични резултати примећени су код сперматозоида многих ципринидних и салмонидних врста (Asturiano *et al.*, 2017). Средње вредности параметара покретљивости указују да постоји генерални губитак покретљивости и брзине кретања сперматозоида али нејасно је да ли ове промене утичу на једну специфичну субпопулацију или на целокупан узорак. Посматрање динамике субпопулација сперматозоида у свежим и криопрезервираним узорцима, показује како ниске температуре и замрзавање утичу на сперматозоиде са специфичним кинетичким својствима.

У динамици субпопулација сперматозоида уочене су промене средњих вредности параметара покретљивости. Бројност сперматозоида из група СП2 и СП3 окарактерисаних високим вредностима покретљивости значајно су смањене након криопрезервације у поређењу са свежом контролом. Ово је надокнађено значајним порастом учесталости сперматозоида СП1 групе коју карактеришу спори линеарни сперматозоиди, док је бројност СП4 (спори нелинеарни сперматозоиди) остала слична. Значајан пад бројности сперматозоида велике брзине у корист сперматозоида мале брзине забележен је и код паку пиране (Gallego *et al.*, 2017) и рибе листа (Beirão *et al.*, 2011). Ови резултати показали су да криопрезервација највероватније има негативан ефекат на метаболизам митохондрија, што доводи до укупног смањења брзине сперматозоида.

5.6. Процена ризика изумирања и приоритета конзервације истраживаних популација поточне мрене применом модификованог ESHIPPO - ILSFP – RP модела

Главни циљеви конзервационе биологије су утврђивање критеријума за процену степена угрожености, процена ризика од изумирања и предузимање одговарајућих мера (Petrović, 2015).

Модел ESHIPPO, поред корисних и значајних резултата које даје својом применом, има велики потенцијал за надоградњу и специјализацију за прецизнију проблематику (Simić *et al.*, 2014; Simić *et al.*, 2015; Simić *et al.*, 2016). Модификација модела ESHIPPO додавањем параметара RP, јасније ће представити стање популација исте врсте које насељавају водотокове подложне променама и утицају различитих стресора. Ово је изузетно важно за популације риба горњих токова река и потока, мале бројности и специфичних захтева ка условима станишта.

Баријере између фрагмената станишта имплицирају и рестрикцију у проналажењу одговарајућег партнера, чиме се смањује репродуктивни потенцијал популације (Milankov, 2007), који може бити смањен и услед деловања различитих типова загађења (Vidal, 2008).

Применом модификованог ESHIPPO - ILSFP - RP модела, утврђен је умерени ризик од изумирања односно степен приоритета заштите **2** за популације из Грошничке реке, на локалитетима изнад и испод језера и за Петровачку реку. Стање популација на Грошничкој реци је могуће објаснити великим степеном фрагментације, као и чињеницом да је прошао одређени временски период од формирања баријера, па је дошло и до изолације популација на одређеним деловима

тока. Према Schnell *et al.* (2013) популације са ниском стопом миграције имају нижу одрживост у поређењу са малим популацијама са интензивним међупопулационим миграцијама. Приметан је и већи степен урбанизације у близини корита ове реке, самим тим повећава се и притисак од загађења. Лоше стање популације у Петровачкој реци је проузроковано загађењем и повезано је и са осталим резултатима ове дисертације. Јединке са Петровачке реке су показале и негативан алометријски раст, лоше стање кондиције, док су параметри покретљивости сперматозоида најнижи у односу на све остале популације.

На основу укупног броја бодова еколошке специјализације ES, HIPPO фактора, Индекса локалне одрживости рибљих популација ILSFP и репродукционог потенцијала RP, констатована је мала вероватноћа изумирања за Борачку реку на оба локалитета, и реке Јасеницу и Осаоницу. У овим популацијама је дефинисан степен приоритета заштите **3**. Ово указује на стабилно стање ових популација, и поред чињенице да је Борачка река подељена браном. Упркос задовољавајућим резултатима, потребно је редовно спроводити мониторинг ових популација на терену.

У оквиру резултата ове докторске студије, представљене су еколошке, репродуктивне, морфолошке, и генетичке карактеристике поточне мрене које су значајне за даље истраживање ове врсте. Потврђено је да фрагментација станишта и загађење, који се сматрају водећим антропогеним факторима нарушавања станишта, имају утицаја на популације поточне мрене на истраживаним локалитетима. Према Gerking (1953), у потоцима и рекама са већим бројем баријера, сваки део може да се сматра више или мање изолованом јединицом, која садржи сопствену природну популацију. Веза између ових субпопулација игра важну улогу у формирању и функционисању метапопулације (Schmutz & Jungwirth, 1999).

Временски интервал од 83 године од када је формирана Grošnička акумулација, и 55 година од када су додатне баријере изграђене у горњем току, утицао је на потенцијалну диференцијацију популација у овој реци, што је потврђено резултатима анализе главних компоненти (PCA). Примећен је тренд опадања вредности параметара популација и тенденција опадања вредности покретљивости сперматозоида. Слични резултати су констатовани и на Петровачкој реци, која је под утицајем загађења. Фрагментација често као резултат има мале изоловане популације које су рањивије на стохастичке догађаје. Губи се потенцијал популације да се адаптира на промене у окружењу, као што су загађење и појава болести и све интензивније климатске промене (Coleman *et al.*, 2018). Како на опстанак популација утиче интеракција еколошких и генетичких фактора, неопходно је да и поред релативно малог временског интервала колико траје фрагментација, даља истраживања буду усмерена ка процени генетичке структуре изолованих популација.

Угроженим популацијама у фрагментисаним стаништима често је потребна комбинација конзервационих мера, како би се осигурао њихов опстанак (Goswami *et al.*, 2016). Приоритет у конзервационој стратегији, у оваквим случајевима има обнављање станишта и поновно успостављање повезаности између свих делова водотока (Brauer & Beheregaray, 2020). Овај приступ може се реализовати кроз потпуно уклањање брана и баријера, што је некада тешко изводљиво, или изградњом рибљих стаза које омогућавају хидролошку повезаност. Саставни део

сваког конзервационог менаџмента представља мониторинг и познавање статуса сваке популације.

Фокус новијих конзервационих приступа односи се на очување аутохтоних популација (Arthington *et al.*, 2016) и њихових локалних генетичких карактеристика. Једна од метода која омогућава очување генетичких ресурса и одржавање популација на њиховим природним стаништима јесте криопрезервација гамета (Silva *et al.*, 2016). За примену овог приступа, који је веома заступљен у репродуктивном менаџменту, потребно је утврдити протокол замрзавања, који је карактеристичан за сваку врсту.

Популације на Грошничкој реци, које се налазе у фрагментисаном делу тока, као и популације у Петровачкој реци, на основу резултата овог истраживања, могу се сматрати конзервационо значајним јединицама. За ове популације је потребно утврдити и степен генетичке варијабилности, што је битна ставка за дефинисање адекватне стратегије конзервације. Уколико се настави тренд који је констатован, потребно је благовремено реаговати, у циљу заштите и очувања.

На основу резултата анализе главних компоненти (PCA) уочава се диференцијација популација из река Јасеница и Осаоница, на основу елемената структуре популација и покретљивости сперматозоида. Сви анализирани параметри указују на потенцијал употребе ових популација у случају евентуалне потребе за конзервационом интервенцијом. Параметри покретљивости сперматозоида, који су констатовани на овим локалитетима и успешност развијеног протокола за криопрезервацију, показују да се сперматозоиди јединки из ових популација могу користити за оплодњу женки других популација. У случају примене ове конзервационе мере, потребно је потврдити и њихову генетичку компатибилност са популацијама на којима се примењује мера.

6. Закључци

На основу резултата спроведених истраживања на популацијама поточне мрене, могу да се изведу следећи закључци:

- ♦ Анализа параметара структуре популација указује на одређени степен разлике између истраживаних локалитета.
- ♦ Вредности абунданце и биомасе анализираних популација биле су ниже у горњим токовима фрагментисаних река: Грошничка река - горњи ток, Грошничка река - изнад бране, Борачка река - изнад бране, као и на оба локалитета Петровачке реке.
- ♦ Највише вредности средње дужине и тежине тела забележене су на локалитетима Јасеница, Осаоница и Борачка река - испод бране.
- ♦ Анализа структуре популација у контексту старости јединки за све истраживане локалитете показала је присуство шест узрасних категорија: 0+ до 5+, док су процентуално најзаступљеније узрасне категорије 2+ и 3+.
- ♦ Резултати анализе полне структуре популација поточне мрене указују да од девет истраживаних локалитета, на пет су бројније женке а на четири мужјаци.
- ♦ Највише вредности коефицијента раста K су забележене на Грошничкој реци, на локалитетима у горњем току и испод језера, као и на Борачкој реци испод бране. На овим локалитетима нису забележене високе вредности за L_{∞} .
- ♦ На свим истраживаним локалитетима однос реалне и потенцијалне продукције је неповољан, и свуда су забележене веће вредности потенцијалне у односу на реалну продукцију.
- ♦ Анализа дужинско-тежинског односа показала је негативни алометријски раст поточне мрене на већини фрагментисаних станишта и на Петровачкој реци, док је позитиван алометријски раст евидентиран на осталим локалитетима.

- ♦ Највише вредности кондиционог индекса забележене су на Грошничкој и Борачкој реци, на локалитетима испод брана и на Осаоници, што указује на добро стање тих популација.
- ♦ Генетичком карактеризацијом, на основу анализе секвенци *COI* гена мтДНК, потврђено је да популације обухваћене истраживањем припадају врсти *B. balcanicus*.
- ♦ У оквиру популација са свих истраживаних локалитета детектован је само један хаплотип - **Ех65F1**.
- ♦ Методама геометријске морфометрије први пут је код поточне мрене анализирана варијабилност величине и облика спољашње морфологије.
- ♦ Геометријско-морфометријске анализе показале су да је полни диморфизам присутан код поточне мрене, и уочено је да су женке веће од мужјака.
- ♦ Потврђено је постојање полног диморфизма, у облику тела, и највеће разлике примећене су у позиционирању врха њушке и пераја.
- ♦ На морфолошку варијабилност популација мужјака и женки на различитим локалитетима нису утицали хидролошки параметри, параметри квалитета воде и географска дистанца, што је потврђено резултатима *Mantel* теста, ($p > 0.05$).
- ♦ Приликом анализе покретљивости сперматозоида поточне мрене, највише вредности забележене су у популацијама са река Осаоница и Јасеница, док је најнижа вредност забележена на Петровачкој реци.
- ♦ Најбоље резултате за очување сперматозоида приликом криопрезервације дала је комбинација криомедијума који садржи 5% Me_2SO , као криопротектант, и екстендер на бази глукозе. Узорци су хлађени 2 минута на испарењима течног азота, на висини рама од 3 cm.

- ♦ Суплементација криомедијума шећерима имала је позитиван ефекат на покретљивост ћелија након одмрзавања, док суплементација протеинима није имала ефекат на заштиту ћелија приликом замрзавања.
- ♦ Покретни сперматозоиди хијерархијски су груписани на основу параметара покретљивости у четири субпопулације: спори линеарни, брзи нелинеарни, брзи линеарни и спори нелинеарни.
- ♦ Применом модификованог ESHIPPO - ILSFP - RP утврђен је умерени ризик од изумирања, односно степен приоритета заштите 2 за популације из Грошничке реке, на локалитетима изнад и испод језера, као и за Петровачку реку.
- ♦ На основу укупног броја бодова еколошке специјализације ES, HIPPO фактора, Индекса локалне одрживости рибљих популација ILSFP и репродуктивног потенцијала RP, процењена је мала вероватноћа изумирања за популације у Борачкој реци, Јасеници и Осаоници, и дефинисан степен приоритета заштите 3.
- ♦ Применом анализе главних компоненти (PCA), утврђена је диференцијација популација из река Јасеница и Осаоница, на основу елемената структуре популација и покретљивости сперматозоида.
- ♦ Сви анализирани параметри указују на потенцијал употребе популација из река Јасеница и Осаоница у случају евентуалне потребе за конзервационом интервенцијом.
- ♦ Резултати ове дисертације представљају допринос познавању еколошких карактеристика, морфолошке и генетичке варијабилности популација поточне мрене на територији централне Србије.

7. Литература

- Abascal F.J., Cosson J., Fauvel C. (2007). Characterization of sperm motility in sea bass: the effect of heavy metals and physicochemical variables on sperm motility. *Journal of Fish Biology*, 70, 509-522.
- Abellán P., Arribas, P., Svenning J.C. (2012). Geological habitat template overrides late Quaternary climate change as a determinant of range dynamics and phylogeography in some habitat-specialist water beetles. *Journal of Biogeography*, 39(5), 970-983.
- Ackefors H. (1998). The culture and capture crayfish fisheries in Europe. *World Aquaculture*, 29(2), 18-24.
- Adrović A., Bajrić A., Hajdarević E., Skenderović I. (2018). Dužinsko-maseni odnosi I kondiciono stanje nekih ciprinidnih vrsta riba iz voda sjeveroistočne Bosne. *XXIII SAVETOVANJE O BIOTEHNOLOGIJI*.
- Allan J.D., Abell R., Hogan Z., Revenga C., Taylor B.W. (2005). Overfishing of inland waters. *BioScience*, 55, 1041-1051.
- Almodóvar A., Graciela G.N., Benigno E. (2006). Spatial Variation in Brown Trout Production: The Role of Environmental Factors. *Transactions of the American Fisheries Society*, 135, 1348-1360.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215, 403-410.
- Alvarez B., Arenal A., Fuentes R., Pimentel R., Abad Z., Pimentel E. (2008). Use of post-thaw silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) spermatozoa to increase hatchery productions. In: E. Cabrita, V. Robles, M. P. Herraez (eds.), *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species*. Biology Series, CRC Press (Taylor and Francis group), 345-350, pp.
- Anchordoguy T.J., Rudolph A.S., Carpenter J.F., Crowe J.H. (1987). Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology*. 34, 324-331.
- Antal L., László B., Kotlík P., Mozsár A., Czeglédi I., Oldal M., Kemenesi G., Jakab F., Nagy S.A., (2016). Phylogenetic evidence for a new species of Barbus in the Danube River basin. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 96, 187-194.
- AnvariFar H., Khyabani A., Farahmand H., Vatandoust S., AnvariFar H., Jahageerdar S. (2011). Detection of morphometric differentiation between isolated up- and downstream populations of Siah Mahi (*Capoeta capoeta gracilis*) (Pisces: Cyprinidae) in the Tajan River (Iran). *Hydrobiologia*, 673, 41-52.
- Aoki K., Okamoto M., Tatsumi K., Ishikawa Y. (1997). Cryopreservation of medaka spermatozoa. *Zoological Science*, 14, 641-644.
- Arthington A.H., Dulvy N.K., Gladstone W., Winfield I.J. (2016). Fish Conservation in Freshwater and Marine Realms: Status, Threats and Management. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 26 (5), 838-857.

- Asturiano J., Cabrita E., Horváth Á. (2017). Progress, challenges and perspectives on fish gamete cryopreservation: A mini-review. *General and Comparative Endocrinology*, 247, 69-76.
- Asturiano J.F., Pérez L., Marco-Jiménez F., Olivares L., Vicente J. S., Jover M. (2003). Media and methods for the cryopreservation of European eel (*Anguilla anguilla*) sperm. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28, 501-502.
- Athurapana R., Takahashi D., Ioki S., Funahashi H. (2015). Trehalose in glycerol-free freezing extender enhances post-thaw survival of boar spermatozoa. *Journal of Reproduction and Development*, 61(3), 205-210.
- Balian E, Harrison I, Butchart S, Chambers P, Cordeiro J, Cumberlidge N, de Moor F, Gascon C, James H, Kalkman V, van Dijk PP, Yeo D. (2010). Chapter 2. Diversity of Species in Freshwater Systems: *In: Mittermeier R.A., Farrell T., Harrison I.J., Uppgren, A.J., Brooks T. (eds.), Freshwater - the essence of Life, Conservation International and Cemex Conservation Book Series, Earth in Focus Editions, China, 50-89 pp.*
- Banarescu P. (1973). Origin and affinities of the freshwater fish fauna of Europe. *Ichthyologia*, 5, 1-8.
- Baračkov Z. (1973). Ekološka proučavanja naselja dna Grošničke reke. Magistarski rad. Prirodno-matematički fakultet. Kragujevac.
- Bassem SM. (2020). Water pollution and aquatic biodiversity. *Biodiversity International Journal*, 4(1), 10–16.
- Baxter R.M. (1977). Environmental effects of dams and impoundments. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 8, 255-283.
- Beirão J., Perez-Cerezales S., Martínez-Páramo S., Herraiz P. (2011). Effect of cryopreservation on fish sperm subpopulations. *Cryobiology*, 62(1), 22-31.
- Bernáth G., Csenki Z., Bokor Z., Várkonyi L., Molnár J., Szabó T., Staszny Á., Ferincz Á., Szabó K., Urbányi B., Pap L., Csorbai B. (2018). The effects of different preservation methods on ide (*Leuciscus idus*) sperm and the longevity of sperm movement. *Cryobiology*, 81, 125-131.
- Berrebi P. (1995). Speciation of the genus *Barbus* in the north Mediterranean basin: Recent advances from biochemical genetics. *Biology Conservation*, 72, 237-249.
- Bertoli M., Pizzul E., Devescovi V., Franz F., Pastorino P., Giulianini P.G., Ferrari C., Nonnis Marzano F. (2019). Biology and distribution of Danube barbel (*Barbus balcanicus*) (Osteichthyes: Cyprinidae) at the Northwestern limit of its range. *The European Zoological Journal*, 89, 280-293.
- Bookstein F.L. (1991). Morphometric tools for landmarks data. Geometry and biology. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Brennan S. & Withgott J. (2005). Environment; the science behind the stories. Pearson Education, Inc., Benjamin Cummings, San Francisco.

- Brody S. (1927). Growth and development with special reference to domestic animals. III. Growth rates, their evaluation and significance. *Missouri Research Bulletin*, 97.
- Brody S. (1945). Bioenergetics and Growth. Rheinhold Publishing, New York.
- Brönmark C. & Pettersson L.B. (1994). Chemical cues from piscivores induce a change in morphology in Crucian carp. *Oikos*, 7, 396-402.
- Buonerba L., Zaccara, S., Delmastro G.B., Lorenzoni M., Salzburger W., Gante H.F. (2015). Intrinsic and extrinsic factors act at different spatial and temporal scales to shape population structure, distribution and speciation in Italian Barbus (Osteichthyes: Cyprinidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 89, 115-129.
- Cabrita E., Anel L., Herraes M.P., (2001). Effect of different external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreservation of rainbow trout sperm. *Theriogenology*, 56, 623-635.
- Cabrita E., Engrola S., Conceicao L.E.C., Pousao-Ferreira P., Dinis M.T. (2008). Successful cryopreservation of sperm from a sex-reversed dusky grouper, *Epinephelus marginatus*, *Aquaculture*, 287(1-2), 152-157.
- Cabrita E., Sarasquete C., Martinez-Paramo S., Robles V., Beirao, J., Perez-Cerezales., Herraes M.P. (2010). Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *Journal of Applied Ichthyology*, 26, 623-635.
- Caldecutt W.J., Bell M.A., Buckland-Nicks J.A. (2001). Sexual dimorphism and geographic variation in dentition of threespine stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Copeia*, 2001, 936-944.
- Canonico C, Arthington A, McCrary JK, Thieme ML. (2005). The effects of introduced tilapias on native biodiversity. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 15, 463-483.
- Chapman D.W. (1967). Production in fish populations. In: Gerking S.D. (ed.), *The Biological Basis of Freshwater Fish Production*. Black-well, Oxford, 495 pp.
- Ciereszko A., Dietrich G.J., Nynca J., Liszewska, E., Karol, H., Dobosz, S.(2013).The use of concentrated extenders to improve the efficacy of cryopreservation in whitefish spermatozoa. *Aquaculture*, 408-409, 30-33.
- Clement M., Snell Q., Walker P., Posada D., Crandall K. (2002). TCS: Estimating gene genealogies. Parallel and Distributed Processing Symposium, International Proceedings, 2, 184.
- Čomić Lj. & Ostojić A. (2005). Akumulaciono jezero Gruža. Prirodno-matematički fakultet. Kragujevac.
- Cortes R.M., Ferreira M.T., Oliveira S.V., Oliveira D.G. (2002). Macroinvertebrate community structure in a regulated river segment with different flow conditions. *River Research and Applications*, 18, 367-382.

- Crispo E. & Chapman L. (2010). Geographic variation in phenotypic plasticity in response to dissolved oxygen in an African cihlid fish. *Journal of evolutionary biology*, 23, 2091-103.
- Cureton J.C. & Broughton R.E. (2014). Rapid morphological divergence of a stream fish in response to changes in water flow. *Biology Letters*, 10 (6), 2014.
- Cvijanović G. (2016). Morfološka i genetička diferencijacija kečige (*Acipenser ruthenus* L.) u srednjem i donjem toku Dunava. Doktorska disertacija. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- De Leeuw F.E., De Leeuw A.M., Den Daas J.H.G., Colenbrander B., Verkleij A.J. (1993). Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, 30, 32-44.
- De Silva, S., Abey N. & Nguyen T. (2007). Endemic freshwater finfish of Asia: distribution and conservation status. *Diversity and Distributions*, 13, (172-184).
- Dietrich G., Wolnicki J., Słowińska M., Sikorska J., Hliwa P., Kamiński R., Liszewska E., Ciereszko A. (2015). Short-term storage and cryopreservation of lake minnow (*Eupallasella percnurus* (Pallas, 1814)) sperm. *Journal of Applied Ichthyology*, 31, 75-78.
- Dietrich G.J., Nynca J., Szczepkowski M., Dobosz S., Szczepkowska B., Ciereszko A. (2016). The effect of cryopreservation of semen from white fish (*Coregonus lavaretus*) and northern pike (*Esox lucius*) using a glucose-methanol extender on sperm motility parameters and fertilizing ability. *Aquaculture*, 464, 60-64.
- Dorado J., Galvez M.J., Murabito M.R., Munoz-Serrano A., Hidalgo M. (2011). Identification of sperm subpopulations in canine ejaculates: Effects of cold storage and egg yolk concentration. *Animal Reproduction Science*, 127, 106-113.
- Dudgeon D., Arthington A. H., Gessner M. O., Kawabata Z. I., Knowler D. J., Lévêque C., Naiman R. J., Prieur-Richard A. H., Soto D., Stiassny M. L. J. & Sullivan C. A. (2006). Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological reviews* 81(2), 163-182.
- Economidis P.S. (1989). Distribution pattern of the genus *Barbus* (Pisces, Cyprinidae) in the freshwaters of Greece. *Travaux du Muséum National d' Histoire Naturelle Grigore Antipa Bucarest*, 30, 223-229.
- Economidis P.S., Sorič V.M., Bănărescu P.M. (2003). *Barbus peloponnesius Valenciennes*, 1842. In: Bănărescu P.M. & Bogutskaya N.G. (eds.) The freshwater fishes of Europe. 5/II Cyprinidae 2, part II: *Barbus*. AULA-Verlag, Wiebelsheim, 301-337 pp.
- Fairbairn D.J., Blanckenhorn W.U., Szekely T. eds. (2007). Sex, size and gender roles: evolutionary studies of sexual size dimorphism. Oxford University Press, Oxford, U.K.
- Ford E. (1933). An account of the herring investigations conducted at Plymouth during the years from 1924-1933. *Journal of Marine Biology*, 19, 305-384.

- Foster K., Bower L., Piller K. (2015). Getting in shape: habitat-based morphological divergence for two sympatric fishes. *Biological Journal of the Linnean Society*, 114, 152-162.
- Franssen N.R. (2011). Anthropogenic habitat alteration induces rapid morphological divergence in a native stream fish. *Evolutionary Applications*, 4, 791-804.
- Freyhof J. (2012). Threatened freshwater fishes and molluscs of the Balkan, Potential impact of hydropower projects. Unpublished report. ECA Watch Austria & EuroNatur, 81 pp.
- Freyhof J. (2012). Threatened freshwater fishes and molluscs of the Balkan, Potential impact of hydropower projects. Unpublished report, ECA Watch Austria & EuroNatur, 81 pp.
- Fulton T.W. (1902). The rate of growth of fishes. *20th Annual Report of the Fishery Board of Scotland*, 3, 326-446.
- Gallego V., Cavalcante S., Fujimoto R., Carneiro P., Azevedo H., Maria A. (2017). Fish sperm subpopulations: changes after cryopreservation process and relationship with fertilization success in tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Teriogenology*, 87, 16-24.
- Gante H.F. (2011). Diversification of circum-mediterranean barbels. In: Grillo O, & Venora G. (eds.), Changing diversity in changing environment. InTech; Rijeka, 283-298 pp.
- Gaston K.A. & Lauer T.E. (2015). Morphometric variation in bluegill *Lepomis macrochirus* and green sunfish *Lepomis cyanellus* in lentic and lotic systems. *Journal of Fish Biology*, 86, 317-332.
- Gavrilović Lj. & Dukić D. (2002). Reke Srbije. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva. Beograd, 208.
- Geist J. & Hawkins S. (2016). Habitat recovery and restoration in aquatic ecosystems: current progress and future challenges. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 26, 942-962.
- Geist, J. (2011). Integrative freshwater ecology and biodiversity conservation. *Ecological Indicators*, 11, 1507-1516
- Gerking S.D. (1953). Evidence for the concepts of home range and territory in stream fishes. *Ecology*, 34, 347-365.
- Giannetto D., Carosi A., Ghetti L., Pedicillo G., Pompei L., Lorenzoni M. (2013). Ecological traits of *Squalus lucumonis* (Actinopterygii, Cyprinidae) and main differences with those of *Squalius squalus* in the Tiber River Basin (Italy). *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 469(04).
- Glogowski J., Babiak I., Luczynski M.J., Luczynski M. (1997). Factors affecting cryopreservation efficiency and enzyme activity in Northern Pike, *Esox lucius*, sperm. *Journal of Applied Aquaculture*, 7(4), 53-67.

- Good P. (1994). *Permutation Tests: A Practical Guide to Resampling Methods for Testing Hypotheses*. Springer-Verlag, New York.
- Green A.J. (2000). Sexual dimorphism in morphometry and allometry in the Marbled Teal *Marmaronetta angustirostris*. *Journal of Avian Biology*, 31, 345-350.
- Groombridge B. & Jenkins M. (1998). *Freshwater biodiversity: a preliminary global assessment*. WCMC-World Conservation Press, Cambridge, 104 pp.
- Haas T.C., Blum M.J. Heins D.C. (2010). Morphological responses of a stream fish to water impoundment. *Biology Letters*, 6, 803-806.
- Hakansson J. (2004). *Genetic Aspects of Ex Situ Conservation: Introductory Paper*, Department of Biology, Linköping University.
- Hamackova J., Kouril J., Kozak P., Stupka Z. (2006). Clove oil as an anaesthetic for different freshwater fish species. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 12, 185-194.
- Hassell E., Meyers P., Billman E., Rasmussen J., Belk M. (2012). Ontogeny and sex alter the effect of predation on body shape in a livebearing fish: sexual dimorphism, parallelism, and costs of reproduction. *Ecology and Evolution*, 2(7), 1738-1746.
- He F., Zarfl C., Bremerich V., Henshaw A., Darwall W., Tockner K., Jahnig S.C. (2017). Disappearing giants: a review of threats to freshwater megafauna. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Water*, 4, e1208
- Heino M. & Kaitala V. (1999). Evolution of resource allocation between growth and reproduction in animals with indeterminate growth. *Journal of Evolutionary Biology*, 12, 423-429.
- Heinrichs J., Bender D., Schumaker N. (2016). Habitat degradation and loss as key drivers of regional population extinction. *Ecological Modelling*, 335, 64-73.
- Hendry A.P., Grant P.R., Grant B.R., Ford H.A., Brewer M.J., Podos J. (2006). Possible human impacts on adaptive radiation: beak size bimodality in Darwin's finches. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273, 1887-1894.
- Horváth Á., Miskolczi E., Urbányi B. (2003). Cryopreservation of common carp sperm. *Aquatic Living Resources*, 16, 457-460.
- Howes G. J. (1987). The phylogenetic position of the Yugoslavian Cyprinid fish genus *Aulopyge* Hackel, 1841, with an appraisal of the genus *Barbus* Cuvier and Cloquet, 1816, and the subfamily Cyprinidae. *Bulletin of the British Museum (Natural History)*, (Zool)52, 165-196.
- Hudman S. & Gido K. (2013). Multi-scale effects of impoundments on genetic structure of creek chub (*Semotilus atromaculatus*) in the Kansas River basin. *Freshwater Biology*, 58, 441-453.
- Huet M. (1964). The évaluation of the fish productivity in freshwater (the coefficient of productivity k). *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*, 15, 524-528.

- Ingam T. (2015). Diversification of body shape in *Sebastes* rockfishes of the north-east Pacific. *Biological Journal of the Linnean Society*, 116, 805-818.
- Jacquemin J. S. & Pyron M. (2014). Effects of Allometry, Sex, and River Location on Morphological Variation of Freshwater Drum *Aplodinotus grunniens* in the Wabash River, USA. *Copeia*, 2013, 740-749.
- Jalili P., Eagderi S., Keivany, Y. (2015). Body shape comparison of Kura bleak (*Alburnus filippii*) in Aras and Ahar-Chai rivers using geometric morphometric approach. *Research in Zoology*, 5(1), 20-24.
- Jobling M. (2008). Environmental factors and rates of development and growth. In: Hart P.J.B. & Reynolds J.D. (eds.), *Handbook of Fish Biology and Fisheries*, vol 1, Blackwell Publishing Ltd. Oxford, UK, 97-122 pp.
- Judycka S., Slowińska M., Nynca J., Liszewska E., Dobosz S., Ciereszk, A. (2020). Effects of glucose, methanol concentration, and time of equilibration on post-thaw sperm motility of rainbow trout semen. *Aquaculture*, 520, 734-996.
- Kasso M. & Balakrishnan M. (2013). Ex situ conservation of biodiversity with particular emphasis to Ethiopia. Hindawi Publishing Corporation, *ISRN Biodiversity*, 2013, 11.
- Karaman M. (1974). Razvojni put vrsta mrena iz roda *Barbus* posebnim osvrtom na problematiku balkanskih formi. (Distribution and phylogenetic consideration of the genus *Barbus* barbels with the special emphasis on the Balkan forms) *Zbornik radova, PMF u Prištini*, 1, 59-69.
- Khaefi R., Esmaili H.R., Geiger M.F., Soheil Eagderi S. (2017). Taxonomic review of the cryptic *Barbus lacerta* species group with description of a new species (Teleostei: Cyprinidae). *FishTaxa*, 2(2), 90-115.
- Kime D.E., Van Look K.J.W., McAllister B.G., Huyskens G., Rurangwa E., Ollevier F. (2001). Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 130, 425- 433.
- Kingsford T. (2000). Ecological impacts of dams, water diversions and river management on floodplain wetlands in Australia. *Australian Ecology*, 25, 109-127.
- Klingenberg C.P. (2011). MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, 11, 353-357.
- Klingenberg C.P., Barluenga M., Meyer A. (2003). Body shape variation in cichlid fishes of the *Amphilophus citrinellus* species complex. *Biological Journal of the Linnean Society*, 80, 397-408.
- Koehl M. (1996). When does morphology matter? *Annual Review of Ecology and Systematics*, 27, 501- 542.
- Koh I.C.C., Yokoi K., Tsuji M., Tsuchihashi Y., Ohta H. (2010). Cryopreservation of sperm from seven-band grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. *Cryobiology*, 61(3), 263-267.

- Kojadinović N., Marinović Z., Veličković T., Milošković A., Jakovljević M., Horvát A., Simić V. (2020). Cryopreservation of Danube barbel *Barbus balcanicus* sperm and its effects on sperm subpopulation structure. *Archives of Biological Sciences*, <https://doi.org/10.2298/ABS200831046K>.
- Konopiński M.K., Amirowicz A., Kotlík P., Kukuła K., Bylak A., Pekarík L., Šediva A. (2013). Back from the Brink: The Holocene History of the Carpathian Barbel *Barbus carpathicus*. *PLoS ONE*, 8(12), e82464.
- Kopeika E., Kopeika J., Zhang T. (2007). Cryopreservation of fish sperm. *Methods in Molecular Biology*, 368, 203-217.
- Kotlík P. & Berrebi P. (2002). Genetic subdivision and biogeography of the Danubian rheophilic barbel *Barbus petenyi* inferred from phylogenetic analysis of mitochondrial DNA variation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 24, 10-18.
- Kotlík P., Tsigenopoulos C., Ráb P. Berrebi P. (2002). Two new *Barbus* species from the Danube River basin, with redescription of *B. petenyi* (Teleostei: Cyprinidae). *Folia Zoologica*, 51, 227-240.
- Kottelat M. & Freyhof J. (2007). Handbook of European freshwater fishes. Publications Kottelat, Cornol and Freyhof, Berlin, 646 pp.
- Kottelat, M. & Whitten, T. (1996). Freshwater biodiversity in Asia with special reference to fish. World Bank Technical Paper, 343, 59.
- Kumar S., Stecher G. & Tamura K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Kurokura H., Hirano R., Tomita M., Iwahashi M. (1984). Cryopreservation of carp sperm. *Aquaculture*, 37, 267-273.
- Labbe C. & Maiss G. (1996). Influence of rainbow trout thermal acclimation on sperm cryopreservation: relation to change in the lipid composition of the plasma membrane. *Aquaculture*, 145, 281-294.
- Lahnsteiner F., Berger B., Horvath A., Urbanyi B., Weismann T. (2000). Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. *Theriogenology*, 54, 1477-1496.
- Lahnsteiner F., Berger B., Weismann T. (2003). Effects of media, fertilization technique, extender, straw volume, and sperm to egg ratio on hatchability of cyprinid embryos, using cryopreserved semen. *Theriogenology*, 60, 829-41.
- Lahnsteiner F., Weisman T., Patzner R. A. (1992). Fine structural changes in spermatozoa of the grayling, *Thymallus thymallus* (Pisces: Teleostei) during routine cryopreservation. *Aquaculture Research*, 26, 801-807.
- Langerhans R.B. & Reznick D.N. (2009). Ecology and evolution of swimming performance in fishes: predicting evolution with biomechanics. In: Domenici O. & Kapoor

- B.G. (eds), Fish locomotion: an ethoecological perspective. Enfield, NH: Science Publishers, 200-248 pp.
- Langerhans R.B. (2008). Predictability of phenotypic differentiation across flow regimes in fishes. *Integrative and Comparative Biology*, 48, 750-768.
- Le Cren E.D. (1972). Fish production in freshwaters. Symposia of the Zoological Society of London, 29, 115-133.
- Lenhardt M., Micković B., Jakovčev D. (1996). Age, growth, sexual maturity and diet of the mediterranean barbel (*Barbus peloponnesius petenyi*) in the river Gradac (West Serbia, Yugoslavia). *Folia Zoologica*, 45, (1), 33-37.
- Lévêque C. (1997). Biodiversity Dynamics and Conservation: The Freshwater Fish of Tropical Africa. Cambridge University Press.
- Linhart O., Mims S.D., Gomelsky B., Cvetkova L.I., Cosson J., Rodina M., Horvath A., Urbanyi B. (2006). Effect of cryoprotectants and male on motility parameters and fertilization rate in paddle fish (*Polyodon spathula*) frozen-thawed spermatozoa. *Journal of Applied Ichthyology*, 22(1), 389-394.
- Lostrom S., Evans J.P., Grierson P.F., Collin S.P., Davies P.M., Kelley J.L. (2015). Linking stream ecology with morphological variability in a native freshwater fish from semi-arid. *Australian Ecology*, 5, 3272-3287.
- Lujić J., Bernáth G., Marinović Z., Radojković N., Simić V., Ćirković M., Urbányi B., Horváth Á. (2015). Fertilizing capacity and motility of tench *Tinca tinca* (L., 1758) sperm following cryopreservation. *Aquaculture Research*, 48, 102-110.
- Machodrom A. & Doadrio I. (2001). Evolutionary history and speciation modes in the cyprinid genus *Barbus*. Proceedings of the Royal Society.
- Maitland P.S. Morgan N.C. (1997). Conservation Management of Freshwater Habitats. Springer Netherlands, 9, 233 pp.
- Marco-Jiménez F., Garzon D.L., Peñaranda D.S., Pérez L., Viudes-de-Castro M.P., Vicente J.S., Jover M., Asturiano J.F. (2006). Cryopreservation of European eel (*Anguilla anguilla*) spermatozoa: Effects of dilution ration, foetal bovine serum supplementation and cryoprotectants. *Cryobiology*, 53 (2006), 51-57.
- Marić S., Rakočević J., Marić D. (2012). Morphological characteristics of barbels (*Barbus*, Cyprinidae) from the waters of Montenegro. *Natura Montenegrina*, 11(2), 79-92.
- Marić D., (2019). Fauna slatkovodnih riba (Osteichthyes) Crne Gore, Posebna izdanja (monografije i studije), 149, Odjeljenje prirodnih nauka, 48, Crnogorska akademija nauka i umjetnosti, Podgorica.
- Markova S., Sanda R., Crivelli A., Shumka S., Wilson I.F., Vukic J., Berrebi P. Kotlik P. (2010). Nuclear and mitochondrial data reveal the evolutionary history of *Barbus* (Cyprinidae) in the ancient lake systems of the Balkans. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55 (2), 488-500.

- Martínez-Páramo S., Diogo P., Dinis M. P., Soares F., Sarasquete C., Cabrita E. (2013). Effect of two sulfur-containing amino acids, taurine and hypotaurine in European sea bass (*Decentrarchus labrax*) sperm cryopreservation. *Cryobiology*, 66, 333-338.
- Martínez-Páramo S., Diogo P., Dinis T., Herráez P., Sarasquete C., Cabrita E. (2013). Incorporation of ascorbic acid and α -tocopherol to the extender media to enhance antioxidant system of cryopreserved sea bass sperm. *Theriogenology*, 77(6), 1129-1136.
- Martínez-Páramo S., HorváthÁ., Labbé C., Zhang T., Robles V.,Herráez P., Suquet P., Adams P., Viveiros A., Tierse T., Cabrita E. (2017). Cryobanking of aquatic species. *Aquaculture*, 472, 156-177.
- Martínez-Pastor F., Cabrita E., Soares F., Anel L., Dinis M.T. (2008). Multivariate cluster analysis to study motility activation of *Solea senegalensis* spermatozoa: a model for marine teleosts. *Reproduction*, 135, 449-459.
- Mazur P. (2004). Principal of cryobiology, *In*: Fuller B., Lane N., Benson E. (eds.), Life in Frosen State. CRC Press, New York, 1-65 pp.
- McAllister D.E., Craig J.F., Davidson N., Delany S., Seddon M. (2001). Biodiversity Impacts of Large Dams Background Paper Nr. 1.Prepared for IUCN/UNEP/WCD.
- McCartney M. (2009). Living with dams: managing the environmental impacts. *Water Policy*, 1, 121-139.
- McCluney K.E., Poff N.L., Palmer M. A., Thorp J.H., Poole G.C., Williams B.S., Williams M.R., Baron J.S. (2014). Riverine macrosystems ecology: sensitivity, resistance, and resilience of whole river basins with human alterations. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 12, 48-58.
- McGuigan K., Franklin C.E., Moritz C. Blows. M.W. (2003). Adaptation of rainbow fish to lake and stream habitats. *Evolution*, 57, 104-118.
- Milankov V. (2007). Osnove konzervacione biologije I. PMF, Departman za biologiju i ekologiju, Novi Sad.
- Milanović A. (2006). Hidrološka prognoza velikih voda u slivu Lepenice i zaštita od poplava. Glasnik Srpskog geografskog društva.
- Mitteroecker P., Gunz P., Windhager S.,Schaefer K. (2013). A brief review of shape, form, and allometry in geometric morphometrics, with applications to human facial morphology. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 24, 59-66.
- Mohaddasi M., Shabanipour N., Eagderi S., Yazdi A. (2013). Habitat-associated morphological divergence in four Shemaya, *Alburnus chalcoides* (Actinopterygii: Cyprinidae) populations in the southern Caspian Sea using geometrics analysis. *International Journal of Aquatic Biology*, 1(2), 82-92.
- Morita K. & Yamamoto S. (2002). Effect of habitat fragmentation by damming on the persistence of stream-dwelling charr populations. *Conservation Biology*, 16, 1318-1323.

- Mrakovčić M., Brigić A., Buj I., Čaleta M., Mustafić P., Zanella D. (2006). Red book of freshwater fish of Croatia. Ministry of Culture, State Institute for Nature Protection, Republic of Croatia, 253 pp.
- Muiño R., Pena A.I., Rodriguez A., Tamargo C., Hidalgo C.O. (2009). Effects of cryopreservation on the motile sperm subpopulations in semen from Asturiana de los Valles bulls. *Theriogenology*, 72, 860-868.
- Muiño R., Tamargo C., Hidalgo C.O., Pena A.I. (2008). Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: Effects of cryopreservation and between-bull variation. *Animal Reproduction Science*, 109, 27-39.
- Myers B., Dolloff A., Webster J., Nislow K., Fair B., Rypel A. (2017). Fish assemblage production estimates in Appalachian streams across a latitudinal and temperature gradient. *Ecology Freshwater Fish*, 2017, 1-15.
- Nelson J.S. (1994). Fishes of the world, 3rd edition. Wiley, New York, Chichester, Brisbane, Toronto & Singapore, 600 pp.
- Nynca J., Dietrich G.J., Dobosz S., Grudniewska J., Ciereszko A. (2014). Efficient method for cryopreservation of brown trout semen. *Aquaculture*, 433, 62-65.
- Nynca J., Judycka S., Liszewska E., Dobosz S., Grudniewska J., Arai K., Fujimoto T., Ciereszko A. (2016). Utility of different sugar extenders for cryopreservation and post-thaw storage of sperm from Salmonidae species. *Aquaculture*, 464, 340-8.
- Oliveira R.F., & Almada V.C. (1995). Sexual dimorphism and allometry of external morphology in *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Fish Biology*, 46, 1055-1064.
- Perea S., Böhme M., Zupančič P. (2010). Phylogenetic relationships and biogeographical patterns in Circum-Mediterranean subfamily Leuciscinae (Teleostei, Cyprinidae) inferred from both mitochondrial and nuclear data. *BMC Evolution Biology*, 10, 265.
- Perrin N. & Sibly R.M. (1993). Dynamic models of energy allocation and investment. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 24, 379-410.
- Pešić S. (2011). Osnovi ekologije. Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno-matematički fakultet, 303 str.
- Petrović A. (2014). Mogućnosti korišćenja baze podataka u strategiji konzervacije biodiverziteta makrobeskičmenjaka kopnenih voda na nacionalnom nivou. Doktorska disertacija. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevcu.
- Piria M., Treer T., Aničić I., Tomljanović T., Safner R. (2007). Hranidba mrene *Barbus peloponnesius* (Valenciennes, 1842) iz rijeke Save. *Ribarstvo*, 65(1), 1-14.
- Poff L. & Hart D. (2002). How Dams Vary and Why It Matters for the Emerging Science of Dam Removal. *BioScience*, 52, 83.

- Pompei L., Giannetto D., Lorenzoni M. (2016). Reproductive parameters in native and non-native areas of *Padogobius bonelli* and comparison with *P. nigricans* (Actynopterygii, Gobiidae). *Hydrobiologia*, 779, 173-182.
- Poulet N., Berrebi P., Crivelli J., Lek S., Argillier C. (2004). Genetic and morphometric variations in the pikeperch (*Sander lucioperca* L.) of a fragmented delta. *Archiv für Hydrobiologie*, 159, 531-554.
- Quintero-Moreno A., Míro J., Rigau T., Rodríguez-Gil J. (2003). Identification of sperm subpopulation with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology*, 58, 1973-1990.
- Raby G.D., Colotelo A.H., Blouin-Demers G., Cooke S.J. (2011). Freshwater commercial by catch: an understated conservation problem. *BioScience*, 61, 271-280.
- Radojković N., Marinović, Z., Milošković A., Radenković, M., Đuretanić, S., Lujčić, J., Simić V. (2019). Effects of Stream Damming on Morphological Variability of Fish: Case Study on Large Spot Barbell *Barbus balcanicus*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 19(3), 231-239.
- Reynolds J. B. (1985). Relative length: a comparative approach to fish growth. International Symposium of Age & Growth Fish. Abstracts, 69.
- Ricker W.E. (1971). *Methods for Assessment of Fish Production in Fresh Waters*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Ricker W.E. (1975). Computation and Interpretation of Biological Statistics of Fish Populations. *Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada*, 119.
- Ristivojević P. (2014). Određivanje hemjskog sastava, antioksidantnih i antimikrobnih svojstava propolisa topola tipa iz različitih regiona Srbije. Doktorska disertacija, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Rohlf F.J. & Slice D. (1990). Extensions of the Procrustes Method for the Optimal Superimposition of Landmarks. *Systematic Biology*, 39, 40-59.
- Rohlf F.J. (2005). tpsDig program, version 2.04. Stony Brook, NY: Department of Ecology & Evolution, SUNY.
- Rohlf, F.J. (2008). tpsUtil program, version 1.40. Stony Brook, NY: Department of Ecology & Evolution, SUNY.
- Saad A. & Billard R. (1987). Spermatozoa production and volume of semen collected after hormonal stimulation in the carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, 65, 67-77.
- Samardžić M. (2013). Vremensko i prostorno rasprostiranje zagađivača u slivu Velike Morave. Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Santos A.B. & Araújo F.G. (2015). Evidence of morphological differences between *Astyanax bimaculatus* (Actinopterygii: Characidae) from reaches above and below dams on a tropical river. *Environmental Biology of Fishes*, 98, 183-191.

- Sapounidis A.S., Kountrakis E.T., Leonardos I.D. (2015). Life history traits, growth and feeding ecology of a native species (*Barbus strumicae* Karaman, 1955) in Nestos River, a flow regulated river in northern Greece. *North-Western Journal of Zoology*, 11 (2), 331-341.
- Saunders D., Hoops R., Margules C. (1991). Biological Consequences of Ecosystem Fragmentation: A Review. *Conservation Biology*, 5, 18-32.
- Schmutz S. & Jungwirth M. (1999). Fish as indicators of large river connectivity: the Danube and its tributaries. *Archiv Hydrobiologie*, 3, 329-348.
- Schnell J.K., Harris G.M., Pimm S.L., Russell G.J. (2013). Estimating extinction risk with metapopulation models of large-scale fragmentation. *Conservation Biology*, 3, 520-30.
- Sekulić N. (2013). Ekološke karakteristike i morfološko-genetička diferencijacija populacija crнке (*Umbra krameri* Walbaum, 1792) sa područja Bačke, Mačve i Semberije. Doktorska disertacija. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Seliger C. & Zeiringer B. (2018). River Connectivity, Habitat Fragmentation and Related Restoration Measures. In: Schmutz S. & Sendzimir J. (eds.), Riverine Ecosystem Management. Aquatic Ecology Series, vol 8. Springer, 171-186 pp.
- Sequeira V., Rodrigues-Mendoza R., Neves A., Paiva R., Saborido-Rey F., Seerano Gordo L. (2011). Using body geometric morphometrics to identify bluemouth, *Helicolenus dactylopterus* (Delaroché, 1809) populations in the Northeastern Atlantic. *Hydrobiologia*, 669, 133-141.
- Sequeira V., Rodrigues-Mendoza R., Neves A., Paiva R., Saborido-Rey, F., Seerano Gordo, L. (2011). Using body geometric morphometrics to identify bluemouth. *Hydrobiologia*, 669, 133-141.
- Shen Y., Cao H., Tang M., Deng H. (2017). The Human Threat to River Ecosystems at the Watershed Scale: An Ecological Security Assessment of the Songhua River Basin, Northeast China. *Water*, 9, 219.
- Silva G., Fabio R., Lujan N., Tagliacollo V., Zawadzki C., Oliviera C. (2016). Transcontinental dispersal, ecological opportunity and origins of an adaptive radiation in the Neotropical catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae). *Molecular Ecology*, 7, 1511-1529.
- Simić V., Maguire I., Rajković M., Petrović A. (2015). Conservation Strategy for the Endangered crayfish species of the family Astacidae: the ESHIPPOcrayfish model. *Hydrobiologia*, 760 (1), 1-13.
- Simić V., Simić S., Stojković-Piperac M., Petrović A., Milošević D. (2014). Commercial fish species of inland waters: a model for sustainability assessment and management. *Science of Total Environment*, 497-498, 642-650.
- Simić V.M., Simić S.B., Paunovic M.M., Radojković N., Petrović A., Talevski T., Milosević Dj.D. (2016). The Alburnus benthopelagic fish species of the Western Balkan Peninsula: An assessment of their sustainable use. *Science of the Total Environment*, 540, 410-417.

- Simonović P. (2010). Uvod u ihtiologiju. Univerzitet u Beogradu. Biološki fakultet.
- Simonović P., Marić S., Tošić A., Škraba Jurlina D., Nikolić V. (2018). Morphological and Molecular Differentiation between Rheophilic Barbels *Barbus* spp. (Cyprinidae) from Headwaters at the Divide between Drainage Areas of the Danube, Vardar and Struma Rivers, Central Balkans. *Acta Zoologica Bulgarica*, 70 (2), 2018, 153-16.
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175, 184-191.
- Šorić V. (1992). The structure of population and reproductive potential of *Barbus peloponnesius petenyi* (Cyprinidae, Pisces) in the Gruža River. Collection of Scientific Papers, Faculty of Science, Kragujevac, 13, 65-74.
- Šorić V., Janković D. (1989). Characteristics of growth and sexual maturity of *Barbus meridionalis*. *Ichthyologia*, 21(1), 27-37.
- Stanković S. (1961). Ekologija životinja. Beograd
- Steininger F. & Rögl F. (1984). Paleogeography and palinspastic reconstruction of the Neogene of the Mediterranean and the Paratethys. In: Dixon J.E. & Robertson A.H.F. (eds.), Geological Evolution of the Eastern Mediterranean. Blackwell Sci, Oxford, 659-668 pp.
- Stepanović Ž. (1974). Hidrološke karakteristike Kragujevačke kotline sa posebnim osvrtom na snabdevanje Kragujevca vodom. Fond za finansiranje visokoškolskih ustanova, naučne i naučno izdavačke delatnosti Skupštine opštine Kragujevac. Kragujevac.
- Stevenson R.D. & Woods W.A.Jr. (2006). Condition indices for conservation: new uses for evolving tools. *Integrative and Comparative Biology*, 46, 1169-1190.
- Strayer D.L. (2010). Alien species in fresh waters: ecological effects, interactions with other stressors, and prospects for the future. *Freshwater Biology*, 55, 152-174.
- Suquet M., Dreanno C., Fauvel C., Cosson J., Billard R. (2000). Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research*, 31, 231-243.
- Swain D.P., Riddell B.E. Murray C.B. (1991). Morphological Differences between Hatchery and Wild Populations of Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*): Environmental versus Genetic Origin. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48, 1783-1791.
- Tarkan A.S., Gaygusuz Ö., Acipinar H., Gürsoy C., Özuluğ M. (2006). Length -weight relationship of fishes from the Marmara region (NW-Turkey). *Applied Ichthyology*, 22, 271-273.
- Thompson J.D., Higgins D.G. & Gibson T.J. (1994). CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids research*, 22(22), 4673-4680.

- Thompson P.D. & Rahel F.J. (1998). Evaluation of artificial barriers in small Rocky Mountain streams for preventing the upstream movement of brook trout. *North American Journal of Fisheries Management*, 18, 206-210.
- Tian Y., Jiang J., Wang N., Qi W., Zhai J., Li B., Liang Y., Chen Y., Yang C., Chen S. (2015). Sperm of the giant grouper: cryopreservation, physiological and morphological analysis and application in hybridizations with red spotted grouper. *Journal of Reproduction and Development*, 61, 333-339.
- Tockner K., Uehlinger U., Robinson C. (2009). Rivers of Europe. Elsevier Ltd.
- Tsigenopoulos C.S., Karakousis Y., Berrebi P. (1999). The North Mediterranean *Barbus* lineage: Phylogenetic hypotheses and taxonomic implications based on allozyme data. *Journal of Fish Biology*, 54, 267-286.
- Urbanyi B., Horvath A., Dinnyes A. (1999). Cryopreservation of African catfish (*Clarias gariepinus*) sperm using different cryoprotectants. *Theriogenology*, 51, 296.
- Urbányi B.; Szabó T. Miskolczi E. Mihálffy S. Vranovics K.; Horváth Á. (2006). Successful fertilization and hatching of four European cyprinid species using cryopreserved sperm. *Journal of Applied Ichthyology*, 22, 201- 204.
- Uzunova E., Futekova A., Milanova I., Rashkova L. (2012). Effect of river fragmentation on the abundance and size structure of *Barbus petenyi* (Actinopterygii: Cyprinidae), Iskar river, Bulgaria. *Acta Zoologica Bulgarica*, 4, 205-214.
- Vasiliou A. & Economidis P. (2005). On the life-history of *Barbus peloponnesius* and *Barbus cyclolepis* in Macedonia, Greece. *Folia Zoologica*, 54(3), 316-336.
- Valentine-Rose L., Layman C.A., Arrington D.A., Rypel A.L. (2007). Habitat fragmentation affects fish secondary production in Andros, Bahamas, tidal creeks. *Bulletin of Marine Science*, 80, 863-878.
- Vázquez A.J.F., Cedillo M.J., Quezada V.J., Rivas A.C., Morales E.C.L., Ayala E.M.E., Aragón M.A. (2015). Effects of repeated electroejaculations on kinematic sperm subpopulations and quality markers of Mexican creole goats. *Animal Reproduction Science*, 154, 29- 38.
- Vidal L.B. (2008). Fish as ecological indicators in Mediterranean freshwater ecosystems. Ph.D. Thesis. University of Girona.
- Viveiros A.T., So N., Komen J. (2000). Sperm cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus*: cryoprotectants, freezing rates and sperm: egg dilution ratio. *Theriogenology*, 54, 1395-1408.
- Vuthiphandchai V., Wilairattanadilok K., Chomphuthawach S., Sooksawat T., Nimrat S. (2014). Sperm cryopreservation of silver barb (*Barbodes gonionotus*): Cryoprotectants, cooling rate and storage time on sperm quality. *Aquaculture Research*, 46, 2443-2451.
- Walford L.A. (1946). A new graphic method of describing the growth of animals. *Biological Bulletin*, 90, 141-147.

Walsh B.S., Metzger D.A., Higuchi R. (1991) Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR -based typing from forensic material. *BioTechniques*, 10, 506-513.

Walsh P.S., Metzger D.A., Higuchi R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR based typing from forensic material. *Biotechniques* 4, 506-513.

Ward R., Zemlak T., Innes B., Lastand P., Hebert P. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical transactions of the Royal society*, 360, 1847-1857.

Webb P.W. (1984). Body form, locomotion and foraging in aquatic vertebrates. *American Zoologist*, 24, 107-120.

Yamaner G., Ekici A., Tunçelli G., Memiş D. (2015). A brief overview on cryopreservation method of sturgeon sperm. *Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, 30(2), 14-20.

Yamaner G., Memiş D., Baran, A. (2015). Sperm quality and effects of different cryomedia on spermatozoa motility in first-time spawning of cultured Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt & Ratzeburg, 1833). *Journal of Applied Ichthyology*, 31, 71-74.

Yang H., Carmichael C., Varga Z.M., Tiersch T.R. (2007). Development of a simplified and standardized protocol with potential for high-throughput for sperm cryopreservation in zebrafish *Danio rerio*. *Theriogenology*, 68, 128-136

Żarski D., Horváth Á., Bernáth G., Palińska-Żarska K., Krejszeff S., Müller T., Kucharczyk D. (2014). Application of different activating solutions to in vitro fertilization of crucian carp, *Carassius carassius* (L.) eggs. *Aquaculture International*, 22, 173-18.

Zegeye H. (2016). In situ and ex situ conservation: complementary approaches for maintaining biodiversity. *International Journal of Research in Environmental Studies*, 4, 1-12.

Zhang K., Yang X., Kattel G., Lin Q., Shen J. (2018). Freshwater lake ecosystem shift caused by social-economic transitions in Yangtze River Basin over the past century. *Scientific Reports*, 8, 17146 (2018).

Žutinić P., Jelić P., Jelić M., Buj I. (2014). A contribution to understanding the ecology of the large spot barbell - Sexual dimorphism, growth and population structure of *Barbus balcanicus* (Actinopterygii; Cyprinidae) in Central Croatia. *North-western Journal of Zoology*, 10, 158-166.

Коришћене интернет странице:

<http://www.iucnredlist.org>

<https://www.r-project.org/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

<http://popart.otago.ac.nz>

8. Прилози

ПРИЛОГ 1.

Turk. J. Fish. & Aquat. Sci. 19(3), 231-239
http://doi.org/10.4194/1303-2712-v19_3_06

RESEARCH PAPER



Effects of Stream Damming on Morphological Variability of Fish: Case Study on Large Spot Barbell *Barbus balcanicus*

Nataša Radojković^{1,*}, Zoran Marinović², Aleksandra Milošković¹, Milena Radenković¹, Simona Đuretanić¹, Jelena Lujčić³, Vladica Simić¹

¹ University of Kragujevac, Institute of Biology and Ecology, Faculty of Science Radoja Domanovića 12, 34 000 Kragujevac, Serbia.

² University of Novi Sad, Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad, Serbia and Szent István University, Department of Aquaculture, Gödöllő, Péter Károly u. 1, 2100 Hungary.

³ Szent István University, Department of Aquaculture, Gödöllő, Péter Károly u. 1, 2100 Hungary.

Article History

Received 09 March 2017

Accepted 02 April 2018

First Online 07 April 2018

Corresponding Author

Tel.: +38.165 8706295

E-mail: naca@kg.ac.rs

Keywords

Body shape

Geometric morphometrics

Large spot barbell

Abstract

In the present study, landmark-based geometric morphometrics was applied to compare and visualize the overall size and shape variation, sexual size and shape dimorphism of the species *Barbus balcanicus* Kotlík, Tsigenopoulos, Ráb & Berrebi from different fragmented localities. The body shape of the fish was significantly different both for sex and locality. Also, body size significantly differed between sexes, with females being generally larger than males. This study also proved significant differences in body shape between populations from different localities. Considering that the environmental conditions of the localities were not greatly different from each other, the morphological divergence that was observed may be partly attributed to stream damming, which acts as a stressor, permanently altering the systems and shifting them into new ecological frameworks.

Introduction

Understanding the relationship between the morphology of an organism and its environment is one of the main challenges in ecology (Gaston & Lauer, 2015; Silva *et al.*, 2016). Environmental variation, with its complex and numerous biotic and abiotic factors, has a significant influence on the body shape of individual fish, and thus populations as well. Morphological changes induced by environmental factors can help give a better understanding of the phenotypic plasticity process as result of induced factors (Mohaddasi *et al.*, 2013; Jalili *et al.*, 2015). Therefore, the body shape of fish can be expected to be of particular evolutionary and ecological relevance (Klingenberg *et al.*, 2003).

During the last few decades, the effects of anthropogenic activity on the natural environment have been numerous. Among them, river damming is one of the most influential anthropogenic modifications to riverine ecosystems (Santos & Araújo, 2015). It affects many key aspects of the ecosystem such as hydrologic connectivity, which is crucially important to fish and

other aquatic organisms (Araújo *et al.*, 2013). Impounded streams rapidly change their characteristics from being relatively shallow flowing habitats to being deeper stagnant watercourses, which native stream fishes have likely not experienced during their evolution (Baxter, 1977). Such variations in physical conditions affect the organization, structure and processes of biotic communities (Franchi *et al.*, 2014). Furthermore, construction of dams across streams and rivers affects fish movements, which may lead to the restriction of gene flow and subsequently to differentiation between populations (AnvariFar *et al.*, 2011). Morphometric variation between populations can cause long-term isolation and interbreeding, and this can provide a basis for population differentiation (Bookstein, 1991).

Every dam has unique characteristics and consequently the nature of environmental changes is highly site-specific (McCartney, 2009). In the current literature, there are a number of studies dealing with changes in the body shape of fish in rivers and lakes, or in highly lotic and lentic habitats (Gaston & Lauer, 2015; Franssen, 2011; Haas *et al.*, 2010; Santos & Araújo,

ПРИЛОГ 2.

ACCEPTED MANUSCRIPT

Cryopreservation of Danube barbel *Barbus balcanicus* sperm and its effects on sperm subpopulation structure

Nataša M. Kojadinović^{1,*}, Zoran Marinović², Tijana Z. Veličković¹, Aleksandra M. Milošković³, Marija M. Jakovljević¹, Ákos Horváth² and Vladica M. Simić¹

¹University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Biology and Ecology, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

²Department of Aquaculture, Szent István University, Péter Károly U.1, 2100 Gödöllő, Hungary

³University of Kragujevac, Institute of Information Technologies Kragujevac, Department of Science, Jovana Cvijića bb, 34000 Kragujevac, Serbia

*Corresponding author: natasa.kojadinovic@pmf.kg.ac.rs

Received: August 31, 2020; **Revised:** October 7, 2020; **Accepted:** October 8, 2020; **Published online:** October 13, 2020

Abstract: The objective of this study was to develop a successful freezing protocol for cryopreservation of Danube barbel sperm, and to identify the presence of different spermatozoa subpopulations. By testing different concentrations of different cryoprotectants, we determined that the use of 5% dimethyl sulfoxide (DMSO) yielded the highest total motility of ~25%. Cooling rates influenced by frame height and cooling time in liquid nitrogen vapor showed that a frame height of 3 cm and cooling time of 2 min yielded the highest post-thaw motility. Supplementation of cryomedia with 0.1 M of sugars led to an increase in the total post-thaw motility by ~50%, while protein supplementation lowered post-thaw motility. Motile spermatozoa hierarchically clustered according to their motility parameters, displaying a four-subpopulation (SP1-SP4) structure. SP1 was defined by low values of velocity but high overall linearity; SP2 was comprised of fast non-linear spermatozoa, that had high velocity values but low linearity; SP3 was characterized by fast linear spermatozoa, and SP4 by slow non-linear spermatozoa. Protocols developed in this study will lead to the creation of new and enhanced conservation strategies for this species.

Keywords: Balkan barbel; spermatozoa; fish conservation; sperm subpopulation; Balkan barbel

INTRODUCTION

The Danube barbel, *Barbus balcanicus* [1] is a small rheophilic cyprinid fish that is widespread throughout the mountainous regions of the Danube River basin and several adjacent drainages [2,3]. It inhabits fast or moderate flowing streams and small rivers, which are sensitive ecosystems, where even small environmental changes can lead to changes in the structure of biocenoses. In recent years, native populations of this species are under threats of anthropogenic or natural origin, such as fragmentation, pollution, diseases, flash floods and droughts. It is therefore necessary to take the appropriate action to protect the genetic biodiversity of particular populations [4]. As rheophilic cyprinids are not economically significant in aquaculture, their reproduction has not been sufficiently studied, and to date, very little is known about their reproductive biology.

Cryopreservation is a widely used method in reproductive management, and is especially valuable for the conservation of genetic resources of a wide range of species [5-7]. As protocols for sperm cryopreservation in fish are generally species-specific, their development is essential to preserve unique genetic resources of natural populations. Several sperm cryopreservation methodologies have been successfully tested for cyprinid species; however, there is no available information on the use of this technique for *B. balcanicus*.

БИБЛИОТЕЧКА ДОКУМЕНТАЦИЈА



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОГИЈУ И ЕКОЛОГИЈУ



Радоја Домановића 12, 34000 Крагујевац, Србија

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈА

Редни број	
Тип записа	Текстуални штампани материјал
Врста рада	Докторска дисертација
Аутор	Наташа Којадиновић
Ментор	Проф. др Владица Симић
Наслов рада	Могућност конзервације фрагментисаних популација риба на примеру поточне мрене (<i>Barbus balcanicus</i> Kotlík, Tsigenopoulos, Ráb & Berrebi, 2002)
Језик публикације	Српски (ћирилица)
Језик извода	Српски
Земља публикавања	Србија
Година публикације	2020.
Издавач	Ауторски репринт
Место и адреса	Радоја Домановића 12 34000 Крагујевац, Србија
Научна област	Биологија
Научна дисциплина	Хидробиологија
Предметна одредница/кључне речи	Поточна мрена, конзервација, фрагментација станишта, криопрезервација

Чува се	У библиотеци Природно-математичког факултета у Крагујевцу, Р.Домановића 12, 34000 Крагујевац, Србија
Важна напомена	
Извод	
<p>Врста <i>B. balcanicus</i> је званично описана 2002. године. Насељава потоке и горње токове река, који су често под антропогеним утицајем, пре свега у смислу стварања баријера. Баријере могу да буду предуслов фрагментације станишта која утиче на кључне аспекте екосистема, попут хидролошке повезаности, што је од пресудног значаја за рибе и друге водене организме.</p> <p>Истраживањем је обухваћено девет популација врсте <i>B. balcanicus</i> из пет река које припадају сливу Велике Мораве. Резултати анализе структуре популација указују на одређени степен разлика између истраживаних локалитета. Генетичком карактеризацијом, на основу анализе секвенци <i>COI</i> гена мтДНК, потврђено је да популације обухваћене истраживањем припадају врсти <i>B. balcanicus</i> и констатован је само један хаплотип - Ex65F1. Анализом геометријске морфометрије потврђено је постојање полног диморфизма у величини и облику, као и морфолошка варијабилност између популација узрокована фрагментацијом станишта. Најниже вредности покретљивости сперматозоида констатоване су у фрагментисаним стаништима, и у популацији из Петровачке реке, која је делимично загађена. У овој докторској дисертацији представљен је први успешан протокол за криопрезервацију сперматозоида поточне мрене. Применом модификованог ESHIPPO-ILSFP-RP модела процењен је умерени ризик од нестајања за популације из Грошничке реке, на локалитетима изнад и испод акумулације, као и за Петровачку реку.</p> <p>На основу изложених резултата може се закључити да је фрагментација станишта утицала на популације поточне мрене у погледу структуре популација, морфологије и репродуктивног статуса, који је представљен покретљивошћу сперматозоида.</p>	
Датум прихватања теме од стране ННВ	
Датум одбране	
Чланови комисије	Проф. др Саша Марић Научни сарадник др Александра Милошковић Доцент др Милица Стојковић-Пиперац



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОГИЈУ И ЕКОЛОГИЈУ

Радоја Домановића 12, 34000 Крагујевац, Србија



KEY WORDS DOKUMENTATION

Accession number	
Type of record	Textual material, printed
Contents code	PhD thesis
Author	Nataša Kojadinović
Mentor	Prof. dr Vladica Simić
Title	Conservation possibility of fragmented fish populations on the example of the Danube barbel (<i>Barbus balcanicus</i> Kotlík, Tsigenopoulos, Ráb & Berrebi, 2002)
Language of text	Serbian (Roman) (scr)
Language of abstract	Serbian (Roman) / English
Country of publication	Serbia
Publication year	2020.
Publisher	Copyright reprint
Publisher place	Radoja Domanovića 12 34000 Kragujevac, Serbia
Scientific field	Biology
Scientific discipline	Hydrobiology
Key words	Danube barbel, conservation, fragmented habitats, cryopreservation
Holding data	In library of Faculty of Science, Kragujevac 34000 Kragujevac, Serbia, R. Domanovića 12
Note	

Summary

The species *B. balcanicus* was officially described in 2002. This species inhabits streams and the upper reaches of rivers, which are often altered by anthropogenic activity, primarily by creating barriers. Barriers are a prerequisite for habitat fragmentation that affects key aspects of ecosystems, such as hydrological connectivity, which is crucial for fish and other aquatic organisms.

The research included nine populations of *B. balcanicus* from five rivers belonging to the Velika Morava drainage. The population structure analysis indicated a certain degree of difference between the investigated localities. Based on the mtDNA *COI* gene sequences, genetic characterization confirmed that the populations included in this study belong to the species *B. balcanicus*, with one haplotype detected - Ex65F1. Results of geometric morphometry confirmed the existence of dimorphism in size and shape, and morphological variability between populations, caused by habitat fragmentation. The lowest sperm motility values were detected in fragmented habitats and in population from the Petrovačka River, which is partially polluted. Within this doctoral dissertation, the first successful protocol for cryopreservation of the Danube barbel sperm was presented. Through the modified ESHIPPO-ILSFP-RP model was estimated a moderate risk of extinction for the populations from the Grošnička River, in the localities above and below the reservoir, as well as for the Petrovačka River population.

Based on the presented results, it can be concluded that habitat fragmentation affected the Danube barbel populations in terms of population structure, morphology, and reproductive status, which is represented by sperm motility.

Accepted by Scientific Board on	
Defended on	
Commission	Prof. dr Saša Marić Research Associate Aleksandra Milošković Associate Professor Milica Stojković-Piperac

Биографија

Наташа Којадиновић (рођ. Радојковић) рођена је 06.05.1987. године у Косовској Митровици. Основну и средњу школу завршила је у Зубином Потоку. Природно-математички факултет, Универзитета у Крагујевцу, студијску групу Екологија, уписала је 2005. године и дипломирала 2010. године са просечном оценом 8,55. Дипломски рад под називом „Последице деградације шумског екосистема у шибљак на динамику педомезо- и педомакрофауне“ одбранила је са оценом 10. Докторске академске студије, модул Биологија уписала је 2010. године на истом факултету.

Од новембра 2010 ангажована је као сарадник-волонтер у организационој јединици Центар за рибарство и конзервацију биодиверзитета копнених вода - Акваријум, Природно-математичког факултета у Крагујевцу.

У истраживачко звање истраживач-приправник изабрана је 2011. године, а у звање истраживач сарадник изабрана је 2014. године. У априлу 2014. године засновала је радни однос на Природно-математичком факултету, у оквиру научно-истраживачког пројекта финансиран од стране Министарства просвете и науке Републике Србије. У току докторских студија, била је полазница неколико међународних курсева и обука, у учествовала је на два међународна и једном националном пројекту.

У свом досадашњем научно-истраживачком раду публиковала је 36 библиографских јединица: један практикум (M43 - 1 практикум), десет радова у научним часописима са SCI листе (M21a - 3 рада, M21 - 1 рад, M22 - 2 рада, M23 - 4 рада), три рада у националном часопису (M53 - 3 рада), тринаест саопштења на међународним скуповима штампаних у целини (M33 - 13), седам саопштења на међународним скуповима штампаних у изводу (M34 - 7), једно саопштење са скупа националног значаја штампано у целини (M63 - 1), једно саопштење са скупа националног значаја штампано у изводу (M64 - 1).

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског
рада**

Име и презиме аутора Наташа Којадиновић

Број индекса 17/2010

Студијски програм Биологија

Наслов рада Могућност конзервације фрагментисаних популација риба на примеру
поточне мрене (*Barbus balcanicus* Kottlik, Tsigenopoulos, Ráb & Berrebi,
2002)

Ментор проф. Др Владица Симић

Потписани Наташа Којадиновић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Крагујевцу.

Потпис аутора

У Крагујевцу, 19. 11. 2020. године

Наташа Којадиновић

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Наташа М. Којадиновић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Могућност конзервације фрагментисаних популација риба на примеру поточне мрене (Barbus balcanicus Kotlík, Tsigenopoulos, Ráb & Вегтеби, 2002)

која је одбрањена на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 26.10.2020. године,


потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Наташа М. Којадиновић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

**Могућност конзервације фрагментисаних популација риба на
примеру поточне мрене (*Barbus balcanicus* Kotlík, Tsigenopoulos, Ráb &
Berrebi, 2002)**

која је одбрањена на _____

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

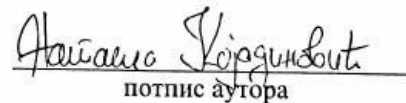
не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- ⑤ Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

у Крагујевцу _____, 26.10.2020. године,


потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљни садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>