

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Горчин Д. Цвијановић

**МОРФОЛОШКА И ГЕНЕТИЧКА
ДИФЕРЕНЦИЈАЦИЈА КЕЧИГЕ (*Acipenser
ruthenus* L.) У СРЕДЊЕМ И ДОЊЕМ ТОКУ
ДУНАВА**

докторска дисертација

Београд, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Gorčin D. Cvijanović

**MORPHOLOGICAL AND GENETIC
DIFFERENTIATION OF STERLET (*Acipenser
ruthenus* L.) FROM THE MIDDLE AND LOWER
DANUBE SECTIONS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

МЕНТОРИ:

Др Тања Аднађевић, научни сарадник

Универзитет у Београду, Институт за биолошка истраживања "Синиша Станковић"

Др Саша Марић, ванредни професор

Универзитет у Београду, Биолошки факултет

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ ЗА ПРЕГЛЕД, ОЦЕНУ И ОДБРАНУ:

Др Тања Аднађевић, научни сарадник

Универзитет у Београду, Институт за биолошка истраживања "Синиша Станковић"

Др Саша Марић, ванредни професор

Универзитет у Београду, Биолошки факултет

Др Вида Јојић, виши научни сарадник

Универзитет у Београду, Институт за биолошка истраживања "Синиша Станковић"

Датум одбране: _____

ЗАХВАЛНИЦА

(односно ко је ко у реализацији једног доктората)

Огромну ЗАХВАЛНОСТ дугујем СВИМА који су на овај или онај начин учествовали у изради докторске дисертације и који ће (надам се) схватити да је навођење имена чисто хронолошки, а никако занемаривање доприноса појединаца. Једноставно, желео сам да урадим нешто другачије.

Са ким је могла да почне цела прича ако не са др Мирјаном Ленхардт. Свако ко је икада радио са њом, свестан је ентузијазма и енергије које она доноси, као и жељу да се увек нађе најбоље решење. То и јесте био разлог што више од тридесет година "шефовица" подстиче нове идеје и методе у праћењу и упознавању јесетри, успоставља сарадњу са свим институцијама и појединцима заинтересованим за ове древне врсте риба. Како би ја другачије доспео до Тулче и Националног института за истраживање и развој делте Дунава?

Наравно, неко је морао да преузме штафету и "унесе" истраживања о јесетрама на овим просторима у XXI век. Да ли би др Јелена Коларевић и др Иван Јарић одобрили поетику код представљања њиховог доприноса нисам сигуран, али то није битно јер они заиста представљају величине. Иако је до свог одласка у Норвешку оставила "само" неколико радова о јесетрама, Јеленина магистратура о екологији Дунавске кечиге могла би бити пример свим докторантима како изгледа одличан докторат који пружа битне информације о заштити једне врсте, а копију коју смо практично "раскупусли" непрестаним листањем представља и даље извор информација и идеја. Да ли би Иван започео своју "јесетарску" миграцију до Немачке и да ли би један еколог као ја решио да се бави и генетиком, питања су са неизвесним одговором да Голум није поставила високе стандарде. Са друге стране, Иванова истраживања о јесетрама могу се доживети као "алхемија", јер је за ту количину и квалитет публикација био довољан само један рачунар, једна конекција са интернетом и један човек. Можда једина особа чији ентузијазам надмашује Мирин, и чије границе истраживачког и људског опуса се не могу ни сагледати.

Ипак, да би се урадио један докторат требало је завршити магистратуру и добити неке идеје о истраживањима. Е ту је немогуће заобићи др Милену Цвијановић, од које сам научио о геометријској морфометрији и од које сам научио да још више сагледам виткост једне рибе, пре него што дам неки суд о њој. Са једним тако значајним сарадником, успео сам да схватим шта су ми битне ствари у (професионалном) животу. Једна је Мица. То ме подсети: да ли сам напоменуо да ми је она супруга?

Да имам шмека и (поготово) гласа, можда би се и одважио да отпевам др Тањи Аднађевић песму из Дизнијевог дугометражног анимираног филма "Књига о џунгли" (1967) "*I Wan'na Be like You*". Њена помоћ око генетике и стрпљење у савладавању методологије, које моје дрхтаве руке и несигурна природа нису могле ни да појме, је немерљива. Колико је живаца било потребно, и колико сам постао досадан и "Богу и људима" понављајући питања, само она има представу.

Наравно, за многе ствари је био потребан човек изнутра (енг. *inside man*), па је проф др Саша Марић са Биолошког факултета био незаменљив. Требало је наћи неког ко пуно зна о рибама, ..., ма ко их (просто) зна у молекул. Можда би неке нереалне идеје кандидата биле смислене када је реч о млађем истраживачу, али је овде требало имати стрпљења.

Е сада, колико сам научио новог о генетици, толико сам схватио да "појма немам" о морфометрији када сам почео да радим са др Видом Јојић. Ипак, радећи са тако изваредним истраживачем, запитао сам се какви су то људи којима је довољан рачунар да праве изванредне публикације. Такође, требало је времена да се увиди да није све у маломе (молекулу), већ има нешто и у величини (барем *CS*).

Шањи има посебне заслуге, јер је увек био доступан за дискусију о кечигама/јесетрама (притом баааш пуно зна), и требало је сетити се многих Руских радова и приближити их мени. "Ја рад иметъ вас как колегу" (ако ме интернет преводиоц није прешао, и ја ти поручио ... ко зна шта). Марија, Жељка, Ђики, Милице, Каћа, Стефане, Мићко, Гачо, Мирославе, ... некада сте ми помагали, некада одмагали, али сте сви део колектива и део радне атмосфере.

И на крају (као и верујем сви докторанти пре мене): ПОРОДИЦА. Знање о аеронаутици (а за потребе разумевања кретања риба, јер му то све дође слично) сам добио од таста (Аце). Лила и Слоба (читај макица и таја) су били ту да ме одмене у неким стварима, и да ме увере како вреди урадити нешто што ће им измамити осећај поноса и задовољства. Описивати помоћ коју сам приватно имао од супруге би истискивало много више папира, али ћу то ипак мало љубоморно чувати за себе, јер је она много више од "само научника" или "само домаћице". Са друге стране, Мила је била ту да запиткује и (самим тим) ме мотивише да ипак завршим све ово, док је Милутин чак успео да укуца по неко слово у литератури. Ипак, њих двоје су разлог зашто се надам да ове странице које следе имају неког смисла и сврхе.

Морфолошка и генетичка диференцијација кечиге (*Acipenser ruthenus* L.) у
средњем и доњем току Дунава

РЕЗИМЕ

Кечига (*Acipenser ruthenus* L., 1758) представља потамодромну јесетарску врсту, која насељава реке у сливовима Црног, Азовског, Каспијског, Балтичког, Белог, Баренцовог и Кара мора. Значајан пад бројности услед излова током XX века довео је до потребе за бољом заштитом, па је на *IUCN* Црвеној листи угрожених врста, кечига сврстана међу рањиве врсте (*VU*). Ради испитивања морфолошке и генетичке диференцијације кечиге у средњем и доњем току Дунава, узорковано је 95 јединки из три популације, од којих две из Србије (Нови Кнежевац на Тиси и Бачка Паланка на Дунаву) и једна популација из Румуније (Гринду на Дунаву). Међупопулациона варијабилност спољашње морфологије (промене величине и облика тела и главеног региона) анализирана је применом метода геометријске морфометрије. Уни- и мултиваријатном анализом варијансе утврђено је постојање статистички значајних разлика у величини и облику анализираних морфолошких целина између јединки са различитих локалитета. Канонијска дискриминантна анализа (*CVA*) укупне варијабилности облика, код латералног и вентралног приказа тела и латералног приказа главеног региона, показала је да се по првој оси раздваја популација из Румуније од популација из Србије. На нивоу вентралне перспективе тела, као и на нивоу обе перспективе главе утврђен је статистички значајан ефекат алометрије на укупну варијабилност облика. На основу *CVA* неалометријске компоненте варијабилности облика тела (вентрална перспектива) и главеног региона (латерална и вентрална перспектива) утврђено је да по првој оси постоји раздвајање јединки из Румуније у односу на јединке из Србије. Такође, *CVA* неалометријске компоненте варијабилности облика главеног региона у обе перспективе указује на могућност да кечиге из Србије (нарочито оне из Тисе) одговарају краткорилој, док кечиге из Румуније одговарају дугорилој форми. Употребом митохондријске ДНК и микросателита као молекуларно-генетичких маркера, детектован је значајан ниво диверзитета (13 хаплотипова, просечан број алела по локусу и популацији 4.3 – 4.9 и добијена хетерозиготност 0.577 – 0.648) али не и јасна диференцијација између популација.

Такође је утврђено постојање пет нових хаплотипова, док је за осам претходно идентификованих хаплотипова проширено распрострањење. Анализа молекуларне варијансе показала је да је генетичка варијабилност скоро у потпуности распоређена између индивидуа и да изостаје међупопулациона варијабилност. Највећа генетичка диференцијација ($F_{ST}=0.038$) уочена је код узорака из Дунава, док је најнижа ($F_{ST}=0.018$) уочена између узорака из Србије (Тиса и Дунав). Није утврђено присуство рецентног "уског грла" ни у једној анализираној популацији. Најниже вредности за ефективну величину популације су забележене на локалитету Бачка Паланка (8.1). Будући да разлике на генетичком нивоу кечига са различитих локалитета у средњем и доњем сливу Дунава изостају, уочене међупопулационе разлике на морфолошком нивоу могу указивати на фенотипску пластичност јединки, односно њихово прилагођавање условима средине. Резултати истраживања овог рада представљају допринос познавању морфолошке и генетичке варијабилности популација кечиге у средњем и доњем току Дунава и могу служити као основа за доношење активних мера у оквиру програма заштите ове угрожене врсте.

Кључне речи: *Acipenser ruthenus*, Србија, Румунија, геометријска морфометрија, генетичка варијабилност, заштита.

Научна област: Биологија

Ужа научна област: Морфологија, Генетика

УДК: [575.822:573.7]:597.423(282.243.7.043+282.243.7.044)

Morphological and genetic differentiation of sterlet (*Acipenser ruthenus* L.) from the
Middle and Lower Danube sections

ABSTRACT

Sterlet (*Acipenser ruthenus* L., 1758) is a potamodromus sturgeon species, which inhabits river stretches of Black, Azov, Caspian, Baltic, White, Barents and Kara sea drainages. Sterlet experienced a decline during 20th century, which led to necessity for better protection, and inclusion on IUCN Red List of endangered species as a vulnerable species (VU). To analyse morphological and genetic differentiation of sterlet in Middle and Lower Danube sections, 95 specimens were sampled from three populations, two from Serbia (Novi Kneževac on Tisza River and Bačka Palanka on Danube River) and one from Romania (Grindu on Danube River). Variability of external morphology (size and shape variation of body and head region) was examined using geometric morphometric methods. Statistically significant interpopulation differences in size and shape of analyzed morphological structures were found. Canonical variate analysis (CVA) of overall shape variation (for lateral and ventral views of body and for lateral view of head region) showed that first CV axis separated Romanian sample from Serbian samples. Statistically significant effect of allometry was observed for ventral view of the body, as well as for lateral and ventral views of the head. CVA of non-allometric component of shape variation for body in ventral view and for head in lateral and ventral views showed separation of Romanian population from Serbian populations. Also, non-allometric shape changes of head in lateral and ventral views correspond to shape differences between blunt-snout and pointed-snout sterlet morphs. Use of mitochondrial DNA and microsatellite markers, showed significant level of diversity (13 haplotypes, allelic richness range from 4.3 to 4.9, observed heterozygosity from 0.577 to 0.648). Genetic analysis (mtDNA and microsatellite) showed lack of clear population differentiation. Additionally, five new haplotypes were detected, while eight previously described haplotypes had extended their previous range. Analysis of molecular variance indicated that the genetic variance could be attributed almost entirely to individuals from same populations and that interpopulation variability was absent. Samples from the Danube River were most divergent ($F_{ST}=0.038$), while lowest F_{ST} (0.018) was observed between samples from

Serbia (Tisza and Danube River). Recent bottleneck was not detected in any of the analyzed populations. Lowest effective population size (8.1) was determined in Bačka Palanka population. The lack of differentiation at genetic level, but the presence of interpopulation differences at morphological level, pointed to phenotypic plasticity of sterlet from Middle and Lower Danube River sections. Findings from this research could contribute to the knowledge about morphological and genetic variability of sterlet populations in Middle and Lower Danube River basin and represent a basis for future conservation programs of this endangered species.

Key words: *Acipenser ruthenus*, Serbia, Romania, geometric morphometrics, genetic variability, conservation.

Scientific field: Biology

Specific scientific field: Morphology, Genetics

UDK: [575.822:573.7]:597.423(282.243.7.043+282.243.7.044)

САДРЖАЈ

1. Увод	1
1.1. Објекат истраживања.....	1
1.2. Морфометријска и молекуларно-генетичка истраживања кечиге	12
1.2.1. Морфометријске методе.....	13
1.2.2. Молекуларно-генетичке методе	16
1.2.3. Истраживања као предуслов заштите кечиге	19
1.3. Циљ и задаци истраживања	22
2. Материјал и методе	23
2.1. Сакупљање узорака.....	23
2.2. Хидролошке карактеристике локалитета	24
2.3. Анализа дистрибуције дужинских класа	25
2.4. Анализа варијабилности величине и облика тела и главног региона.....	25
2.5. Изолација и анализа ДНК.....	30
2.5.1. Анализа генетичке разноврсности и популационе диференцијације	31
2.6. Тестирање модела генетичке диференцираности и сличности између генетичке и морфолошке диференцијације.....	34
3. Резултати	35
3.1. Хидролошки подаци	35
3.2. Дужинске класе	35
3.3. Морфолошка варијабилност	37
3.3.1. Варијабилност величине и укупна варијабилност облика	37
3.3.2. Алометријска компонента варијабилности облика	44
3.3.3. Неалометријска компонента варијабилности облика	49
3.4. Генетичка варијабилност	52
3.4.1. Анализа контролног региона мтДНК	52

3.4.2. Анализа микросателитске ДНК	56
3.5. Тестирање модела генетичке диференцираности и сличности између генетичке и морфолошке диференцијације.....	62
4. Дискусија.....	63
5. Закључци.....	75
6. Литература.....	77
7. Прилози	95
Биографија.....	
Изјава о ауторству	
Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада	
Изјава о коришћењу	

1. УВОД

1.1. Објекат истраживања

Класификација према Симоновић (2001):

Класа: Osteichthyes

Поткласа: Actinopterygii

Инфракласа: Chondrostei

Ред: Acipenseriformes

Породица: Acipenseridae

Acipenser ruthenus Linnaeus, 1758 - кечига



Слика 1. Кечига (извор: www.hlasek.com).

Кечига (Слика 1) представља потамодромну јесетарску врсту, која насељава речне зоне у низијским и планинским подножјима, док су њене анадромне популације истребљене (Kottelat & Freyhof, 2007). Она је евроазијска врста распрострањена у рекама сливова Црног, Азовског, Каспијског, Балтичког, Белог, Беренцовог и Кара мора (Слика 2 и Слика 3; Sokolov & Vasilev, 1989). Бентосна је риба, која живи у зони матице, изнад каменитог, шљунковитог или

песковитог дна (Јарић, 2010). Зими се јединке групишу и мирују у депресијама на дну реке, док на пролеће (током подизања нивоа воде) због исхране прелазе на плавна подручја (Kolarević, 2004; Ленхардт и сар., 2005).



Слика 2. Распрострањење кечиге у сливу Црног, Азовског, Каспијског и Кара мора. Жута боја означава ареал кечиге, док црвена боја означава места са којих се врста сматра ишчезлом (извор: www.iucnredlist.org).

Као најмања јесетарска врста у Дунаву, кечига најчешће не расте преко 100 cm дужине и 6 kg тежине, мада може достићи дужину од 125 cm и тежину од 16 kg (Kolarević, 2004; Kottelat & Freyhof, 2007). Оно што је разликује од осталих јесетарских врста је да прва леђна плоча није срасла са главом, да има 11 – 18 леђних, 51 – 71 бочних и 10 – 20 вентралних плоча, као и да су јој бркови ресасти, а доња усна прекинута по средини (Ленхардт и сар., 2005; Kottelat & Freyhof, 2007). Максимална старост кечиге се креће од 24 до 26 година. У периоду између треће и пете године (мушјаци), односно четврте и осме (женке) достижу полну зрелост (Симоновић, 2001; Reinartz, 2002; Ленхардт и сар., 2005; Kottelat & Freyhof, 2007). У Дунаву се мрести током априла и маја, на температурама од 8°C до 19°C, на дубинама до 10 m (Јарић, 2010). На шљунковитој подлози са брзим

протоком воде полаже од 7000 до 137600 комада икре (Симоновић, 2001; *Reinartz*, 2002; *Kolarević*, 2004), а инкубација траје четири до пет дана. Јувенилне јединке активно посећују воде са температурним распоном од 16°C до 30°C, али им је оптимална температура 23.6±0.2°C (*Gerasimov & Vasyura*, 2013).

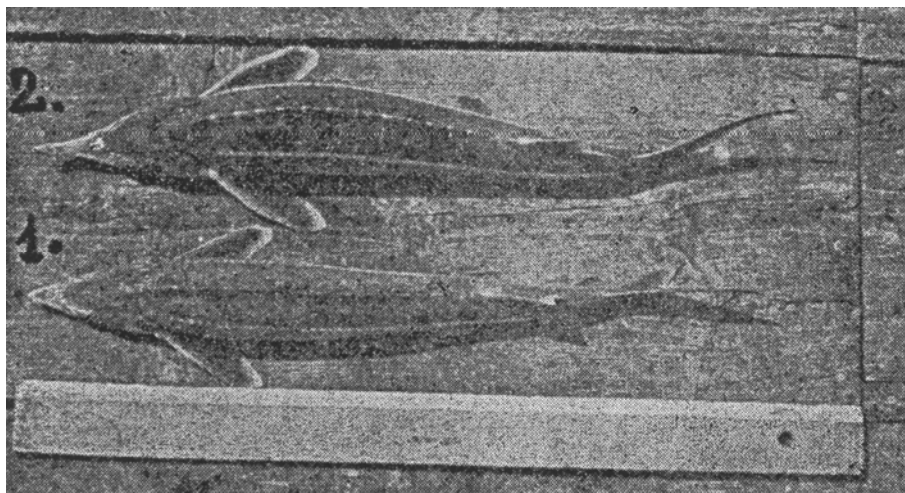


Слика 3. Распрострањење кечиге у сливу Црног, Азовског и Каспијског мора. Жута боја означава ареал кечиге, док црвена боја означава места са којих се врста сматра ишчезлом (извор: www.iucnredlist.org).

Након излегања, ларве су дуге 6 – 7 mm, и водене струје их транспортују низводно до места где су струје спорије, обично на пешчани супстрат где ларве прелазе на егзогену исхрану планктонским и бентосним организмима (*Kolarević, 2004*). Олфакторна сензитивност на хемијске стимулусе хране јавља се код јесетровки одмах након преласка на егзогену исхрану, мада је највероватније да у периоду преласка са мешовитог на егзогени начин исхране главну улогу у потрази за храном (код јувенилних јединки) имају тактилни, густаторни и електро рецептори (*Gerasimov & Vasyura, 2013*). Иако је стационарна риба, кечига током пролећа мигрира узводно ради мреста (*Симоновић, 2001; Ленхардт и сар., 2005*). Такође, репродукција кечиге у Дунаву је успешнија током нижег водостаја (*Guti & Gaebele, 2009*).

Кечига се храни бентосним организмима, претежно воденим инсектима (Ephemeroptera, Chironomidae и Trichoptera) и њиховим ларавама, као и мекушцима (*Sphaerium, Pisidium* и *Viviparus*). У исхрани има и представника бентосних инвертебрата (Oligochaeta, Polychaeta и Hirudinae), док у периодима мреста других риба значајан удео у исхрани управо представљају њихова јаја (*Ленхардт и сар., 2005; Јарић, 2010*). Оптимална температура за исхрану кечиге је у распону између 11.2°C и 21.7°C (*Gerasimov & Vasyura, 2013*).

Berg (1932, према *Ristić, 1971*) је изнео претпоставку о постојању две форме кечиге: краткориле, са краћом затупастом рилом и дугориле, са дужом и зашиљеном рилом (*Acipenser ruthenus L. morpha kamensis et typica-Lovetzky 1834, Berg L.S. 1932-1934*) (Слика 4).

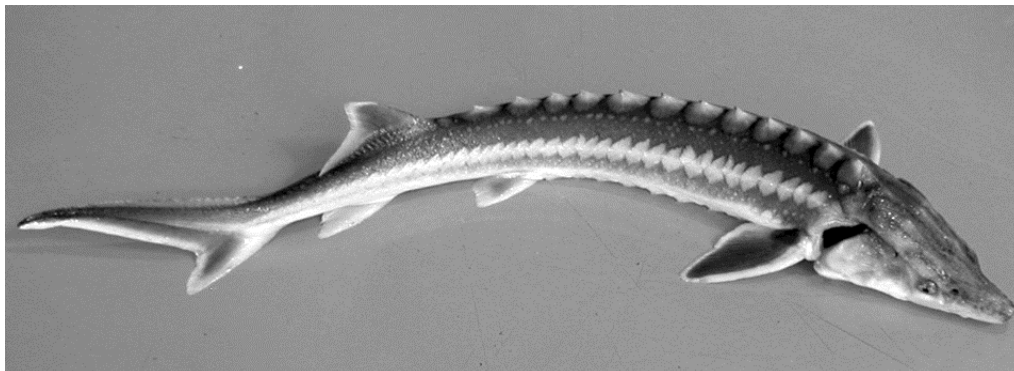


Слика 4. Фотографија две морфе кечиге у Дунаву: 1. краткорила, 2. дугорила (извор: *Ristić*, 1971).

Исти аутор (Берг, 1934 према *Janković*, 1958) указује и на еколошке разлике које постоје између ових форми (различита сезона мреста, различита плодност, различито време мресних миграција итд.) које доприносе додатном одвајању јединки на озиму и јарову расу. Озима раса би била представљена краткорилим, а јарова дугорилим јединкама (*Janković*, 1958). Већи број студија у нашој земљи (*Janković*, 1958; *Ristić*, 1971; *Lenhardt et al.*, 2003; *Kolarević*, 2004; *Ognjanović et al.*, 2008) бавио се питањем постојања ове две форме, али са различитим тумачењем, тако да овај проблем и даље није у потпуности решен. Истраживање које је спровела *Janković* (1958) обухватило је 300 јединки из Дунава (од Старог Сланкамена до Доњег Милановца), и том приликом је анализирано пет метричких и четири меристичка карактера, на основу којих су утврђене разлике у дужини риле и дужини главе. Уз запажање да је доста тзв. прелазних форми, *Janković* (1958) констатује да нема специфичности и статистички оправданих разлика на основу којих би популација дунавске кечиге могла бити подељена на краткорилу и дугорилу. Најобимније истраживање извео је *Ristić* (1971), током кога је у периоду између 1948. и 1969. године из три реке (Дунав, Сава и Тиса) узорковано 5137 јединки. Визуелним прегледом одређиване су краткориле и дугориле јединке, док су од статистичких параметара разматране само средње вредности дужине, висине и тежине тела. Заступљеност дугорилих у односу на краткориле је

варирала, па је у Дунаву тај однос био 66,6%:33,4%, у Сави 74,6%:25,4%, док је у Тиси био 58,8%:42,2%. *Ristić* (1971) такође наводи да постоје разлике између ширине главе и дужине риле, као и да је време мреста краткорилих (март – април) различито од дугорилих (крај априла – мај). Ипак, *Ristić* (1971) се ограђује од тврдње о постојању две форме, као и о њиховој биолошкој диференцираности. Истраживање које је спровела *Kolarević* (2004) обухватило је 24 метричка и четири меристичка карактера на 359 јединки са четири локалитета (Земун, Дорћол, Вишњица и Орешац) на Дунаву. Дискриминатна канонијска анализа (енг. *Canonical Variate Analysis, CVA*) је показала да нема јасних разлика између јединки са различитих локалитета, уз незнатне разлике између јединки из Вишњице у односу на јединке из Орешца. Уни- и мултиваријатне анализе варијансе су такође указале на незнатна одвајања Орешца и Вишњице, као и Земуна и Вишњице, али су ове разлике биле у вези са срединским условима, односно испустима отпадних вода код Београда. Анализа главних компоненти (енг. *Principal Components Analysis, PCA*) показала је такође да је варијабилност облика и величине слична, тако да није могуће издвојити групе или морфе унутар популација кечиге (*Kolarević*, 2004). У студији *Ognjanović et al.* (2008), спроведеној на 60 јединки са три локалитета на Дунаву (Нови Сад, Дорћол и Добра), анализирано је 18 морфометријских карактера. На два локалитета (Нови Сад и Дорћол) из средњег тока Дунава кроз Србију утврђено је присуство две морфе кечиге, са најизражајнијим разликама у облику и дужини риле, нарочито у области риле испред бркова. Отежавајућа околност при утврђивању две форме може бити и способност кечиге да хибридује са другим јесетарским врстама из Дунава (Слика 5, Слика 6 и Слика 7), руском јесетром (*Acipenser gueldenstaedtii*), моруном (*Huso huso*), симом (*Acipenser nudiiventris*) и пастругом (*Acipenser stellatus*) (*Reinartz*, 2002), као и са интродукованом сибирском јесетром (*Acipenser baerii*) (*Ludwig et al.*, 2009). Мада *Ludwig et al.* (2009) наводе да су природни хибриди јесетровки ретки, *Tsekov et al.* (2008) пријављују повећано присуство природних хибрида јесетарских врста у Дунаву. Иако морфолошки то представља проблем, у конзервационом смислу може имати катастрофалне последице јер су симулације показале да је хибридизација најбржи вид генетичке претње

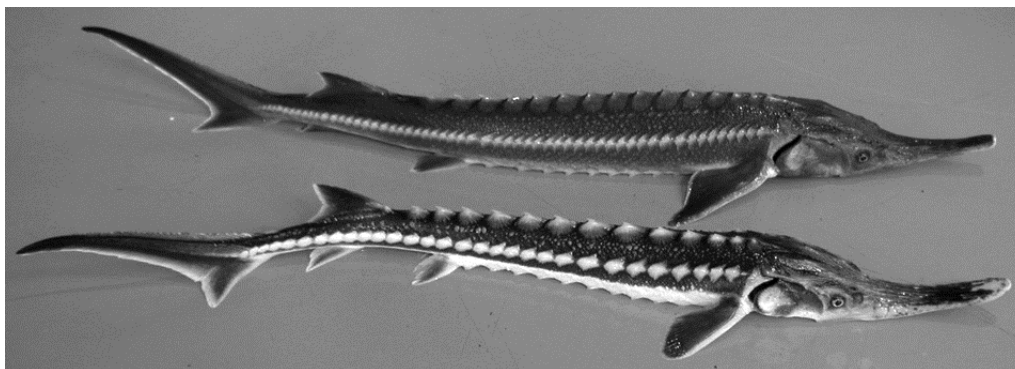
угроженим врстама због чега се изумирање дешава у мање од пет генерација (*Wolf et al.*, 2001).



Слика 5. Хибрид моруне и кечиге (*Tsekov et al.*, 2008).



Слика 6. Хибрид руске јесетре и кечиге (*Tsekov et al.*, 2008).



Слика 7. Хибрид паструге и кечиге (горе) и паструга (доле) (*Tsekov et al.*, 2008).

У сливу Дунава, који представља центар диверзитета јесетарских врста у Европи и једно од кључних станишта јесетровки у свету, некада је било присутно шест јесетарских врста. Данас се за атлантску јесетру (*Acipenser sturio*) сматра да је потпуно ишчезла из Дунава, док је сим на ивици ишчезнућа (*Jarić et al.*, 2009). За моруну, руску јесетру и пастругу се сматра да су искорењене у средњем и горњем току Дунава, али да још увек мигрирају ради мреста низводно од бране Ђердап 2 (*Vassilev & Pehlivanov*, 2003; *IUCN*, 2015). У циљу заустављања наведених негативних трендова, Румунија је 2006. године успоставила десетогодишњу забрану излова. Од 2008. године у Бугарској су уведене мере забране излова јесетровки у Црном мору, док се забрана излова јесетровки на бугарском делу Дунава изриче на годишњем нивоу (*Smederevac-Lalić et al.*, 2011). Ипак, у Румунији руској јесетри прети истребљење и потребан јој је стални програм порибљавања (уз *ex situ* вид заштите), док годишњи узорак млађи (енг. *young of the year*, *YOY*) моруне указује да се број одраслих моруна које учествују у мресту повећава, због чега их треба заштитити од риболова. Такође, популације осталих јесетровки су фрагментирани и нису у могућности да дугорочно издрже рибарствени притисак, а генетичке анализе указују на релативно високу генетичку разноврсност која може допринети опоравку популација јесетровки уколико остане забрана (*Paraschiv, pers. comm.*). Све ово је допринело да се поднесе нови предлог петогодишњег мораторијума у Румунији (објављен 05.12.2015.). Ипак, последице прекомерног и недовољно регулисаног риболова (као и криволова), фрагментација и губитак станишта (услед регулације речног тока) и загађење,

представљају факторе који су допринели угрожености јесетарских врста у Дунаву, и даље су присутни.

Иако су кечиге од мањег интереса за производњу кавијара (*Ludwig, 2006*), оне представљају врсту од економског значаја у Дунаву, те су тако једина јесетарска врста у овој реци која је и даље предмет привредног риболова (*Jarić et al., 2010*). Ипак, њихов значајан пад бројности у улову у другој половини XX века (*Vassilev & Pehlivanov, 2003; Lenhardt et al., 2004:1; Holčík et al., 2006; Guti & Gaebele, 2009; Smederevac-Lalić et al., 2011*), довео је до потребе за бољом заштитом и регулацијом излова. На основу националне регулативе у Србији постоји привремени ловостај за кечигу и траје у периоду од 1. марта до 31. маја, док је минимална прописана дужина испод које је забрањен лов 40 cm ("Службени гласник РС", број 104/09). У Румунији од 2006. године постоји мораторијум на излов свих јесетарских врста у Дунаву, док се у Бугарској мере забране излова јесетровки на Дунаву изричу на годишњем нивоу. Кечига се такође налази на различитим међународним листама, као што су *IUCN* Црвена листа угрожених врста (рањива врста, *VU, Alc + 2d; IUCN, 2015*), у Додатку II Конвенције о међународном промету угроженим врстама дивље фауне и флоре (*CITES*), у Додатку III Конвенције о заштити европских дивљих животиња и природних станишта (Бернска Конвенција), као индикаторска врста у Европској Директиви за воду итд. (Јарић, 2010). Ипак, примера ради, иако је још од 1993. године у Словачкој укинута привредни риболов, илегални риболов је од 1990. године у порасту (*Holčík et al., 2006*). Илегални риболов је у неким тренуцима чинио и до 90% укупног улова јесетарских врста у Дунаву (*Bacalbas-Dobrovici & Patriche, 1999*), па је негативан утицај прекомерног риболова на јесетровке још више појачан. С обзиром да ефикасна контрола одсуствује у овом региону (*Smederevac-Lalić et al., 2011, 2012*), заступљен је излов јувенилних јединки и јединки испод прописане дужине (*Vassilev & Pehlivanov, 2003; Lenhardt et al., 2004:2, 2006*). Као једна од последица прекомерног излова је промена узрасне и дужинске структуре популације кечига, у виду повећавања бројности јединки из млађих узрасних, као и мањих дужинских класа (График 1).

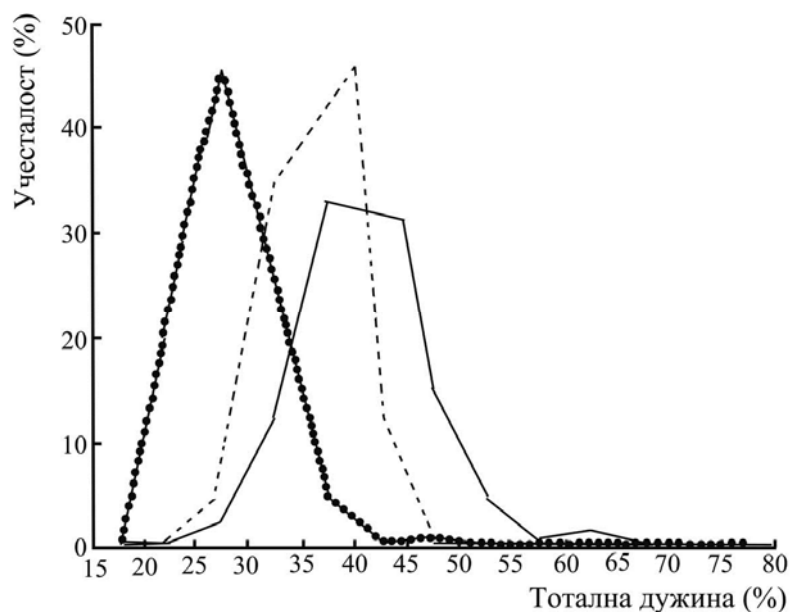
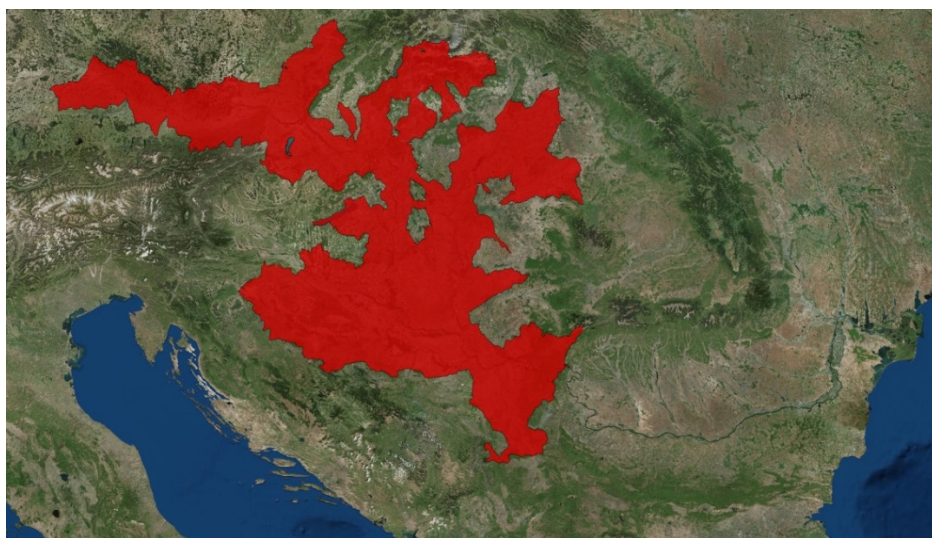


График 1. Учесталост дужинских дистрибуција кечиге уловљених у периоду од 1948 – 1967 на два локалитета, Апатин (1401 гкм, испрекидана линија) и Водице (1145 – 1141 гкм, пуна линија), и током периода 2002-2003 на 1123 – 1173 гкм (наглашенија тачкаста линија) Дунава (Lenhardt et al., 2004:1).

Међутим, постоје сегменти Дунава где је ситуација обрнута, као што је случај са популацијама у Словачкој. Наиме, у улову кечиге у Словачкој заступљене су углавном јединке од 1 – 2 kg (раније од 0.2 – 0.5 kg) што указује да популације кечиге у том сегменту Дунава постају старије, односно да је природан мрест недовољан и да старије јединке преовладавају (Holčik et al., 2006). На овакво повећање броја старијих јединки у Словачкој, главни утицај може да има и изградња брана у овом делу, будући да комерцијалан риболов можемо искључити јер је забрањен још 1993. године (Holčik et al., 2006). Иако су кечиге типично слатководне и не мигрирају далеко, те према Strel'nikova (2012) изградња брана није битније утицала на њихов репродуктивни циклус, ипак хидролошке измене (нпр. измене нивоа воде) услед рада хидроенергетских брана могу да имају

негативан утицај на мрест и репродукцију јединки, као и на распрострањење јединки из млађих узрасних стадијума (*Bloesch et al.*, 2006). Изградња брана утиче на речни систем тако што прави одређене правилности у протицању воде, спирајући дно реке у низводним секцијама, замењујући га седиментом који је пореклом од ерозије дуж тока реке (*Bacalbas-Dobrovici & Patriche*, 1999). Након изградње бране на Волги, јесетарске врсте су изгубиле 80% места за мрест (*Secor et al.*, 2000), док се анадромним јесетровкама изградњом бране Ђердап 2 на Дунаву (1984; Слика 8) подручје за мрест svelo на 863 km (*Bloesch et al.*, 2006). Утицај изградње брана на кечиге у Дунаву је приметан кроз утицај таложења муља на места мреста (*Strel'nikova*, 2012), као и кроз значајне промене у саставу исхране кечиге (*Djikanović et al.*, 2014).



Слика 8. Некадашњи ареал анадромних јесетарских врста у сливу Дунаву. Црвена боја представља подручја која више нису доступна (након изградње бране Ђердап 2) (извор: www.iucnredlist.org).

Загађење, услед прекомерног уноса органских материја и нутријената је такође имало изузетно штетан утицај на дивље популације јесетровки (*Bloesch et al.*, 2006). Повећано загађење као последица отпадних вода и њихове токсичне компоненте, у периоду између 1966. и 1978. године је у Словачкој проузорковало

значајан пад улова кечиге (*Holčik et al.*, 2006). Како је кечига бентосна риба, осим излагања загађујућим материјама у води, она је вероватно изложена и загађујућим агенсима из седимента услед исхране инвертебратама (*Poleksić et al.*, 2010). Акумулација тешких метала у кечигама и њихов утицај на ткива био је предмет неколико истраживања у Србији (Јарић, 2010; *Poleksić et al.*, 2010; *Jarić et al.*, 2011). Повишене концентрације тешких метала имале су негативно дејство на органе кечиге у сливу Дунава, са најизраженијим променама у јетри, уз нешто мање промене на кожи и шкргама (Јарић, 2010; *Poleksić et al.*, 2010). Концентрације тешких метала у мишићном ткиву биле су прихватљиве, док су концентрације у јетри и шкргама биле на неприхватљивом нивоу за људску исхрану (Јарић, 2010; *Jarić et al.*, 2011), што је код врсте која је и даље предмет привредног риболова од изузетног значаја.

1.2. Морфометријска и молекуларно-генетичка истраживања кечиге

Популације кечиге у горњем и средњем току Дунава имају опадајући тренд, угрожене су хибридизацијом или показују нестабилну популациону и узрасну структуру (*Bloesch et al.*, 2006; *Holčik et al.*, 2006; *Lenhardt et al.*, 2008; *Ludwig et al.*, 2009; *Reinartz et al.*, 2012), због чега је њихово присуство у немачком и аустријском делу Дунава углавном зависно од порибљавања (*Reinartz*, 2002). Такође, будући да кечига представља врсту која се и даље привредно лови у средњем и доњем току Дунава (*Lenhardt et al.*, 2008; Јарић, 2010), предузимани су бројни програми порибљавања ларвама, млађи и јувенилним јединкама у циљу опоравка дивљих популација (*Williot et al.*, 2002; *Guti*, 2006; *Holčik et al.*, 2006; *Smederevac-Lalić et al.*, 2011; *Lenhardt et al.*, 2012). Ипак, позитиван ефекат претходних порибљавања се сматра упитним и недовољним да надокнади пад бројности популација (*Vassilev*, 2006). Генерално гледано, пажња научне заједнице је била више усмерена на негативан генетички утицај порибљавања на дивље популације јесетровки (губитак генетичке и фенотипске пластичности, пад бројности угрожених популација и др.) (*Jager*, 2005; *Ludwig*, 2006), док је утицај услова узгоја на адаптивну вредност јединки којима се порибљавају дивље популације занемариван (*Lenhardt et al.*, 2012). У последњих двадесетак година

рађена су многобројна молекуларна истраживања кечиге (*Ludwig et al.*, 2000, 2001, 2009; *de la Herran et al.*, 2001; *Robles et al.*, 2004; *Krieger et al.*, 2008), али су само нека била усредсређена на генетичку структуру популација, употребом митохондријалне ДНК (мтДНК, Д-омча; енг. *D-loop*) и геномске ДНК (микросателитска ДНК) (*Reinartz et al.*, 2011; *Cvijanović et al.*, 2015:1, 2016; *Fopp-Bayat et al.*, 2015). Са друге стране, морфометријска истраживања дунавске кечиге су се заснивала на анализи две морфе (*Lenhardt et al.*, 2003; *Kolarević*, 2004; *Ognjanović et al.*, 2008), као и на поређењу природних и популација из узгоја (*Lenhardt et al.*, 2012; *Cvijanović et al.*, 2015:2). Усвајање мултидисциплинарног приступа, комбиновањем биолошких карактеристика препоручљиво је у програмима управљања рибљим популацијама (*Valentin et al.*, 2014). У циљу одређивања адекватних мера заштите/управљања дивљим популацијама кечиге, неопходно је одабрати информативне генетичке маркере и адекватне морфометријске методе.

1.2.1. Морфометријске методе

Област истраживања проблема величине и облика морфолошких целина (читаваих организама или било којих делова организма) коришћењем статистичких метода, на основу података добијених мерењем дефинише се као морфометрија (*Rohlf*, 1990; *Ivanović & Kalezić*, 2013). Овим истраживањима се омогућава квантификација величине и облика, те утврђивање промена фенотипске варијабилности, што опет омогућава сагледавање процеса и механизма еволуционих промена. У оквиру морфометрије постоје два основна приступа: традиционална и геометријска морфометрија.

Традиционална (линеарна) морфометрија као морфометријске варијабле најчешће користи мере растојања између јасно дефинисаних специфичних тачака, или неке друге мере величине (маса, површина). Ограничења традиционалне морфометрије представља проблем хомологије специфичних тачака, као и проблем раздвајања варијабилности у величини од варијабилности у облику морфолошке целине. Како се анализирају линеарне мере, за различите облике

морфолошких целина могу постојати исте мере растојања између тачака које означавају димензије, чиме се губе информације о стварном облику тих целина (Ivanović & Kalezić, 2013).

У последње три деценије долази до развоја геометријске морфометрије, која поседује низ предности, као што су веродостојнији опис и тумачење варијабилности облика, могућност независне анализе величине и облика, и графичка визуелизација промењивости облика (Rohlf & Marcus, 1993). У геометријској морфометрији у циљу описивања облика неке морфолошке структуре полази се од конфигурације специфичних дво- или тродимензионалних тачака (енг. *landmarks*), које је Bookstein (1991) на основу анатомских и геометријских критеријума разврстао у три групе. Првој групи припадају тачке дефинисане местима сустицања различитих делова морфолошке целине (нпр. место сустицања скелетних елемената), док другој групи припадају тачке на местима највећих закривљења одређене анатомске структуре (нпр. наставак неког скелетног елемента). Трећој групи припадају тачке које се могу одредити само у односу на читаву структуру. Након конфигурисања сета тачака, издвајање варијабли облика се најчешће обавља применом генерализоване Прокрустове анализе (енг. *Generalized Procrustes Analysis, GPA*) (Rohlf & Slice, 1990; Dryden & Mardia, 1998). Поравнањем, односно Прокрустовом суперимпозицијом (путем скалирања, транслације и ротације) се уклањају разлике које су условљене величином, положајем и оријентацијом, а задржавају се само информације директно везане за разлике у облику (Bookstein, 1991). Прокрустовом суперимпозицијом добијене координате специфичних тачака, код којих су уклоњене све разлике везане за величину, положај и оријентацију, означавају се као Прокрустове координате (енг. *Procrustes coordinates*). Прокрустове координате представљају варијабле облика и носе информацију о облику анализиране морфолошке целине (Dryden & Mardia, 1998). Такође, као основна мера разлике у облику у геометријској морфометрији користи се Прокрустова дистанца (енг. *Procrustes distance*) дефинисана као линеарна мера удаљености између конфигурација које се пореде (Bookstein, 1991). У геометријској морфометрији, величина неког објекта описаног конфигурацијом специфичних тачака изражена је као величина центорида (енг. *centroid size, CS*), која се

израчунава као квадратни корен суме квадратних растојања сваке тачке од тежишта дате конфигурације (*Bookstein, 1991*). Визуелизација промене облика (тј. разлика у облику) уочава се између две одговарајуће конфигурације тачака на тзв. бесконачној металној плочи (енг. *thin plate spline, TPS; Bookstein, 1991*). "Плоча" представља физичку метафору трансформације идеално танке бесконачне металне плоче која се издужује, скраћује, шири и скупља како би се преклопиле поређене конфигурације. Постоје различити типови графичких представљања промена облика (*Klingenberg, 2013*). Један од начина представљања промена облика, уз што вернији графички приказ и обезбеђивање детаљних информације о променама облика региона ограничених одговарајућим тачкама у оквиру испитиване структуре, представља употреба (енг.) *wireframe* графика (*Klingenberg, 2013*).

Укупну варијабилност облика чине две компоненте, алометријска (која представља промену облика условљену променом величине; *Gould, 1966*) и неалометријска (која представља промену облика која није везана за промену величине, већ је под утицајем других фактора; *Klingenberg, 1996, 2016*). Мултиваријатном регресијом варијабли облика на геометријску меру величине (*CS*) утврђује се удео варијабилности у облику који је условљен алометријом. Такође, коришћењем резидуалних вредности мултиваријатне регресије варијабли облика на варијаблу величине у даљим анализама могуће је у потпуности елиминисати разлике у облику условљене разликама у величини, односно анализирати тзв. неалометријску компоненту варијабилности облика (*Klingenberg, 2016*).

Варијабилност различитих метричких и меристичких карактера употребом традиционалне морфометрије била је предмет студија у протеклом периоду, како јесетарских врста уопште (*Keenlyne et al., 1994; Garrido-Ramos et al., 1997; Arlati et al., 1999; Debus, 1999; Murphy et al., 2007; Szczepkowska et al., 2011; Bakhshalizadeh et al., 2013:1, 2013:2*), тако и дунавске кечиге (*Lenhardt et al., 2003, 2012; Kolarević, 2004; Ognjanović et al., 2008*). Са друге стране, методе геометријске морфометрије су већ неко време у употреби код анализе облика тела и главеног региона јесетарских врста (*Loy et al., 1999; Costa et al., 2006; Qu et al.,*

2013), мада је коришћење ових метода код дунавске кечиге и даље слабо заступљено (*Cvijanović et al.*, 2015:2).

1.2.2. Молекуларно-генетичке методе

Разноврсност генетичког материјала унутар врсте омогућава организму да се прилагоди измењивим условима средине, што је од важности за сам опстанак. Услед утицаја еволутивних механизма, као што су селекција и генетички дрифт, промена генетичке разноврсности води диференцијацији на нивоу популација, врста и виших таксона. Развој молекуларно генетичких метода је последица проналаска ланчане реакције полимеразе (енг. *Polymerase Chain Reaction, PCR*), која омогућава умножавање одређеног региона ДНК, те синтезу великог броја жељених фрагмената ради даље анализе. Још једна од погодности која прати коришћење ових метода лежи у чињеници да је изолација ДНК из узорака најчешће неинвазивна, те да је могуће користити пера, крљушти, измет, урин, рогове, музејске и археолошке примерке. Последњих тридесет година, развијени су бројни генетички маркери, које можемо поделити на два типа (*Chauhan & Rajiv*, 2010): маркере који су у вези са генима који имају познату функцију (тип I) и маркере који су у вези са регионима генома за које није утврђена функција (тип II). Тако алозимски маркери припадају првој групи маркера, јер је позната функција протеина које они кодирају, док су микросателитски маркери у другој групи, осим ако нису у вези са генима којима је позната функција. Неке од најчешће коришћених техника су анализа алозима (енг. *allozyme analysis*), полиморфизам дужине ограничених фрагмената (енг. *Restriction Fragment-Length Polymorphism, RFLP*), насумично умножени полиморфни ДНК (енг. *Randomly Amplified Polymorphic DNA, RAPD*), полиморфизам дужине умножених фрагмената (енг. *Amplified Fragment-Length Polymorphism, AFLP*), микросателити (енг. *microsatellite*), синонимни и несинонимни нуклеотидни полиморфизам (енг. *Single Nucleotide Polymorphism, SNP*), *EST* (енг. *expressed sequence tag*), и др.

Митохондријална ДНК (мтДНК) анализа се често користи у популационим и филогенетским истраживањима организама (*Ludwig*, 2006). Митохондрије су

органеле цитоплазме еукариота које поседују сопствени генетички материјал, могу да синтетишу протеине, омогућавају транспорт молекула кроз мембрану, учествују у метаболизму угљених хидрата, масти и аминокиселина, садрже ензиме и коензиме за синтезу АТПа, те су извор енергије неопходне за специфичне активности ћелије (Pantić, 1997). Митохондријска ДНК вишећелијских организама представљена је кружним дволанчаним молекулом чија величина, као и број гена (у геному) варира међу врстама. У односу на кодирајуће сегменте (као цитохром б), некодирајући сегменти (као Д-омча) испољавају веће варирање (Brown et al., 1997), а такође и представљају брже еволуирајући регион (Chow et al., 1997). Такође, Д-омча испољава изразито варирање у дужини код јесетровки, тако да јединке могу бити хомоплазмичне (карактерише их присуство једне дужинске варијанте мтДНК) или хетероплазмичне (карактерише их присуство више дужинских варијанти мтДНК) (Ludwig et al., 2000). Мада су митохондријални ДНК маркери нашли широку примену у истраживањима јесетарских врста (Birstein et al., 2000, 2002; Ludwig et al., 2000, 2009; Doukakis et al., 2005; Dillman et al., 2007; Krieger et al., 2008), њихов начин наслеђивања (матерински) може да доведе до погрешног тумачења резултата при идентификацији хибрида и/или хибридизације у прошлости, уколико се користи само овај тип маркера (Ludwig, 2006). Такође, избор одређеног сегмента је значајан за тип анализе и за тумачење резултата. Тако су коришћењем различитих региона у оквиру мтДНК (*12S*, *16S*, *NADH5*, *cyt b*, *control region*) добијени различити резултати филогенетских анализа. Конкретно, сестрински односи кечиге и моруне утврђени су у два истраживања (Ludwig et al., 2000; Birstein et al., 2002). Међутим, Krieger et al. (2008) су изнели аргументе који доводе у питање овакав филогенетски закључак. Изузимањем *NADH5* и контролног региона из анализа показано је да је кечига сестринска врста са симом. Krieger et al. (2008) су такође закључили да род *Huso* и потфамилија *Scaphiurhynchinae* немају монофилетско порекло, те да родови *Huso* и *Pseudoscaphirhynchus* заправо припадају роду *Acipenser*. Ludwig et al. (2009) су утврдили да интродукована сибирска јесетра може природно да се репродукује у Дунаву, као и да хибридује са кечигама из једне од последњих преосталих популација у горњем делу тока Дунава иако еколошке карактеристике (различита

температура приликом мреста и ембрионалног развића) указују на то да не би требало да дође до појаве хибрида. Такође, различити аутори (*Ludwig et al.*, 2009; *Reinartz et al.*, 2011) су установили да је кечига (историјски) формирала метапопулацију у којој бране доводе до фрагментације на изоловане субпопулације. Коришћењем изузетно варијабилне Д-омче утврђен је велики диверзитет хаплотипова кечиге у Дунаву, који се кретао од 0.6 до 0.99 (*Reinartz et al.*, 2011).

Микросателити су присутни у геномској ДНК свих еукариотских организама и налазе се унутар кодирајућих и некодирајућих региона. То су тандемски поновци (енг. *tandem repeats*), са веома кратким нуклотидним мотивом (1 – 6 базних парова). Најчешће се користе дво, три и тетрануклеотидни поновци, од којих су *CA* и *GA* поновци најчешће коришћени међу двонуклеотидним код животиња, док су *GATA* и *GACA* скоро једини тетрануклеотидни поновци који су изучавани (*Jarne & Lagoda*, 1996). Имају висок степен варијабилности узрокован високом стопом мутација која мења дужину микросателита (*Kruglyak et al.*, 1998). Они су кододоминантни, наслеђују се по Менделовим правилима и углавном су неутрални (*Jarne & Lagoda*, 1996). Користе се за утврђивање ефективне величине популације, док се локални проток гена утврђује просторном дистрибуцијом алела (*Queller et al.*, 1993). Микросателитски локуси су веома полиморфни у природним популацијама, са просечном очекиваном хетерозиготности преко 50%, док неки могу да достигну и скоро 100% (*Jarne & Lagoda*, 1996). Микросателити су нашли широку примену у испитивањима јесетарских врста (*May et al.*, 1997; *McQuown et al.*, 2000; *King et al.*, 2001; *Heist et al.*, 2002; *Schrey & Heist*, 2007; *McDermid et al.*, 2011; *Moghim et al.*, 2013). Анализа 16 микросателитских локуса (*Schrey & Heist*, 2007) код слатководне бледе јесетре (енг. *pallid sturgeon*; *Scaphirhynchus albus*), указала је на основу Мантеловог теста значајну корелацију између географских и генетичких дистанци, те географска раздаљина може да се користи као замена за генетичку дистанцу приликом избора матичних јединки. Такође, и док бране спречавају природан проток гена бледе јесетре између горњег и доњег тока реке Мисури, генетичка дивергенца између региона може да укаже на историјско ограничавање протока гена, уместо на генетички дрифт између скоро изолованих популација

(Schrey & Heist, 2007). Са друге стране, *NJ* стабло (енг. *Neighbor Joining Tree*) добијено на основу D_{AS} дистанци указало је да не постоји одвајање кечига са различитих локалитета на Дунаву (Reinartz et al., 2011), као и да су генетичке разлике веће између јединки са истих него између јединки са различитих локалитета.

1.2.3. Истраживања као предуслов заштите кечиге

Будући да постоји веза између облика тела и понашања приликом пливања, као и да је фусиформан (енг. *fusiform*) облик (тј. сужење у главеном и репном региону) карактеристика миграторних врста (Valentin et al., 2014), геометријска морфометрија представља методу којом би се могле утврдити морфолошке специфичности кечиге у различитим стаништима. Истраживање Qu et al. (2013) је указало на везу између срединских фактора, спољашње морфологије и пливачке способности јесетри. Методе геометријске морфометрије су коришћене у истраживањима главеног региона јесетарских врста и њихових хибрида (Loy et al., 1999; Costa et al., 2006).

У циљу одрживог коришћења, значајан део програма заштите привредно изловљаваних рибљих врста, јесте процена генетичке разноврсности угрожених популација (Lakra et al., 2007). Посебни сегменти популације (тј. генетички стокови), међу којима постоји ограничен проток гена и који одржавају своју генетичку структуру захваљајући генетичкој разноврсности унутар популације, могу бити прекомерно изловљавани чиме нестају јединке које су прилагођене посебним стаништима. Reinartz et al. (2011) зато и сугеришу да програми обнављања дунавске кечиге буду засновани на јединкама из делова реке на којима се реализују ти програми, јер постоји одређен ниво субструктурирања дуж тока Дунава. Такође, контролисани узгој у циљу порибљавања угрожених врста/популација (енг. *supportive breeding*) на дуже време има штетан утицај и највероватније доводи до смањивања ефективне величине популације, смањења адаптивне вредности и до појаве инбридинг депресије (Frankham et al., 2002). Како ограничени проток гена представља предуслов за локалну адаптацију

(Kawecki & Ebert, 2004), а бране представљају непремостиву препреку (Hensel & Holčik, 1997) и утичу на губитак и смањење станишта кечиге у Дунаву (Strel'nikova, 2012; Djikanović et al., 2014), одређени степен фрагментираниости и генетичке диференцијације кечиге у испитиваном делу Дунава би се очекивао. Сходно томе, испитивање генетичке варијабилности унутар и између популација се сматра основом за успешне планове заштите. Да би се одржао висок ниво излова постоје различити планови управљања популацијама. Спровођење планова управљања заснованих на подацима молекуларних истраживања може индиректно да допринесе разноврсности популације, јер је главни циљ таквих планова избегавање смањења бројности популације, што има позитиван ефекат на одражавање популационе генетичке разноврсности (Lakra et al., 2007). Генетичке информације су неопходне за развој програма базираних на порибљавању угрожених врста, пошто разноврсност генотипова матичних риба које су коришћене у вештачком узгоју може да доведе до инбридинг или оутбридинг депресије дивљих популација које се допуњују (Ludwig et al., 2009).

Као и већина популација које трпе огроман антропогени притисак, популације дунавске кечиге могу да испоље смањење ефективне величине, односно популационо "уско грло" (енг. *population bottleneck*). Ова појава доводи до смањења генетичке разноврсности популације, што води ка укрштању међу сродним јединкама, ниске адаптивне вредности и угрожене способности да еволуирају (Frankham et al., 2002). Са становишта заштите, изузетно је важно да се утврде популације које пролазе или које су прошле кроз ефекат "уског грла", а у циљу предвиђања одговарајућих мера у оквиру програма заштите. Међутим, услед непознавања величине популације током историје, често је тешко да се утврди скори (тзв. рецентни) пролазак кроз "уско грло" (Williamson-Natesan, 2005). Пошто тестови за генетичко "уско грло" подразумевају узорке у једном временском тренутку, могу да имају ограничену статистичку могућност утврђивања "уског грла" услед његовог трајања и времена протеклог од смањења популације (Swatdipong et al., 2010), као и обима смањења ефективне величине популације (N_e) током "уског грла". У циљу давања препорука и смерница за процену демографске историје, неколико аутора (Williamson-Natesan, 2005; Peery et al., 2012) је покушало да процени афинитет различитих модела грешки, тип I

(када је утврђено "уско грло" у уравнотеженој популацији) или тип II (када није утврђено "уско грло", а присутно је). Тако метода вишка хетерозигота (енг. *heterozygote-excess method*) може правилно да детектује "уско грло" ако се процес скоро десио и ако није био великог обима, док је M -вредност тест много прикладнији у детекцији "уског грла" у популацији са великом бројношћу пре "уског грла", када је "уско грло" трајало неколико генерација и када је популација успела да се демографски опорави (*Williamson-Natesan, 2005*). Такође, *Peery et al. (2012)* указују да M -вредност тест не може да омогући претпоставку барем 20 генерација после "уског грла", као и да има малу могућност детекције пада бројности популације ако су узорци узети после само пет генерација након "уског грла", док метода вишка хетерозиготности има мању снагу када је разноврсност била висока пре "уског грла". Било да је ефективна величина популације одређена процењеним бројем риба у мресту које су произвеле узорковану кохорту (N_b) или хармонијском средњом вредношћу величине популације која се мрести током неколико генерација (N_e), најзначајнија са становишта управљања рибарством или заштитом је савремена ефективна величина популације, односно краткорочна N_e (*Dudgeon et al., 2012*). Краткорочна величина популације (N_e која се односи на временски период обухваћен временом узорковања) код малих ($N_e < 200$ јединки) популација изискује око 50 јединки и 10 – 20 локуса да би се добила прецизна процена, док код великих ($N_e \geq 1000$ јединки) је неопходно више узорака (*Waples & Do, 2010*), што може представљати проблем код самог плана истраживања.

1.3. Циљ и задаци истраживања

Основни циљеви овог истраживања су следећи:

1. Анализирати међупопулациону варијабилност величине и облика тела кечиге из средњег и доњег тока Дунава применом метода геометријске морфометрије.
2. Услед неусаглашених резултата досадашњих студија о постојању дугориле и краткориле форме кечиге, а како је идентификација две морфе превасходно везана за разлике у главеном региону, овај регион биће предмет посебне геометријско-морфометријске анализе.
3. Утврдити генетичку варијабилност јединки и популација из различитих делова тока Дунава анализом митохондријалне и једарне ДНК.
4. Испитати ефекат изловљавања и утицаја брана на генетичку структуру популација.

Крајњи циљ истраживања је давање препорука које би помогле у програмима заштите кечиге у Дунаву и Тиси. Истраживања су спроведена на локалитетима на Дунаву и Тиси, на подручју Републике Србије и Румуније.

2. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

2.1. Сакупљање узорка

У истраживању је коришћено 95 кечига, које су ухваћене у периоду јул – новембар, током трогодишњег периода (2007 – 2009). Кечиге су хватане повлачећим мрежама (од стране привредних рибара) на локалитетима Нови Кнежевац (Тиса, 138 гкм; N 46°01'41.37" E 20°04'35.92") и Бачка Паланка (Дунав, 1297 гкм; N 45°13'58.89" E 19°22'20.95") са територије Србије, док су кечиге из румунског дела Дунава хватане на локалитету Гринду (Дунав, 121 гкм; N 45°23'42.59" E 28°16'50.35") помоћу једносмерне струје (електрориболов) у сарадњи са колегама из Националног института за истраживање и развој делте Дунава (*Danube Delta National Institute for Research and Development, DDNI*, Тулча, Румунија) (Слика 9). На локалитетима Нови Кнежевац (у даљем тексту НК) и Бачка Паланка (у даљем тексту БП) је ухваћена 41, односно 25 кечига, док је 29 кечига уловљено на локалитету Гринду (у даљем тексту ГР) (Табела 1).

Табела 1. Број узоркованих јединки по локалитетима коришћених у различитим анализама.

		ЛОКАЛИТЕТИ		
		НК	БП	ГР
укупан број јединки		41	25	29
анализирани материјал	геометријска морфометрија	27	22	25
	микросателити	41	25	29
	мтДНК	6	10	16

Све јединке су анестезиране, након чега су фотографисане и узет им је део аналног пераја. Фотографисање је обављено дигиталним фотоапаратом (*Panasonic DMC-FZ40*) фиксираним на сталку, уз присуство милиметарског папира (ради касније калибрације дигиталних фотографија). Приликом фотографисања, све јединке су постављане на десну бочну (латералну) и леђну (дорзалну) страну.

Делови аналног пераја су узимани инструментима стерилисаним у алкохолу и на пламену, те су складиштени у 99% етанолу. Након обраде материјала, јединке су живе враћане у природну средину.



Слика 9. Карта са местима узорковања: 1. Нови Кнежевац, 2. Бачка Паланка, 3. Гринду. Црне хоризонталне црте на речном току представљају бране. Испрекидане цртице представљају државне границе.

2.2. Хидролошке карактеристике локалитета

Хидролошки подаци за локалитете у Србији су узимани из Хидролошких годишњака (РХМЗ, 2007, 2008), које објављује Републички хидрометеоролошки завод, док су хидролошки подаци за локалитет у Румунији добијени из *ICPDR* (2015). Како на неким локалитетима не постоје мерне станице и/или нису измерени параметри који су коришћени за анализу, узимани су подаци са

географски приближних мерних станица. Тако су подаци о протоку (изражени у метрима кубним у секунди; m^3/s) и температури воде (изражени у степенима Целзијуса; $^{\circ}C$) за локалитет Бачка Паланка добијени са мерне станице Нови Сад, која се налази 43 километра низводно. Мерна станица Нови Кнежевац бележи само температуру воде, док су подаци о протоку воде добијени са мерне станице Сента, која се налази 23 километара низводно. Подаци о протоку и температури воде за локалитет Гринду, добијени су са мерне станице Рени-Килиа, која се налази шест километара узводно. Подаци о проносу лебдећег наноса (изражени у килограмима у секунди; kg/s), за подручје Србије (део Дунава и Тисе), узети су за 2007. годину, са мерних станица Бездан (Дунав) и Сента (Тиса).

2.3. Анализа дистрибуције дужинских класа

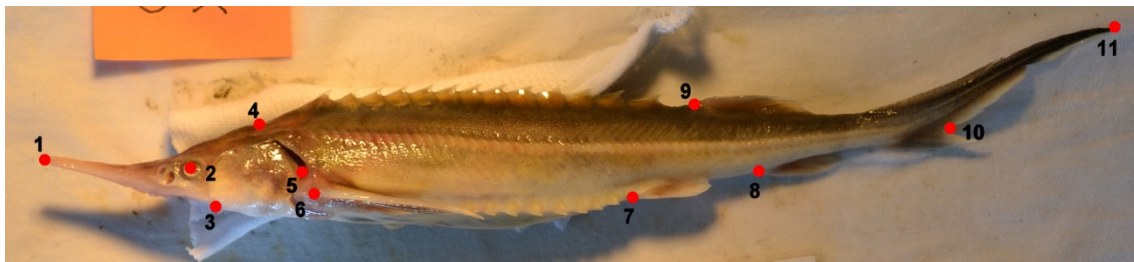
Структура узорка у односу на дужину јединки одређена је на основу дистрибуције дужинских класа. Анализа процентуалне дистрибуције дужинских класа одређена је на основу измерених тоталних дужина тела (TL) 95 јединки. Дистрибуција дужинских класа може да пружи информације о структури узорка, а такође може да служи и за процену узраста (*Kolarević, 2004*).

2.4. Анализа варијабилности величине и облика тела и главеног региона

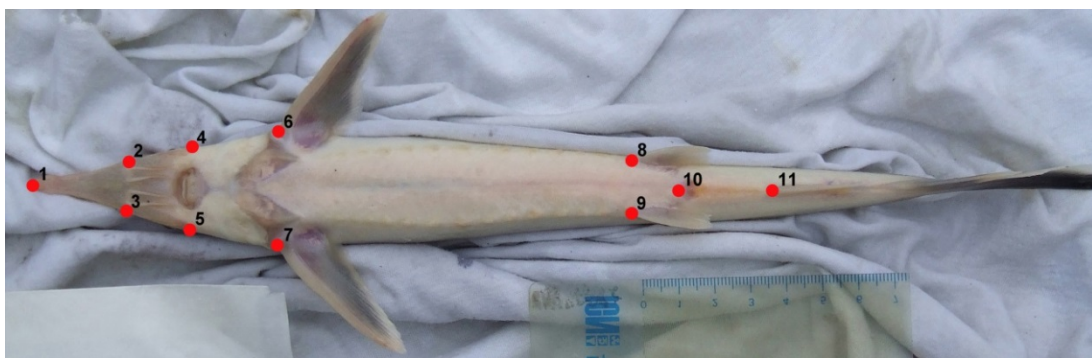
Анализа варијабилности величине и облика тела, као и главеног региона засебно, урађена је применом метода геометријске морфометрије. Анализиране јединке (Табела 1) нису биле полно зреле, и на основу процењене дужине постизања полне зрелости биле су млађе од три године (*Kolarević, 2004; Kottelat & Freyhof, 2007*). На нивоу укупног узорка, анализиране јединке су биле тоталне дужине тела (TL) између 173 mm и 354 mm (НК: 261 – 345 mm; БП: 253 – 354 mm; ГР: 173 – 239 mm).

Код анализе величине и облика тела, одређено је по 11 дводимензионалних специфичних тачака на левој латералној и вентралној страни коришћењем компјутерског програма *TpsDig* (*Rohlf, 2010:1*). Главени регион је затим детаљније

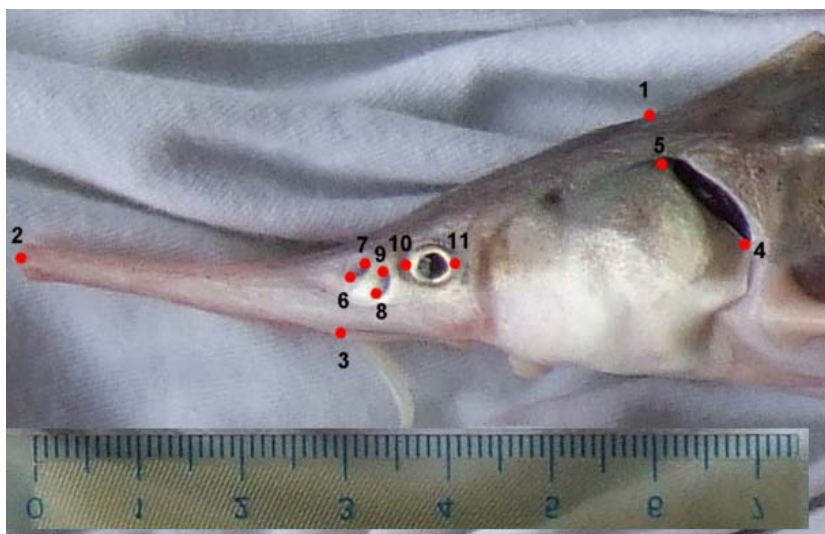
анализиран са 11 димензионалних тачака на бочној, и 16 на вентралној страни. Тачке којима су дефинисане конфигурације анализираних морфолошких целина, изабране су на основу литерарних података (*Zelditch et al.*, 2004; *Costa et al.*, 2006; *Qu et al.*, 2013), док је приказ и опис изабраних тачака дат на Сликама 10, 11, 12 и 13.



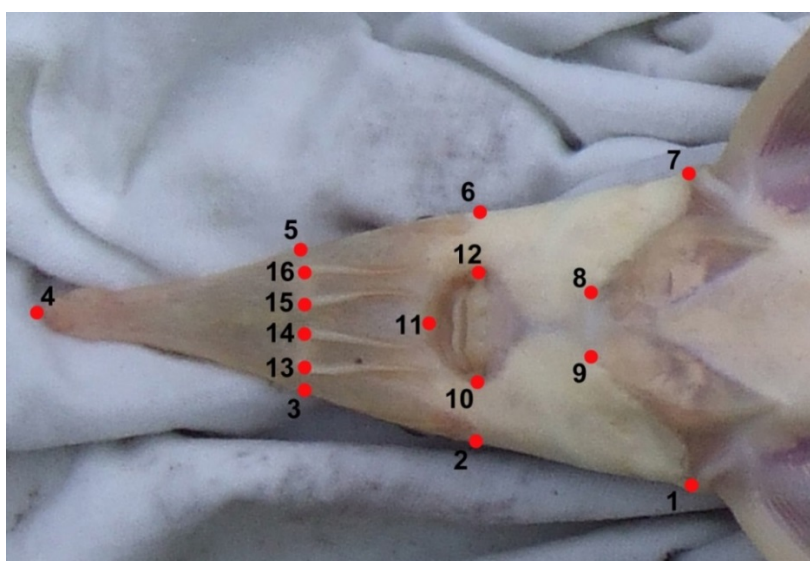
Слика 10. Латерални приказ тела са конфигурацијом специфичних тачака: 1. врх риле, 2. око, 3. усни отвор, 4. антериорни уметак прве леђне плоче, 5. задња ивица оперкулама, 6. основа грудног пераја, 7. основа трбушног пераја, 8. основа аналног пераја, 9. основа леђног пераја, 10. рачвање хетероцеркног пераја, 11. крај репног пераја.



Слика 11. Вентрални приказ тела са конфигурацијом специфичних тачака: 1. врх риле, 2. и 3. тачка у којој линија (која спаја основе бркова) пресеца профил, 4. и 5. тачка у којој линија (која спаја бочне ивице усног отвора) пресеца профил, 6. и 7. основа грудних пераја, 8. и 9. основа трбушних пераја, 10. предња ивица аналног отвора, 11. основа аналног пераја.



Слика 12. Латерални приказ главног региона са конфигурацијом специфичних тачака: 1. anteriорни уметак прве леђне плоче, 2. врх риле, 3. почетак бркова, 4. задња ивица оперкулума, 5. горња ивица оперкулума, 6. доња ивица предње ноздрве, 7. горња ивица предње ноздрве, 8. доња ивица задње ноздрве, 9. горња ивица задње ноздрве, 10. предња ивица ока, 11. задња ивица ока.



Слика 13. Вентрални приказ главног региона са конфигурацијом специфичних тачака: 1. и 7. уметак грудног пераја, 2. и 6. тачка у којој линија (која спаја бочне ивице усног отвора) пресеца профил, 3. и 5. тачка у којој линија (која спаја основе бркова) пресеца профил, 4. врх риле, 8. и 9. вентрални уметак оперкулума, 10. и 12. бочна ивица усног отвора, 11. предња ивица усног отвора, 13. – 16. основа бркова.

На основу дате класификације (*Bookstein, 1991*), изабране тачке припадају типу I, које су одређене местима сустицања различитих делова морфолошке целине, као и типу II које су дефинисане локалним сустицањем ткива. Након избора тачака, извршена је провера постојања великих одступања између јединки, у компјутерском програму *TpsRelw* (*Rohlf, 2010:2*). Коришћењем компјутерског програма *CoordGen* из програмског пакета *IMP* (енг. *Integrated Morphometrics Package; Sheets, 2000*) за сваку јединку је добијена варијабла величине, односно величина центроида (*CS*). Ради добијања информација о облику анализираних морфолошких целина коришћена је генерализована Прокрустова анализа која даје матрицу варијабли облика, Прокрустових координата код латералне стране тела и главеног региона, односно тзв. симетричне компоненте (енг. *symmetric component*) код вентралне стране тела и главеног региона.

Анализа варијабилности величине (величине центроида) рађена је употребом анализе варијансе (енг. *analysis of variance, ANOVA*) како би се утврдило постојање статистички значајне разлике у величини између јединки са различитих локалитета. За анализу промењивости облика употребљена је анализа главних компоненти (енг. *Principal Components Analysis, PCA*) и мултиваријатна анализа варијансе (енг. *multivariate analysis of variance, MANOVA*). Да би се утврдило да ли између јединки различитих популација постоје статистички значајне разлике у облику примењена је *MANOVA*. Као могући фактор промењивости облика тестиран је утицај локалитета (популације), а као зависно промењиве (варијабле облика) коришћени су *PC* скорови јединки добијени из *PCA*.

Код постојања статистички значајних разлика у облику између јединки са различитих локалитета, даља анализа укупних (алометријских + неалометријских) промена облика вршена је преко канонијске дискриминантне анализе (енг. *Canonical Variate Analysis, CVA*). Том приликом су издвојене канонијске осе (енг. *Canonical Variables, CV*) које највише доприносе дискриминацији анализираних популација. Регресијом варијабли облика на прву (*CV1*) и другу (*CV2*) канонијску осу добијене су промене облика које највише доприносе раздвајању анализираних

популација. Промене облика дуж прве и друге канонијске осе представљене су тзв. (енг.) *wireframe* дијаграмима и увећане три пута.

Алометријски односи између локалитета (популација) анализирани су употребом мултиваријатне анализе коваријансе (енг. *multivariate analysis of covariance, MANCOVA*) и мултиваријатном регресијом варијабле облика на логаритмовану варијаблу величине ($\ln CS$). Прво је тестиран утицај локалитета (као независне варијабле) и логаритмоване варијабле величине ($\ln CS$) (као коваријабле) на *PC* скорове јединки (зависне варијабле облика) како би се утврдило да ли између локалитета постоје разлике у тренду зависности облика од величине. Одсуство статистички значајног ефекта интеракције локалитета и $\ln CS$ указује на хомогеност нагиба регресионих кривих. Удео алометрије у укупној варијабилности облика процењен је мултиваријатном регресијом варијабле облика (Прокрустових координата, односно симетричне компоненте) на логаритмовану варијаблу величине ($\ln CS$), а статистичка значајност алометријског ефекта добијена је пермутационим тестом након 10000 пермутација. Алометријске промене облика представљене су тзв. (енг.) *wireframe* дијаграмима.

У циљу анализе неалометријске компоненте варијабилности облика поновљена је канонијска дискриминантна анализа (*CVA*), али су овај пут као варијабле облика коришћене резидуалне вредности добијене претходом мултиваријатном регресијом варијабле облика (Прокрустових координата, односно симетричне компоненте) на логаритмовану варијаблу величине ($\ln CS$). Неалометријске промене облика дуж прве и друге канонијске осе такође су представљене у виду (енг.) *wireframe* дијаграма и увећане три пута.

Све статистичке анализе, изузев *ANOVA*, *MANOVA* и *MANCOVA* које су извршене у програмском пакету *Statistica 8* (*StatSoft. Inc.*, 2007), урађене су помоћу компјутерског програма *MorphoJ* (*Klingenberg*, 2011).

2.5. Изолација и анализа ДНК

ДНК је изолована из аналног пераја кечиге. Изолација је извршена помоћу сета за изолацију ДНК (*Dneasy Blood and Tissue Kit*, *Quiagen*). За одређивање концентрације ДНК у узорку коришћена је спектрофотометријска метода, док су апсорпциони односи 260/230 и 260/280 показали вредности (1,8 – 2,0) које се сматрају показатељима високог квалитета и чистоће испитиване ДНК по препоруци произвођача.

Умножавање варијабилног фрагмента контролног региона мтДНК (*D-loop*, 257 bp) код 32 узорка рађено је ланчаном реакцијом полимеразе, уз коришћење амплимера *F.for* (5'-GCATCTGGTTCCTATTTTCAGGTCC-3') и *F.rev* (5'-TATTAGGCTTGTTTCGGCGTAAGG-3') (*Reinartz et al.*, 2011). Ланчане реакције полимеразе су рађене у 15 µl реакционе смеше састава: 100 ng ДНК, 1 x *PCR* реакциони пуфер [750 mM *Tris-HCl* (ph 8.8 на 25°C), 200 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0.1% *Tween* 20], 10 mM *dNTP* микс, 5 pmol амплимера и 1U *Taq* ДНК полимеразе. Умножавање је рађено у 2720 *Thermal Cycler* (*Applied Biosystems*), а услови су били: 5min на 94°C, затим 30 циклуса по 30s на 94°C, 30s на 56°C, 30s на 72°C, и финална екстензија 3min на 72°C. Провера успешности умножавања је обављена помоћу 1% агарозног гела у 1 x *TBE* пуферу. Секвенцирање продуката умножавања рађено је услужно у *GATC Biotech AG*, Немачка (<http://www.gatc-biotech.com>). У даљу анализу је укључено и додатних 24 хаплотипа које су описали *Reinartz et al.* (2011) и депоновали у Банку Гена под регистарским бројевима *KF876135-38*, *KF876140*, *KF876142-47*, *KF876149*, *KF876151-54*, *KF876157*, *KF876159-61* и *KF876163-66*.

Анализа микросателитских локуса је урађена на свим (95) узорцима, и коришћено је десет локуса (*Afu19*, 34, 39, 54 и 68 – *May et al.*, 1997; *Spl101*, 105 и 173 – *McQuown et al.*, 2000; *Aox23* и 45 – *King et al.*, 2001). Ланчане реакције полимеразе су рађене у 10 µl реакционе смеше састава: 50 ng ДНК, 1 x *PCR* реакциони пуфер [750 mM *Tris-HCl* (ph 8.8 на 25°C), 200 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0.1% *Tween* 20], 10 mM *dNTP* микс, 5 pmol амплимера и 1U *Taq* ДНК полимеразе. Умножавање је рађено у 2720 *Thermal Cycler* (*Applied Biosystems*), а услови су били: 3min на 94°C, затим 40 циклуса по 30s на 94°C, 30s на 55 – 59°C, 30s на

72°C, финална екстензија 10min на 72°C. Продукти *PCR* амплификације су анализирани на 6% неденатуришућем полиакриламидном гелу и визуелизовани методом бојења сребро-нитратом. Молекуларни маркер стандардне дужине (*pBR322 DNA/BsuRI Marker*, 5; *Fermentas*) коришћен је при свакој анализи, као и узорак без ДНК (негативна контрола) ради провере могуће контаминације. Да би се осигурала поновљивост профила, неки узорци су генотипизирани два пута за сваку комбинацију прајмера, а поновљени узорци су наносени на посебне гелове. Само јасни и понављиви *PCR* ампликони су укључени у даље анализе. Фрагменти су детектовани и утврђена им је дужина прегледом гелова у програму *Total Lab v.1.10* (*Phoretix, Newcastle, UK*), а на основу претходно утврђених дужина ампликона (*May et al.*, 1997, *McQuown et al.*, 2000, *King et al.*, 2001, *Jennekens et al.*, 2001). Могуће присуство грешака у генотипизацији (енг. *genotyping errors*), нултих алела и насумичног изостанка алела (енг. *allelic dropouts*) тестирано је у програму *MicroChecker* (*Van Oosterhout et al.*, 2004).

2.5.1. Анализа генетичке разноврсности и популационе диференцијације

Секвенце контролног региона мтДНК су поравнате у компјутерском програму *Clustal X* (*Larkin et al.*, 2007). У програму *MEGA v.6* (*Tamura et al.*, 2013) израчуната је укупна генетичка дистанца. Овој анализи је претходило тестирање за најпогоднији еволутивни метод (опција *Find Best DNA/Protein Model*), па је на основу добијених резултата коришћен Кимура дво-параметарски гама модел (енг. *Kimura's two-parameter gamma model*).

Компјутерски програм *DnaSP v5* (*Librado & Rozas*, 2009) коришћен је за израчунавање разноврсности хаплотипова (h), разноврсности нуклеотида (π) и тета вредности (θ) на основу броја полиморфних места. Компјутерски програм *TCS v1.3* (*Clement et al.*, 2000) коришћен је за конструкцију мреже хаплотипова (95% *statistical parsimony network*) ради бољег представљања генетичке дивергенције на интраспецијском нивоу, поготово у случајевима када више хаплотипова потиче из заједничког предачког хаплотипа (*Riva Rossi et al.*, 2012). Хипотеза да су све мутације селективно неутралне (*Kimura*, 1983) тестирана је

вредностима за D (Tajima, 1989), као и вредностима за F^* и D^* (Fu & Li, 1993) у програму *DnaSP v5* (Librado & Rozas, 2009). Очекује се да су вредности D , F^* и D^* негативне када је популација у експанзији.

Израчунавање Φ_{st} (као мере популационе деиференцијације), на основу митохондријалне ДНК, рађено је у програму *Arlequin v.3.5*. (Excoffier & Lischer 2010). Како би се утврдила расподела генетичке варијабилности унутар и између популација и група, у истом програму (*Arlequin v.3.5*; Excoffier & Lischer 2010) рађена је анализа молекуларне варијансе (енг. *analysis of molecular variance*, *AMOVA*). Анализа молекуларне варијансе се заснива на процени индекса генетичке структуре, а на основу информација о алелском саставу хаплотипова и на основу учесталости алела. Групе за анализу молекуларне варијансе су одређиване на основу делова тока, те су узорци са локалитета НК и БП сврстани у групу која припада средњем току Дунава, док су узорци са локалитета ГР припали доњем току Дунава. Процене диференцијације популација (G_{st} ; Nei, 1973) и броја миграната (N_m ; Nei, 1973) су рачунате у компјутерском програму *DnaSP v5* (Librado & Rozas, 2009).

На основу резултата добијених анализом микросателита, у програму *GENETIX 4.04* (Belkhir et al., 1996-2004) израчунати су просечан број алела (A), очекивана (H_e) и добијена (H_o) хетерозиготност. Програм *FSTAT 2.9.3.2* (Goudet, 2002) коришћен је за израчунавање одступања од Харди-Вајнбергове равнотеже (енг. *Hardy-Weinberg equilibrium*, *HWE*) и израчунавања мера диференцираности популација преко F_{ST} коефицијента на основу 1000 пермутација. Генетички односи између индивидуа су утврђивани као пропорција заједничких алела на сваком локусу (енг. *allele sharing distances*, D_{AS}) (Bowcock et al., 1994). Такође, код јувенилних јединки (које су анализирани и на морфолошком нивоу) посебно су израчунате вредности за F_{ST} , ради потврде разлика између узорака. У програму *POPULATIONS* (Langella, 1999) коришћена је матрица D_{AS} вредности ради конструкције *NJ* стабла. Расподела генетичке варијабилности унутар и између популација и група испитивана је анализом молекуларне варијансе, у компјутерском програму *Arlequin v.3.5* (Excoffier & Lischer, 2010). Групе су одређиване на исти начин као и при анализи молекуларне варијансе код мтДНК.

Бајесов метод груписања (енг. *Bayesian clustering method*), имплементиран у компјутерском програму *STRUCTURE v2.3* (Pritchard et al., 2000), коришћен је ради процене највероватнијег броја генетичких кластера (K). Програм претпоставља постојање Харди-Вајнбергове равнотеже између популација, те на основу тога групише индивиде које имају карактеристичне учесталости алела. За сваку вредност K урађено је седам независних симулација. Задате вредности за K су биле од један до осам, уз претпоставку заједничког порекла испитиваних јединки (енг. *Admixture Model*) и сличних учесталости алела између популација са различитих локалитета (енг. *Correlated Allele Frequencies*). За сваку вредност K урађено је 100000 МЦМЦ понављања (енг. *Markov chain Monte Carlo, MCMC*) након одбацивања првих 20000 понављања (енг. *Burn-in iterations*), са и без претходних информација о популационој припадности (опција *LOCIPRIOR*). Модел *LOCIPRIOR* омогућава утврђивање структуре са мањим нивоом дивергенције и није пристрасан при детекцији структуре ако је нема (Hubisz et al., 2009), а заснива се на додавању претходних података о местима узорковања Бајесовом процесу додељивања (енг. *Bayesian assignment process*). Највероватнији број кластера (K) утврђиван је са (енг.) *likelihood of the posterior probability* [$\ln P(D)$] и израчунавањем ΔK методом описаном од стране Evanno et al. (2005), у компјутерском програму *Structure Harvester v0.6.92* (Earl & vonHoldt, 2012). За тестирање теоријске претпоставке да популационо "уско грло" условљава брже смањење разноврсности алела у односу на хетерозиготност, а ово заузврат ствара вишак хетерозигота у популацијама након "уског грла" (McEachem et al., 2011), коришћен је компјутерски програм *BOTTLENECK v1.2.02* (Cornuet & Luikart, 1996). Подаци су анализирани са препорученим подешавањима (Piry et al., 1999): постепени мутациони модел (енг. *Stepwise Mutation Model, SMM*) и двофазни модел (енг. *Two-phase Model, TPM*), уз 95% вероватноће дешавања појединачних мутација (енг. *Single-step Mutations, SMM*) и величином мутационе варијансе (енг. *Variance Mutation Size, VMS*) подешеном на 12. За утврђивање значајности вишка хетерозиготности код свих локуса, коришћен је Вилкоксон тест (енг. *One-tail Wilcoxon Signed Rank Test*), који пореди два сродна узорка и да ли је први узорак значајно већи од другог. Такође, урађен је и тест смене режима (енг. *Mode Shift Test*) који описује дистрибуцију

учесталости алела, те тако разликује популације које пролазе кроз "уско грло" и стабилне популације. Додатно тестирање "уског грла" је рађено у компјутерском програму *Arlequin v.3.5* (Excoffier & Lischer, 2010), користећи M вредност на основу једначине коју су дали Garza & Williamson (2001), уз незнатну измену према Excoffier et al. (2005). M вредност указује на генетичко "уско грло" тако што одређује пропорције алела који изостају у расподели алелске дистрибуције (Schwartz & May, 2008). За процену ефективне величине популације (N_e) код сваке популације, као и код дефинисаних група популација у које су груписане све јединке са локалитета НК и БП са једне стране и ГР са друге, коришћене су две методе за процену на основу појединачних узорака, коригована верзија методе *linkage disequilibrium* (Warples & Do, 2008) и допуњена верзија методе вишка хетерозигота (енг. *Heterozygote-excess Method*; Zhdanova & Pudovskin, 2008). Ове анализе су рађене у компјутерском програму *NeEstimator 2.01* (Do et al., 2014).

2.6. Тестирање модела генетичке диференцираности и сличности између генетичке и морфолошке диференцијације

Одређивање сличности у обрасцима генетичке диференцираности популација (F_{ST}) и географских дистанци, као и у обрасцима генетичке диференцираности популација (F_{ST}) и Прокрустових дистанци (израчунатих између просечних облика популација након уклањања утицаја алометрије, тј. из резидуалних вредности мултиваријатне регресије варијабли облика на варијаблу величине), извршено је помоћу Мантеловог теста (Mantel, 1967) у програму TFPGA 1.3 (Miller, 1997). За све Мантелове тестове коришћено је 1000 случајних понављања.

3. РЕЗУЛТАТИ

3.1. Хидролошки подаци

Прикупљене вредности о протоку (изражене у метрима кубним у секунди; m^3/s), температури воде (изражене у степенима Целзијуса; $^{\circ}C$) и проносу лебдећег наноса (изражене у килограмима у секунди; kg/s) дати су у Прилозима 1 и 2.

3.2. Дужинске класе

Све анализиране кечиге су биле полно незреле, а на основу процене узраста полног сазревања код популација дунавске кечиге, као и дужине анализираних узорака, процењено је да су јединке биле млађе од три године (Kolarević, 2004; Kottelat & Freyhof, 2007).

У целом узорку, опсег варирања тоталне дужине јединки креће се између 173 – 502 mm, при чему је просечна дужина 287 ± 70 mm. Измерени подаци су приказани у виду дужинских класа (са интервалом од 40 mm), почевши од 160 – 200 mm до 481 – 520 mm. Графички прикази дужинских класа на сва три локалитета дати су на Графицима 2, 3 и 4.

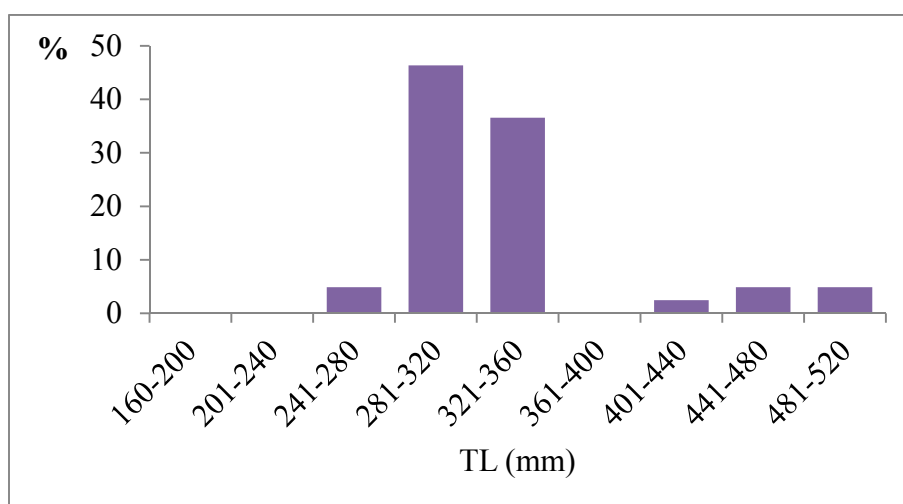


График 2. Приказ заступљености дужинских класа на локалитету Нови Кнежевац.

Код јединки уловљених на Тиси (Нови Кнежевац), тотална дужина износи 333 ± 55 mm, док се величина јединки креће од 261 до 502 mm. Највећи проценат јединки се налази у класи 281 – 320 mm (46.34%), а затим у класи 321 – 360 mm (36,58%). Класе 241 – 280 mm, 441 – 480 mm и 481 – 520 mm су заступљене са истим процентом јединки (по 4.88%), док је најмањи проценат јединки био у класи 401 – 440 mm (2.44%).

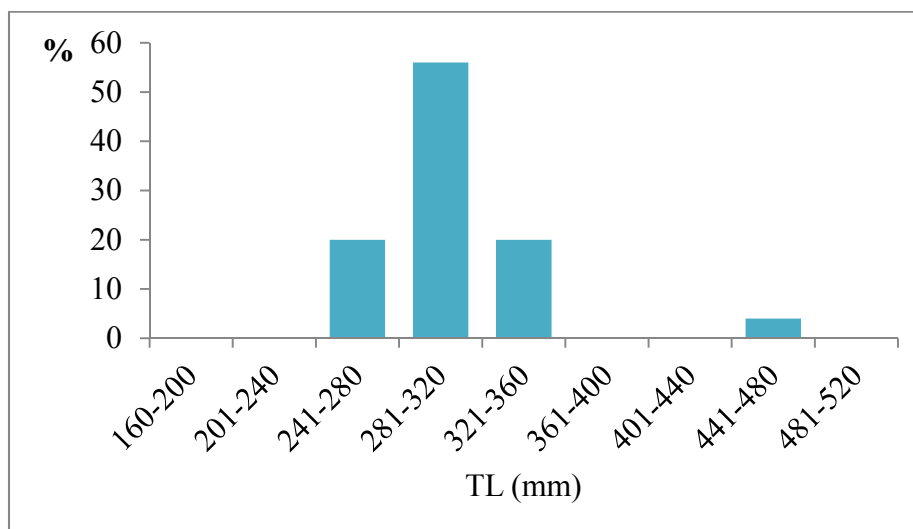


График 3. Приказ заступљености дужинских класа на локалитету Бачка Паланка.

Јединке са дунавског локалитета Бачка Паланка имају тоталну дужину тела која се креће између 253 и 470 mm, са просечном вредношћу 308 ± 43 mm. Као и код претходног локалитета, највећи проценат јединки је заступљен у 281 – 320 mm (56%), док су класе 241 – 280 mm и 321 – 360 mm заступљене са истим процентом јединки (по 20%). Најмање јединки има у класи 441 – 480 mm (4%).

Код јединки уловљених на дунавском локалитету Гринду, тотална дужина се креће у распону од 173 до 239 mm, док је просечна вредност 206 ± 18 mm. Све јединке су заступљене у две дужинске класе, и то 201 – 240 mm (55.17%) и 160 – 200 mm (44.83%).

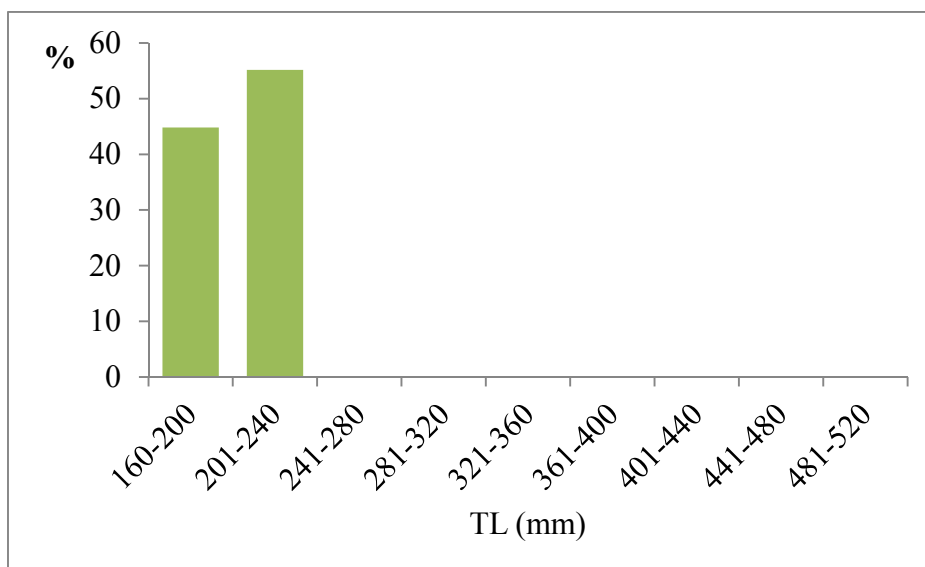


График 4. Приказ заступљености дужинских класа на локалитету Гринду.

3.3. Морфолошка варијабилност

3.3.1. Варијабилност величине и укупна варијабилност облика

Анализом варијансе (*ANOVA*) уочене су статистички значајне ($P < 0.005$) разлике у величини анализираних морфолошких целина јединки са различитих локалитета (Табела 2).

Табела 2. *ANOVA* величине центроида (*CS*), са локалитетом као фактором (*SS* – сума квадрата, *df1* и *df2* – степени слободе (енг. *degrees of freedom*), *F* – Ф вредности, *P* – статистичка значајност).

	<i>SS</i>	<i>df1, df2</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Тело (латерална перспектива)	205122.24	2, 71	150.36	0.0000
Тело (вентрална перспектива)	95102.38	2, 71	142.20	0.0000
Глава (латерална перспектива)	4737.55	2, 71	115.02	0.0000
Глава (вентрална перспектива)	6711.97	2, 71	128.21	0.0000

Применом *Tukey* теста (енг. *Tukey's HSD post-hoc test*) утврђено је да постоје статистички значајне ($P < 0.005$) разлике у величини анализираних морфолошких целина јединки са локалитета Гринду у односу на остале локалитете (Табела 3). Јединке са локалитета Гринду у односу на јединке из Новог Кнежевца и Бачке Паланке одликују ниже средње вредности величине центроида. Графички приказ међупопулационих разлика у величини јединки дат је на Графику 5.

Табела 3. *Tukey* тест за величину центроида (*CS*) јединки са различитих локалитета: А. латерална перспектива тела (испод дијагонале) и вентрална перспектива тела (изнад дијагонале), Б. латерална перспектива главног региона (испод дијагонале) и вентрална перспектива главног региона (изнад дијагонале), * ($P < 0.005$).

А.

	НК	БП	ГР
НК		0.1432	0.0001*
БП	0.1844		0.0001*
ГР	0.0001*	0.0001*	

Б.

	НК	БП	ГР
НК		0.9974	0.0001*
БП	0.9940		0.0001*
ГР	0.0001*	0.0001*	

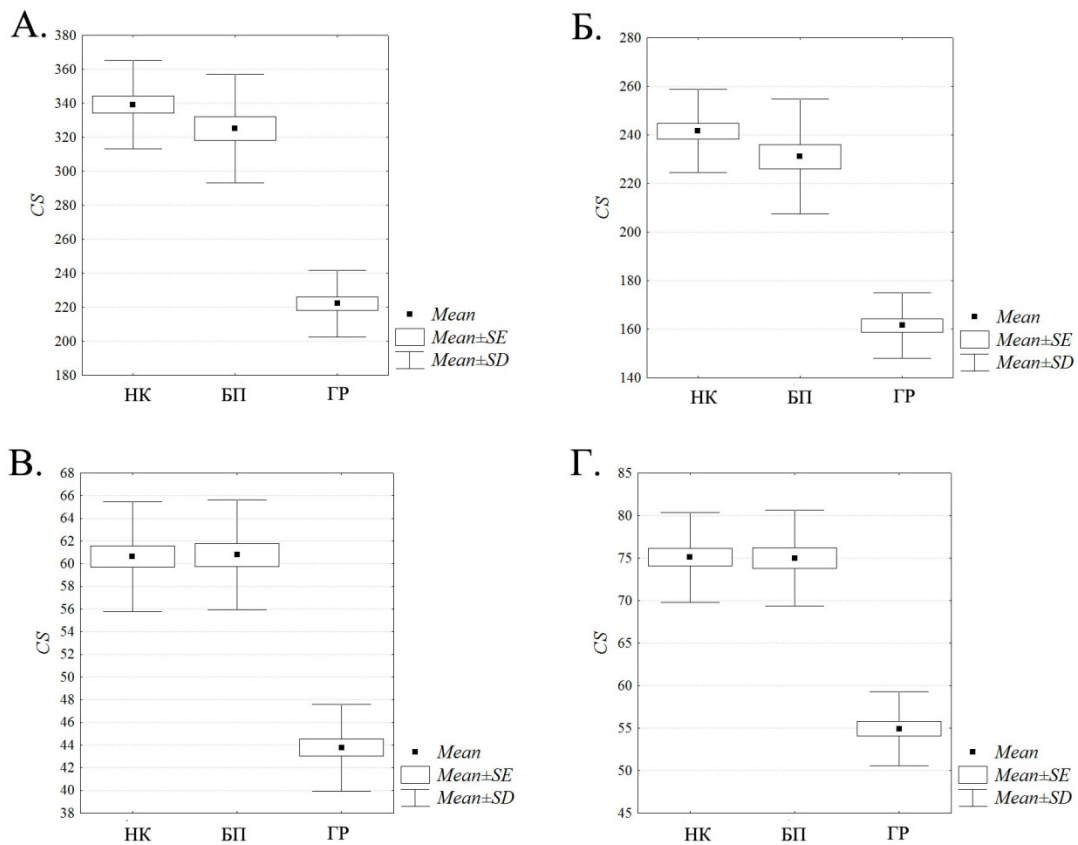


График 5. Графички приказ средње вредности (*Mean*), стандардне грешке (*SE*) и стандардне девијације (*SD*) величине центроида (*CS*) код јединки са различитих локалитета. А. тело-латерално, Б. тело-вентрално, В. главени регион-латерално, Г. главени регион-вентрално.

MANOVA је показала да постоје статистички значајне ($P < 0.005$) разлике у облику анализираних морфолошких целина између јединки са различитих локалитета (Табела 4).

Табела 4. MANOVA варијабли облика (PC скорови), са локалитетом као фактором (*Wilks* λ – вредност *Wilks' Lambda* теста, *F* – Ф вредности, *df1* и *df2* – степени слободе, *P* – статистичка значајност).

	<i>Wilks</i> λ	<i>F</i>	<i>df1</i>	<i>df2</i>	<i>P</i>
Тело (латерална перспектива)	0.0719	8.19	36	108	0.0000
Тело (вентрална перспектива)	0.1600	10.50	18	126	0.0000
Глава (латерална перспектива)	0.1728	4.22	36	108	0.0000
Глава (вентрална перспектива)	0.1366	7.06	28	116	0.0000

Код латералног приказа тела, канонијском дискриминантном анализом (CVA) укупне варијабилности облика установљено је да се по првој оси раздвајају јединке са локалитета Гринду (Румунија) од јединки са локалитета из Србије (Нови Кнежевац и Бачка Паланка), док CV2 оса дискриминише јединке са локалитета Нови Кнежевац и Бачка Паланка (График 6).

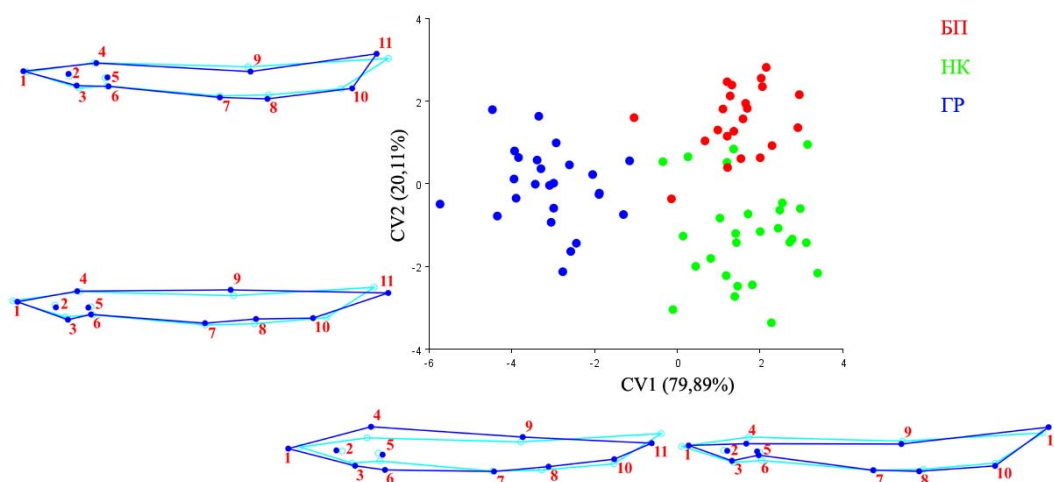


График 6. Канонијска дискриминантна анализа укупне варијабилности облика (тело-латерално) по CV1 и CV2 осима између локалитета (Нови Кнежевац, Бачка Паланка и Гринду).

У односу на *CV1* осу, уочава се да јединке са локалитета Гринду имају шири труп и главени регион, док им је репно пераје нешто краће. По истој оси, јединке са локалитета Нови Кнежевац и Бачка Паланка имају ужи труп и главени регион, а репно пераје им је нешто дуже. У односу на *CV2* осу, јединке са локалитета Бачка Паланка имају спуштен труп у пределу леђног пераја, док им је репно пераје нешто усправљеније. Насупрот њима, јединке са локалитета Нови Кнежевац одликује краћи главени регион, издизање леђног и положеност репног пераја.

Код вентралног приказа тела, канонијском дискриминантном анализом укупне варијабилности облика установљено је да се по првој оси раздвајају јединке са локалитета Гринду (Румунија) од јединки са локалитета из Србије (Нови Кнежевац и Бачка Паланка), док *CV2* оса дискриминише јединке са локалитета Нови Кнежевац и Бачка Паланка (График 7).

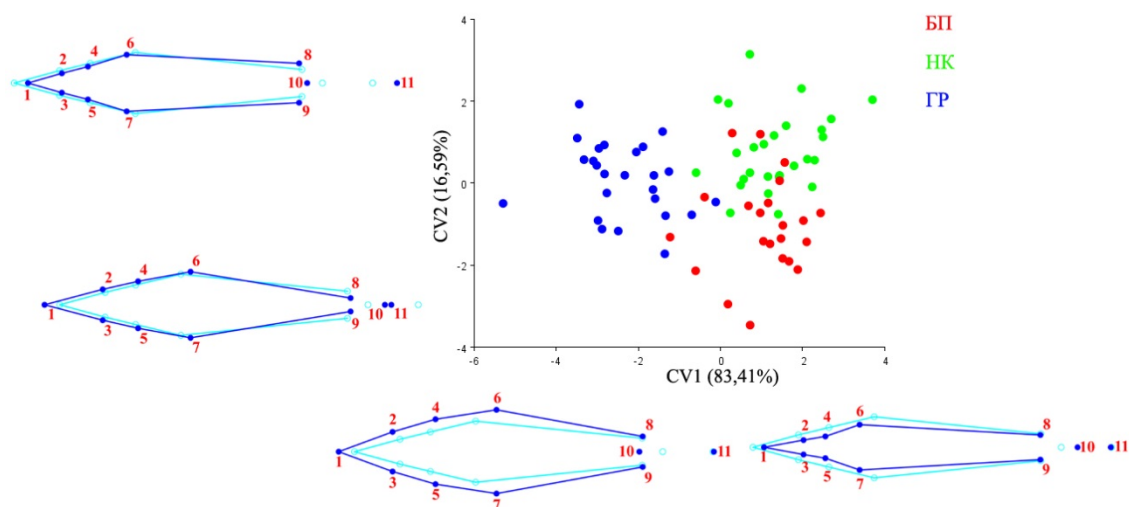


График 7. Канонијска дискриминантна анализа укупне варијабилности облика (тело-вентрално) по *CV1* и *CV2* оси између локалитета (Нови Кнежевац, Бачка Паланка и Гринду).

У односу на *CV1* осу, уочава се да јединке са локалитета Гринду имају шири и дужи главени регион, шири труп и анални отвор значајно померен ка трбушним перајима. Јединке са локалитета Нови Кнежевац и Бачка Паланка, по истој оси, имају ужи и краћи главени регион, труп им је ужи, док се анални отвор удаљава од трбушних пераја. У односу на *CV2* осу, јединке са локалитета Бачка Паланка имају дужи и шири главени регион, тело је шире у пределу грудних пераја али се постепено сужава ка трбушним перајима, док се анални отвор и анално пераје приближавају. Насупрот њима, јединке са локалитета Нови Кнежевац одликује краћи и ужи главени регион, померање грудних пераја ка глави, ширење тела у пределу трбушних пераја, приближавање аналног отвора равни са трбушним перајима, и удаљавање аналног пераја од аналног отвора.

Код латералног приказа главеног региона, канонијском дискриминантном анализом укупне варијабилности облика установљено је да по првој оси долази до раздвајања популације Гринду (Румунија) од популација из Србије (локалитети Нови Кнежевац и Бачка Паланка) (График 8).

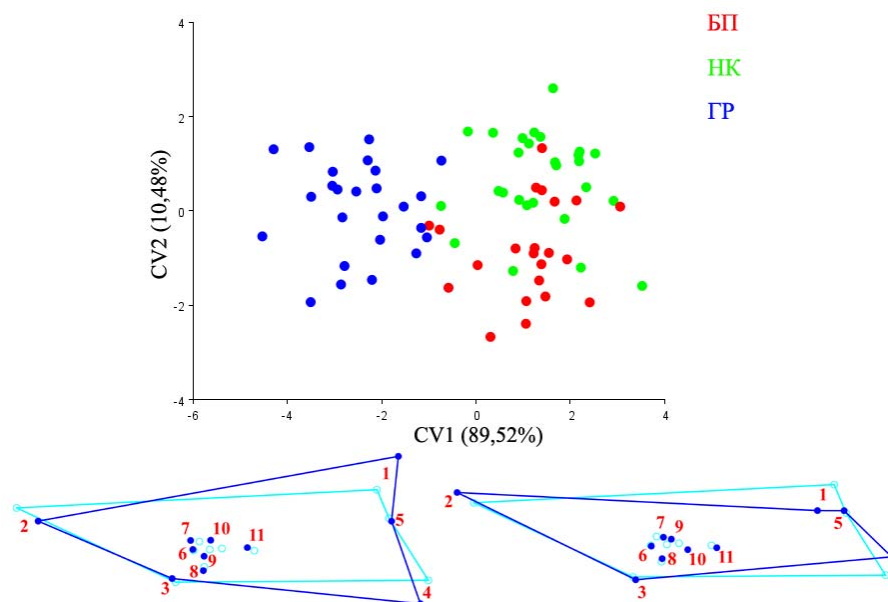


График 8. Канонијска дискриминантна анализа укупне варијабилности облика (главени регион-латерално) по *CV1* и *CV2* оси између локалитета (Нови Кнежевац, Бачка Паланка и Гринду).

У односу на *CV1* осу, уочава се да код јединки са локалитета Гринду долази до скраћивања главеног региона, издизања и повећања нагиба крова лобање, издизања и померања прве леђне плоче од лобање, спуштања доњег дела оперкулума, као и померања ока ка носним отворима. По истој оси, код јединки са локалитета Нови Кнежевац и Бачка Паланка долази до издуживања главеног региона, спуштања крова лобање и почетка леђних плоча, смањивања оперкулума и померања ока од носних отвора.

Код вентралног приказа главеног региона, канонијском дискриминантном анализом укупне варијабилности облика установљено је да се по првој *CV* оси јединке из Дунава (локалитети Гринду и Бачка Паланка) раздвајају у односу на јединке из Тисе (Нови Кнежевац) (График 9).

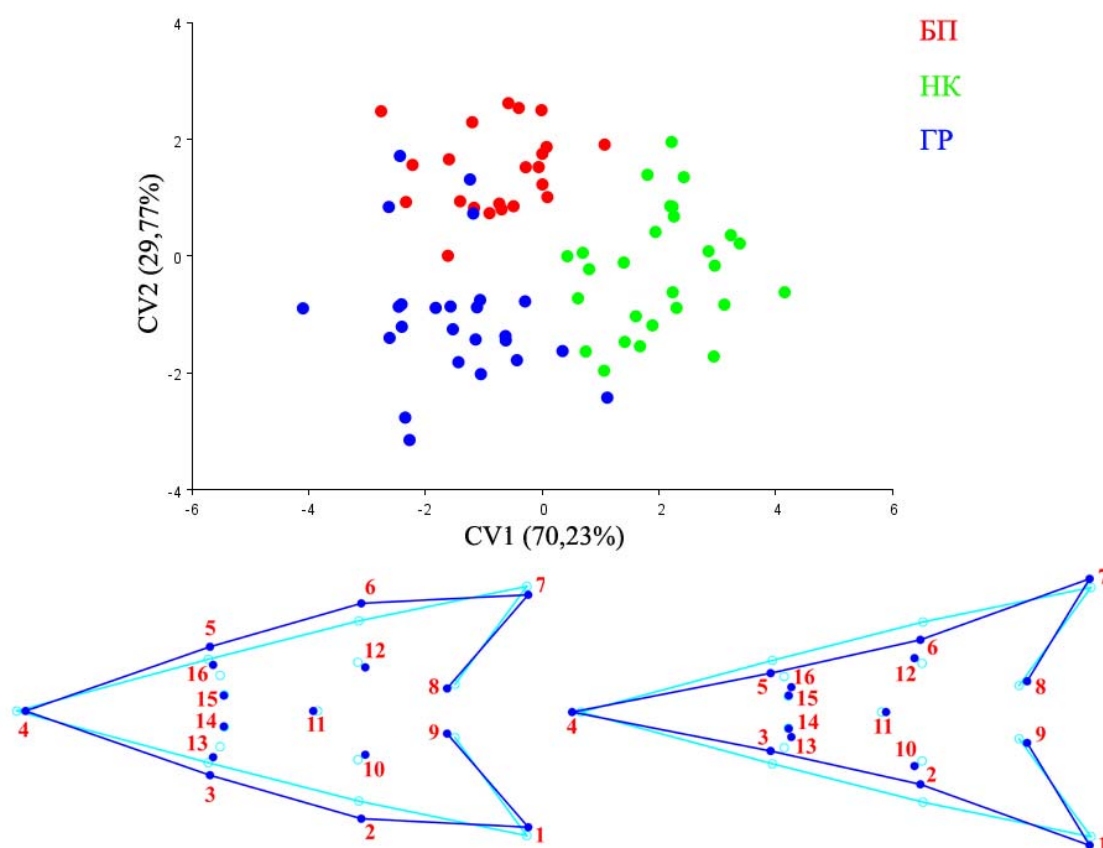


График 9. Канонијска дискриминантна анализа укупне варијабилности облика (главени регион-вентрално) по *CV1* и *CV2* оси између локалитета (Нови Кнежевац, Бачка Паланка и Гринду).

У односу на *CVI* осу, уочава се да код јединки са локалитета Нови Кнежевац долази до сужавања целог главеног региона, међусобног приближавања бркова, усни отвор постаје краћи и шири, док оперкулум такође постаје краћи. По истој оси, код јединки са локалитета Гринду и Бачка Паланка, долази до ширења главеног региона, међусобног удаљавања бркова, усни отвор им постаје ужи, а крајеви оперкулума дужи.

3.3.2. Алометријска компонента варијабилности облика

Мултиваријатном анализом коваријансе тестирана је хомогеност нагиба регресионих кривих облика у односу на величину код јединки са истраживаних локалитета. Код тела и главеног региона у обе анализиране перспективе (латерално и вентрално), интеракција фактора локалитета и *ln CS* није статистички значајна (Табела 5), што указује на то да локалитети показују исти тренд зависности облика од величине.

Табела 5. Мултиваријатна анализа коваријансе; ефекат интеракције локалитета и *ln CS* (*Wilks λ* – вредност *Wilks' Lambda* теста, *F* – Ф вредности, *df1* и *df2* – степени слободе, *P* – статистичка значајност).

	<i>Wilks λ</i>	<i>F</i>	<i>df1</i>	<i>df2</i>	<i>P</i>
Тело (латерална перспектива)	0.4417	1.43	36	102	0.0841
Тело (вентрална перспектива)	0.6719	1.47	18	120	0.1143
Глава (латерална перспектива)	0.4769	1.27	36	102	0.1772
Глава (вентрална перспектива)	0.6643	0.89	28	110	0.6248

Како су нагиби анализираних регресионих кривих били хомогени, урађена је мултиваријатна регресија варијабли облика (Прокрустових координата, односно симетричне компоненте) на логаритмовану варијаблу величине (*ln CS*) са опцијом груписања унутар локалитета. Код тела у латералној перспективи, није утврђен статистички значајан ефекат алометрије на варијабилност облика

($P=0.2339$). Код тела у вентралној перспективи, као и код главног региона у обе перспективе утврђен је статистички значајан ефекат алометрије на укупну варијабилност облика (тело вентрално и главени регион латерално: $P<0.0001$; главени регион вентрално: $P=0.0007$). Алометријска промена облика тела у вентралној перспективи (описује 10.7% укупне варијабилности облика) односи се на смањење риле, сужавање главног региона у пределу бркова и усног отвора као и приближавање ова два региона, померање грудних пераја ка глави, док је трбушни део незнатно ужи и издужен, а анални отвор и анално пераје незнатно померени ка репном делу тела (График 10). Алометријска промена облика главног региона у латералној перспективи (описује 8.5% укупне варијабилности облика) се односи на издуживање врха главног региона, спуштање крова лобање, спуштање прве леђне плоче, смањење оперкулума, као и померање носних отвора и ока ка оперкулуму (График 11). Алометријска промена облика главног региона у вентралној перспективи (описује 6.7% укупне варијабилности облика) односи се на издуживање риле, сужавање региона у пределу бркова, померање бркова ка усном отвору, као и скраћење задњег дела главе, тј. оперкуларних поклопаца (График 12).

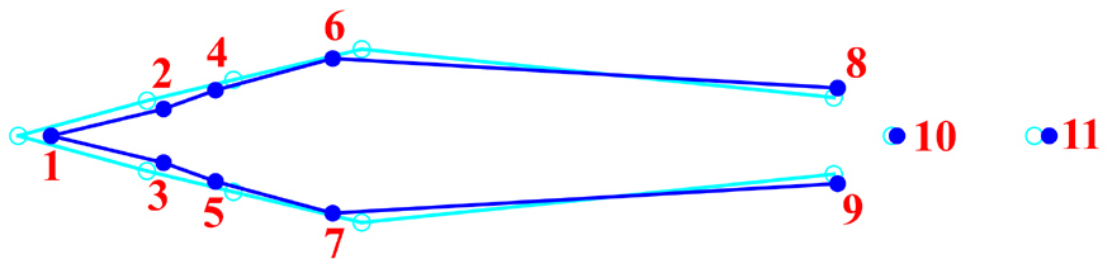
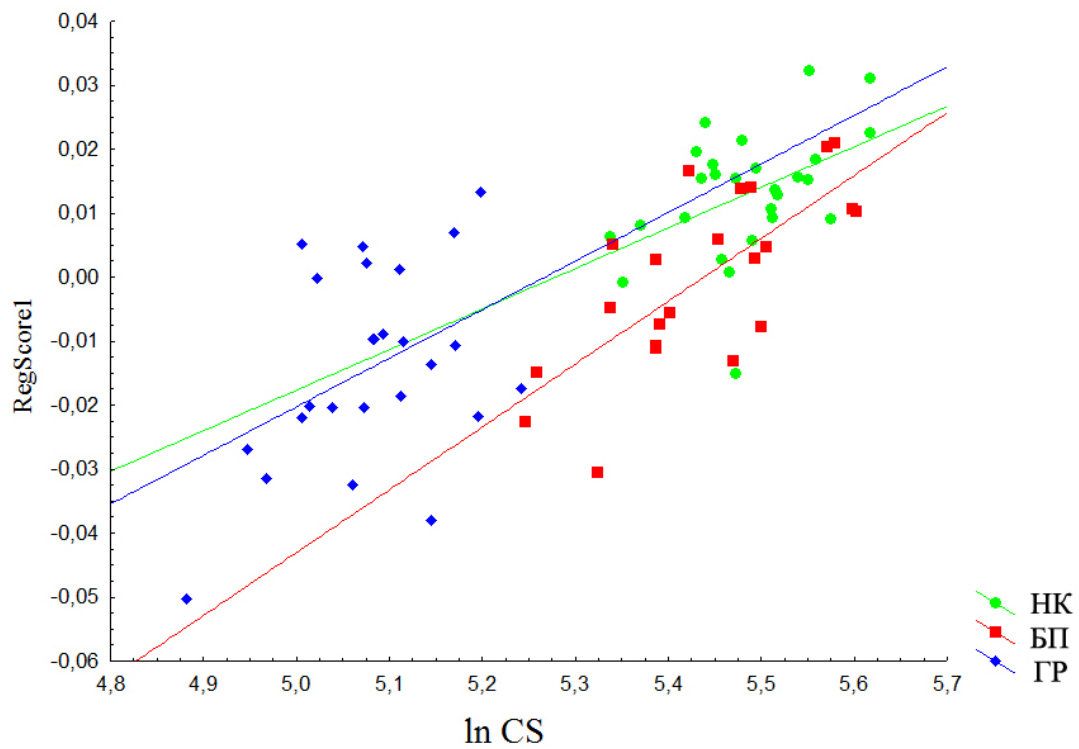


График 10. Мултиваријатна регресија варијабли облика (симетрична компонента) на варијаблу величине ($\ln CS$) и графички приказ алометријске компоненте варијабилности облика анализираних локалитета за тело у вентралној перспективи.

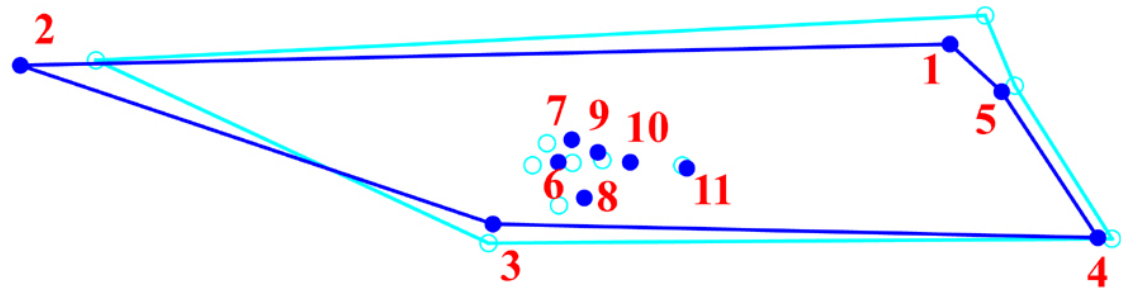
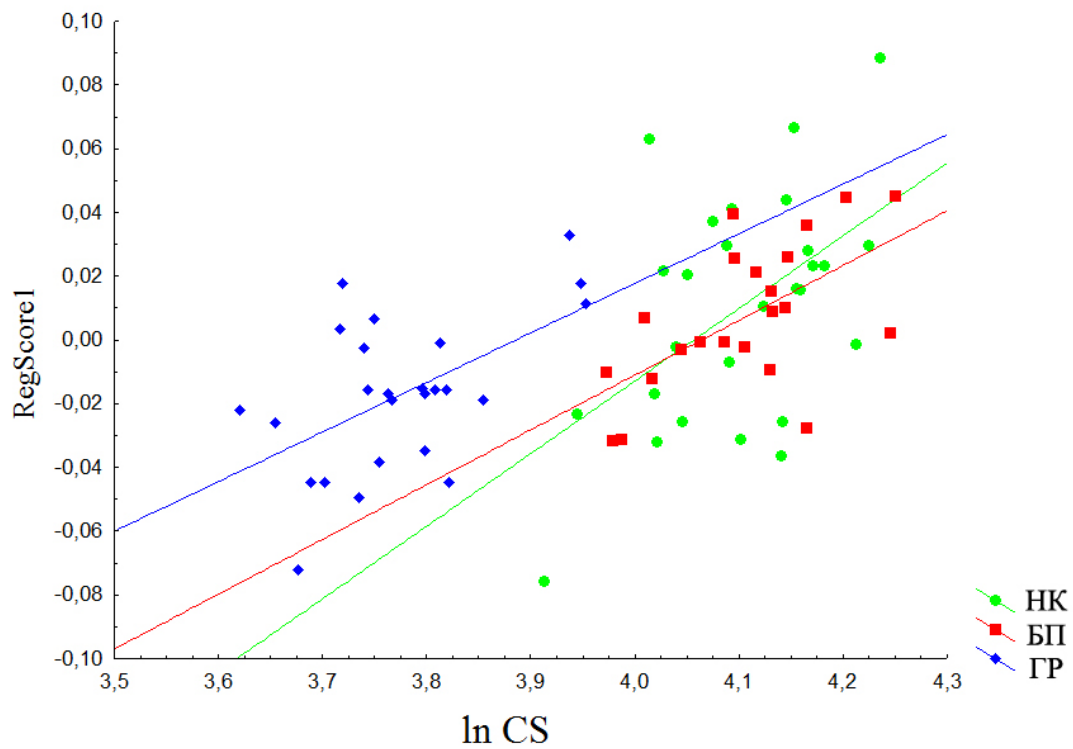


График 11. Мултиваријатна регресија варијабли облика (Прокрустове координате) на варијаблу величине ($\ln CS$) и графички приказ алометријске компоненте варијабилности облика анализираних локалитета за главени регион у латералној перспективи.

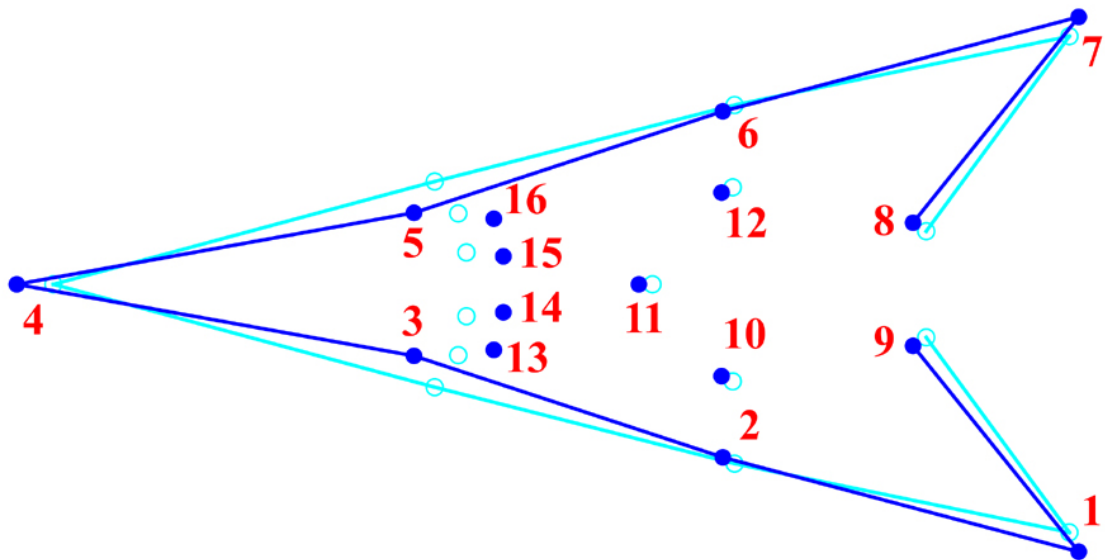
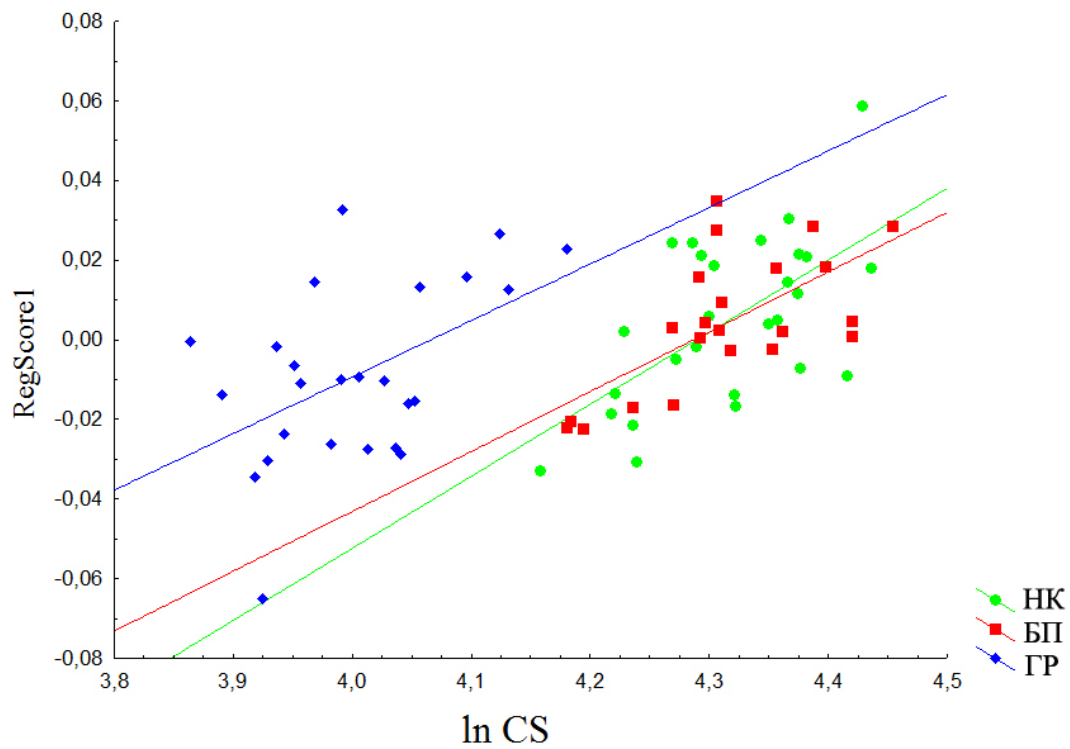


График 12. Мултиваријатна регресија варијабли облика (симетрична компонента) на варијаблу величине ($\ln CS$) и графички приказ алометријске компоненте варијабилности облика анализираних локалитета за главени регион у вентралној перспективи.

3.3.3. Неалометријска компонента варијабилности облика

Канонијска дискриминантна анализа неалометријске компоненте варијабилности облика тела у вентралној перспективи је показала да дуж *CV1* осе постоји раздвајање јединки са локалитета Гринду у односу на јединке са локалитета Нови Кнежевац и Бачка Паланка, док *CV2* оса раздваја локалитет Нови Кнежевац од локалитета Бачка Паланка (График 13).

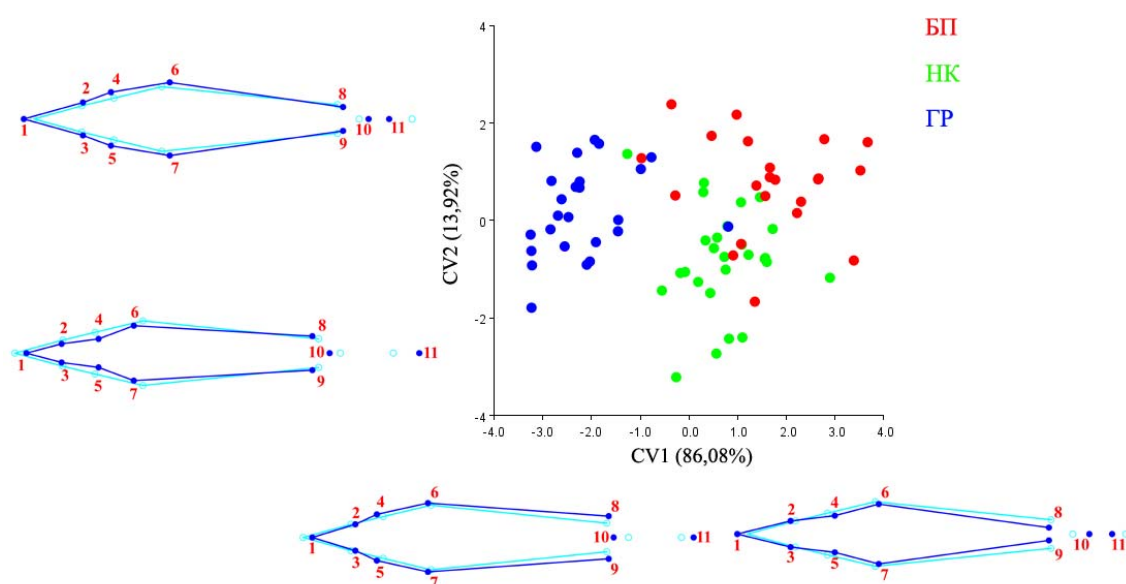


График 13. Канонијска дискриминантна анализа неалометријске компоненте варијабилности облика (тело-вентрално), по *CV1* и *CV2* осе између локалитета (Нови Кнежевац, Бачка Паланка и Гринду).

У односу на *CV1* осу, учава се да код јединки са локалитета Гринду долази до удаљавања региона око бркова од врха главе, регион око усног отвора се шири и приближава ка региону бркова, тело се у пределу трбушних пераја шири, анални отвор се приближава равни трбушних пераја, док се анално пераје удаваља од аналног отвора. По истој осе, код јединки са локалитета Нови Кнежевац и Бачка Паланка, долази до померања региона око бркова ка врху главе, сужавања региона око уста, грудна пераја се померају од главе, тело у пределу

трбушних пераја се сужава, док се анални отвор и анално пераје приближавају једно другом. Дуж *CV2* осе, код јединки са локалитета Бачка Паланка долази до незнатног издуживања риле и ширења главе у области усног региона, удаљавања базе грудних пераја од главеног региона, док су најочљивије промене у репном региону где долази до приближавања аналног отвора и аналног пераја. По истој осе, код јединки са локалитета Нови Кнежевац долази до скраћења риле, сужавања главе у пределу усног отвора, приближавања базе грудних пераја глави, док се анални отвор и анално пераје удаљавају једно од другог.

Канонијском дискриминантном анализом неалометријске компоненте варијабилности облика главеног региона у латералној перспективи уочено је раздвајање јединки са локалитета Гринду у односу на јединке са локалитета Нови Кнежевац и Бачка Паланка дуж *CV1* осе (График 14).

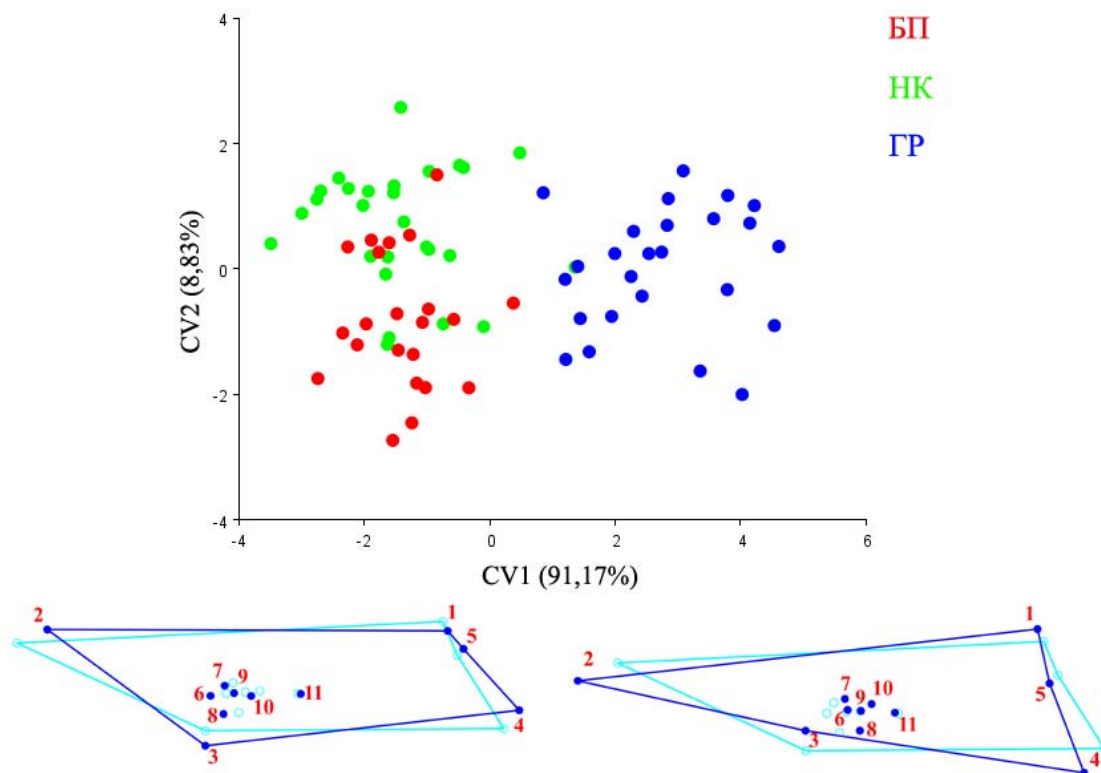


График 14. Канонијска дискриминантна анализа неалометријске компоненте варијабилности облика (главени регион-латерално) по *CV1* и *CV2* осе између локалитета (Нови Кнежевац, Бачка Паланка и Гринду).

У односу на *CV1* осу, уочава се да код јединки са локалитета Гринду долази до издуживања и спуштања предњег дела главеног региона, спуштања доњег дела оперкулума и померања носних отвора ка оперкуларном региону. По истој оси, код јединки са локалитета Нови Кнежевац и Бачка Паланка, долази до скраћења и издизања предњег дела главеног региона, спуштања усног региона у односу на дорзални део лобање, померања врха оперкулума ка грудном делу тела, померања носних отвора ка усном отвору и ка врху риле, док се око увећава.

Канонијска дискриминантна анализа неалометријске компоненте варијабилности облика главеног региона у вентралној перспективи је показала да постоји раздвајање по првој оси јединки са сва три локалитета, док *CV2* оса дискриминише јединке са локалитета Бачка Паланка у односу на јединке остале две популације (График 15).

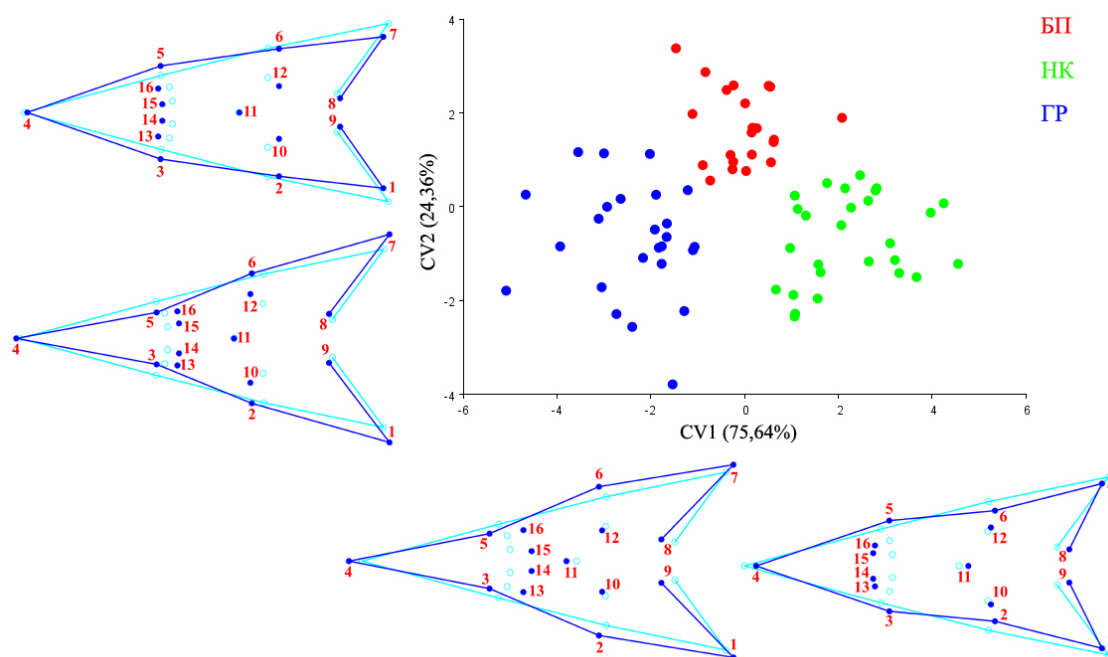


График 15. Канонијска дискриминантна анализа неалометријске компоненте варијабилности облика (главени регион-вентрално), по *CV1* и *CV2* оси између локалитета (Нови Кнежевац, Бачка Паланка и Гринду)

У односу на *CV1* осу, уочава се да код јединки са локалитета Гринду долази до издуживања врха риле, да би се она сужавала ка региону око бркова, док се сами бркови приближавају усном отвору. Главени регион у области око уста и оперкулума се шири. По истој оси, код јединки са локалитета Нови Кнежевац долази до скраћења риле, приближавања бркова њеном врху, ширења региона у области бркова и сужавања региона у области усног отвора и оперкулума. У односу на *CV2* осу, јединке са локалитета Бачка Паланка имају шири регион око бркова који им се померају ка врху риле, а усни отвор и оперкуларна област им се сужавају. Насупрот њима, јединке са локалитета Гринду и Нови Кнежевац имају удаљеније бркове од врха риле, ужу област око бркова, усни отвор им се шири, док се главени регион у нивоу оперкулума проширује и повећава.

3.4. Генетичка варијабилност

3.4.1. Анализа контролног региона мтДНК

Секвенцирањем контролног региона мтДНК (257 бп) 32 јединке на сва три локалитета, детектовано је 13 хаплотипова, од којих је пет новоописаних (*DTHT01-DTHT05*). Новоописани хаплотипови су унешени/депоновани у Банку Гена (*GenBank*), са регистрационим бројевима од KJ941188 до KJ941192. Од свих новоописаних хаплотипова, један (*DTHT01*) је детектован у Тиси, један (*DTHT02*) у средњем току Дунава, док су три (*DTHT03-DTHT05*) детектована у доњем току Дунава. Од претходно описаних хаплотипова, два хаплотипа (*HT03*, *HT12*) су присутна на свим локалитетима, док су хаплотипови *HT01*, *HT08*, *HT26* и *HT31* присутни на по две локације. Разноврсност хаплотипова (енг. *Haplotype Diversity*, *HD*) је најнижа на локалитету НК (0.67), док су друга два локалитета на Дунаву (БП и ГР) имали сличне вредности, 0.91 и 0.92 (Табела 6). Укупна генетичка дистанца описаних хаплотипова је 2.4%. Најмања генетичка дистанца (једна мутација, 0.39%) код узорака из Србије утврђена је између два хаплотипа из Дунава (*DTHT02-HT08*), док је највећа (осам мутација, 3.32%) утврђена између хаплотипова из Тисе и Дунава (*DTHT01-DTHT04* и *DTHT02-HT03*). Хаплотипови

из Румуније са најнижом генетичком дистанцом (једна мутација, 0.39%) у односу на хаплотипове из Тисе и Дунава су *DTHT03-HT03* и *DTHT05-HT10*, док се хаплотипови *DTHT04-HT29* и *DTHT04-HT31* разликују у 10 мутација (4.22%), што је највећа генетичка дистанца регистрована међу узорцима. Међутим, највећа генетичка дистанца (11 мутација, 4.68%) утврђена је између румунских и мађарских хаплотипова (*DTHT04-HT02* и *DTHT04-HT32*).

Табела 6. Разноврсност хаплотипова и њихова учесталост у анализираном узорку.

Хаплотипови	НК (6)	БП (10)	ГР (16)
<i>DTHT01</i>	0.3333	0	0
<i>DTHT02</i>	0	0.3000	0
<i>DTHT03</i>	0	0	0.0625
<i>DTHT04</i>	0	0	0.0625
<i>DTHT05</i>	0	0	0.0625
<i>HT01</i>	0.1667	0.2000	0
<i>HT03</i>	0.1667	0.1000	0.1250
<i>HT08</i>	0	0.1000	0.1250
<i>HT10</i>	0.1667	0	0
<i>HT12</i>	0.1667	0.1000	0.1875
<i>HT26</i>	0	0.1000	0.1250
<i>HT29</i>	0	0	0.0625
<i>HT31</i>	0	0.1000	0.1875
<i>HD</i>	0.67	0.91	0.92

Прегледна статистика за полиморфизам секвенци је дата у Табели 7. НК узорци имају највећу π (0.026), док НК и ГР узорци имају највишу вредност за H (0.933). Најнижу вредност за π (0.022) је код ГР узорака, док је најнижа вредност H (0.911) код БП узорака. Генеалогски односи међу хаплотиповима (График 16) указују на изостанак диференцијације хаплотипова на географски сродне групе.

Tajima (1989) и *Fu & Li* (1993) тестови су показали да није било статистички значајног ($P>0.10$) одступања од *HW* еквилибријума. Негативне вредности за D , D^* и F^* су уочене код узорака из слива средњег Дунава (НК и БП) (Табела 7). Поређење Φ_{st} вредности је показало да нема значајне разлике међу узорцима ($P>0.01$). Најмања генетичка удаљеност (0.018) је између узорака из Дунава (БП и ГР), док вредности за Φ_{st} указују да су узорци из Тисе (НК) нешто више удаљени у односу на ГР (-0.025) и БП (-0.064).

Табела 7. Резултати полиморфизма секвенци контролног региона мтДНК кечиге. H – разноврсност хаплотипова \pm стандардна девијација; π – разноврсност нуклеотида \pm стандардна девијација; θ – полиморфизам хаплотипова по нуклеотидном месту (енг. *per site*) \pm стандардна девијација; D^* и F^* – вредности (*Fu & Li*, 1992); D – вредности (*Tajima*, 1989)

	НК	БП	ГР
H	0.933 \pm 0.12	0.911 \pm 0.08	0.933 \pm 0.04
π	0.0259 \pm 0.0047	0.022 \pm 0.0036	0.022 \pm 0.0022
θ	0.0289 \pm 0.0149	0.025 \pm 0.0113	0.019 \pm 0.0082
D^*	-0.578	-0.203	0.655
F^*	-0.645	-0.316	0.731
D	-0.649	-0.511	0.586

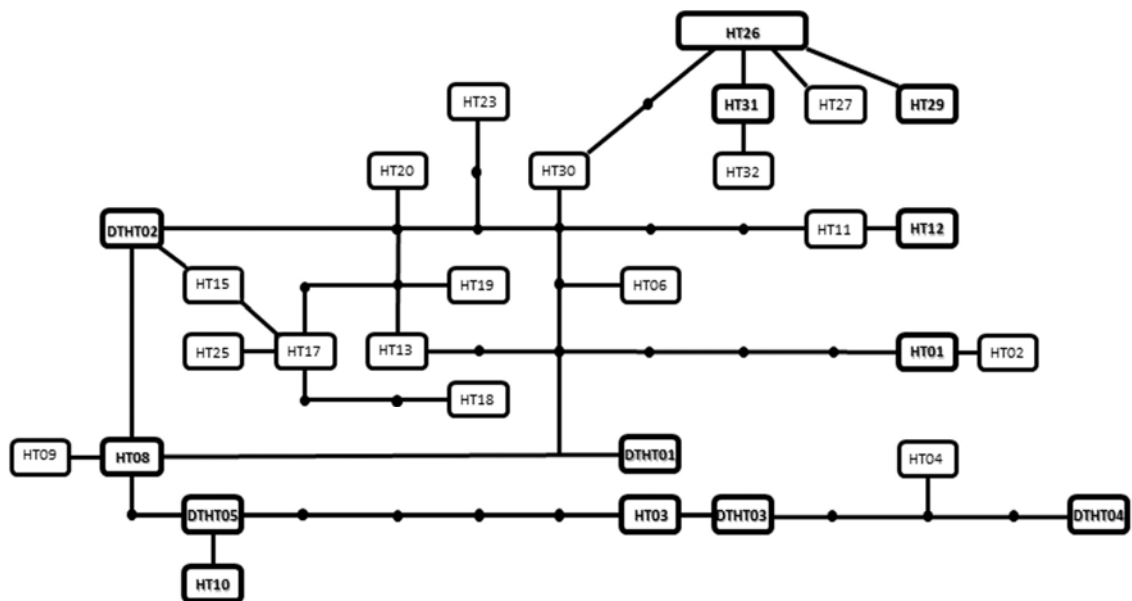


График 16. Мрежа хаплотипова контролног региона мтДНК анализираних узорака и претходно објављених података (*Reinartz et al.*, 2011). Црни кругови представљају изостављене или теоријске хаплотипове; линије представљају појединачне мутације. Наглашенији правоугаоници представљају хаплотипове детектоване у овом истраживању.

Анализа молекуларне варијансе показује да је 99.94% генетичке варијабилности распоређено између индивидуа, уз скоро потпуни изостанак међупопулационе варијабилности (Табела 8).

Табела 8. Резултати анализе молекуларне варијансе мтДНК секвенци контролног региона анализираних узорака. *d.f.* – степени слободe; * - $P < 0.001$.

Извор варијабилности	<i>d.f.</i>	Сума квадрата	Процент варијабилности
Између група	1	3.531	5.78
Између популација унутар групе	1	1.646	-5.72
Између индивидуа	29	83.667	99.94

Негативне вредности за генетичку варијансу унутар групе указују да постоји већа разлика између две популације из исте групе него између две популације из различитих група. Вредности за Gst и Nm показују ниску генетичку диференцијацију и висок до умерен проток гена. Највише вредности ($Gst=0.0153$) забележене су између НК и ГР популација. Високе вредности су такође забележене између НК и БП популација ($Gst=0.0097$), док су најниже вредности ($Gst=0.0037$) забележене између ГР и БП. Највећи проток гена ($Nm=62.90$) је регистрован између ГР и БП популација. Вредности за проток гена између НК и ГР популација ($Nm=16.5$), и НК и БП популација ($Nm=25.43$) су умереније.

3.4.2. Анализа микросателитске ДНК

Очекиване вредности за хетерозиготност (H_e) на локалитетима НК, БП и ГР су 0.591, 0.630 и 0.560. Ове вредности су испод добијених вредности за хетерозиготност (H_o) на локалитетима НК (0.648) и ГР (0.577), док је локалитет БП (0.614) био изузетак. Резултати анализе генетичке варијабилности су дати у Табели 9. Просечан број алела је 4.8 (НК), 4.9 (БП), односно 4.3 (ГР). Вредности F_{IS} указују на значајно ($P<0.001$) одступање од HW равнотеже само код узорака из НК (-0.102), док вредности за БП (0.010) и ГР (-0.032) не показују значајно одступање. Иако статистички тест генетичке диференцијације показује значајну разлику ($P<0.01$) између свих локалитета (Табела 10), детектоване F_{ST} вредности су веома ниске.

Табела 9. Резултати параметара генетичке варијабилности 10 микросателитских локуса анализираних узорака. n_a , број детектованих алела; H_o , добијена хетерозиготност; H_e , очекивана хетерозиготност; R_a , опсег величине алела; M , *Garza-Williamson* индекс; A , средња вредност алела по популацији; $H_o(ave)$, средња вредност добијене хетерозиготности међу локусима; $H_e(ave)$, средња вредност очекиване хетерозиготности међу локусима; $R_a(ave)$, средња вредност опсега величине алела по популацији; $M(ave)$, средња вредност *Garza-Williamson* индекса по популацији.

Локуси	Локалитет									
	НК	БП	ГР	НК	БП	ГР	НК	БП	ГР	
Локуси	Afu 19			Afu 34			Afu 39			
n_a	3	4	4	5	4	5	7	4	5	
H_o	0.685	0.680	0.724	0.805	0.640	0.517	0.829	0.600	0.759	
H_e	0.593	0.640	0.666	0.662	0.739	0.625	0.706	0.688	0.743	
R_a	6	9	9	12	9	12	24	18	18	
M	0.429	0.400	0.400	0.385	0.400	0.385	0.280	0.210	0.263	
Локуси	Afu 54			Afu 68			Spl 101			
n_a	3	3	2	4	5	4	8	11	8	
H_o	0.195	0.292	0.214	0.805	0.600	0.759	0.854	0.720	0.690	
H_e	0.183	0.327	0.195	0.666	0.712	0.670	0.846	0.831	0.825	
R_a	8	8	8	12	16	12	52	60	52	
M	0.333	0.333	0.222	0.308	0.294	0.308	0.151	0.180	0.151	
Локуси	Spl 105			Spl 173			Aox 23			
n_a	4	5	5	4	6	5	4	2	2	
H_o	0.561	0.880	0.556	0.561	0.600	0.586	0.500	0.560	0.407	
H_e	0.610	0.709	0.532	0.441	0.489	0.477	0.493	0.470	0.372	
R_a	12	16	16	28	36	40	9	6	6	
M	0.308	0.294	0.294	0.138	0.162	0.122	0.400	0.286	0.324	
Локуси	Aox 45			Средње вредности						
n_a	6	5	3				A	4.8	4.9	4.3
H_o	0.707	0.565	0.560				$H_o(ave)$	0.648	0.614	0.577
H_e	0.705	0.698	0.496				$H_e(ave)$	0.591	0.630	0.560
R_a	18	18	12				$R_a(ave)$	18.1	19.6	18.5
M	0.316	0.263	0.231				$M(ave)$	0.305	0.282	0.266

Табела 10. Анализа диференцијације популација, на основу микросателитских података. Вредности F_{ST} су изнад, док су вредности за D_{AS} испод дијагонале. Значајност након Бонферони корекције $**P<0.01$.

	НК	БП	ГР
НК		0.018**	0.024**
БП	0.041		0.038**
ГР	0.032	0.063	

Узорци из Дунава (БП и ГР) се највише међусобно одвајају ($F_{ST}=0.038$), док су вредности F_{ST} између НК и ГР 0.024. Најниже вредности F_{ST} (0.018) су уочене између НК и БП. Вредности F_{ST} добијене код јединки на којима је рађена морфометријска анализа показале су да је највеће одвајање ($F_{ST}=0.031$) између узорака из Дунава (БП и ГР), док су вредности између НК и ГР ($F_{ST}=0.023$) и НК и БП ($F_{ST}=0.019$) биле мање, што је у сагласности са вредностима F_{ST} добијеним код целог узорка. Вредности D_{AS} између места узорковања су такође биле ниске, указујући на то да су узорци са сва три локалитета сроднички блиски. Односи између јединки представљени на NJ стаблу, базираном на D_{AS} дистанцама (График 17), показују изостанак груписања узорака по локалитетима.

Анализа молекуларне варијансе показује да генетичка варијабилност може да се припише скоро искључиво индивидуама, уз малу међупопулациону варијабилност (Табела 11). Негативне вредности за генетичку варијабилност на унутарпопулационом нивоу указују на веће разлике између две насумично изабране индивидуе из исте популације него између две индивидуе из различитих популација.

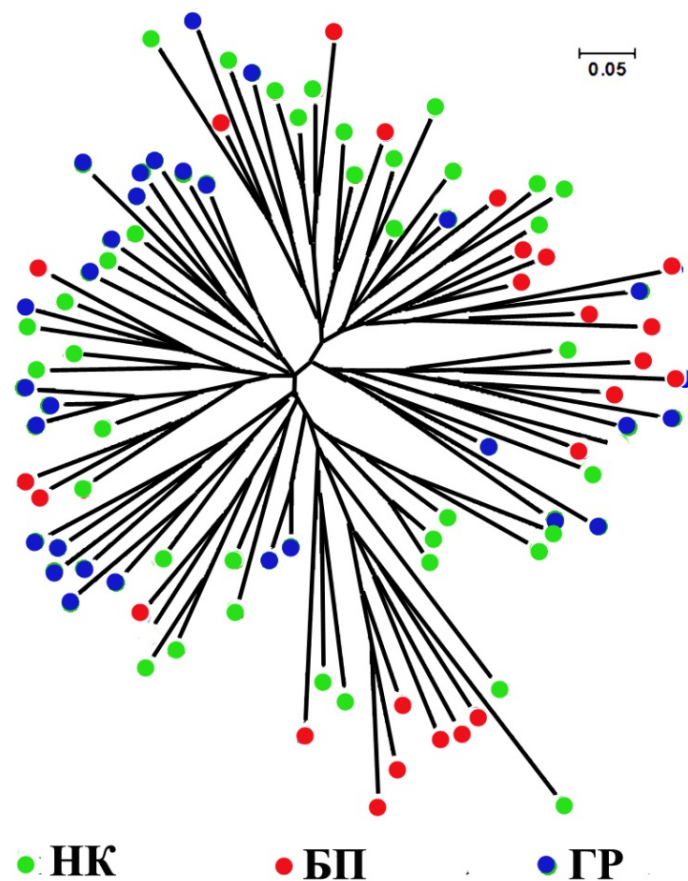


График 17. *NJ* стабло индивида, конструисано на основу D_{AS} дистанци (анализом 10 микросателитских локуса).

Табела 11. Резултати анализе молекуларне варијансе (микросателитски локуси) анализираних узорака. *d.f.* – степени слободe; * - $P < 0.001$.

Извор варијабилности	<i>d.f.</i>	Сума квадрата	Процент варијабилности	Индекс фиксације
Између група	1	7.068	0.59	$F_{CT}=0.02033$
Између популација унутар групе	1	5.818	2.02	$F_{SC}=0.00592^*$
Између индивида унутар популација	92	225.999	-5.63	$F_{IS}=-0.05780$
Између индивида	95	262.000	103.02	$F_{IT}=-0.03016$
Укупно	189	500.884		

Изостанак јасног груписања по популацијама је био регистрован и у резултатима *STRUCTURE* анализе. Вредности $LnP(X/K)$ (енг. *Log Probability Values*) за K , на целом узорку, указују да је најнижа вредност за $K=1$ (-2235.84 ± 0.15) док је највиша вредност за $K=6$ (-2521.09 ± 45.03). Израчунавање ΔK у програму *STRUCTURE HARVESTER* показује да су највише вредности за $K=4$ (9.57), док су друге вредности испод 1.00. Такође, коришћење опције *LOCPRIOR* дало је сличне резултате, где је вредност 4.00 била највиша за $K=4$, док су остале вредности биле испод 1.00. Изостанак јасне генетичке структурираности је видљив у $K=4$ кластеру (График 18), док $K=4$ кластер са употребљеном *LOCPRIOR* опцијом указује на одређену изолацију јединки са ГР локалитета (График 19). Такође, свака $K=4$ итерација са *LOCPRIOR* опцијом је имала средњу вредност за r у распону од 0.2501 до 0.6947.

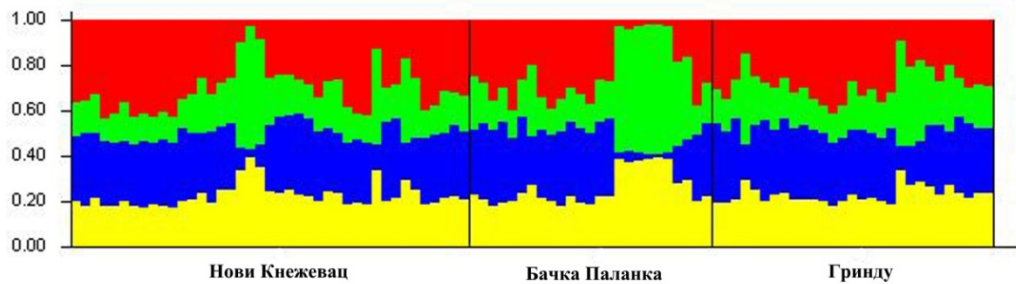


График 18. Резултат *STRUCTURE* анализе на основу 10 микросателитских локуса, под претпоставком четири кластера индивидуа ($K=4$).

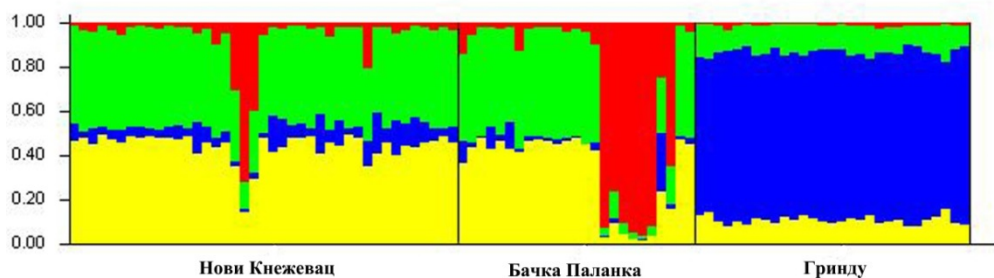


График 19. Резултат *STRUCTURE* анализе на основу 10 микросателитских локуса, под претпоставком четири кластера индивидуа ($K=4$) у оквиру адмикс модела са опцијом *LOCPRIOR*.

Рецентно "уско грло" (Табела 12) није утврђено ($P < 0.05$) ни у једној од анализираних популација, код оба типа подешавања (двофазни модел и модел степенасте мутације). Тест смене режима (енг. *mode shift test*) такође није показао одступање од дистрибуције учесталости алела (енг. *L-shape allele frequency distribution*) код било које популације. M вредности од 0.305 (НК), 0.282 (БП) и 0.266 (ГР) биле су испод конзервативне вредности ($M < 0.68$) које указују на појаву "уског грла" (Garza & Williamson, 2001). Средње вредности добијене коришћењем *linkage disequilibrium* методе у компјутерском програму *NeEstimator v2.01*, биле су 132.8 за НК узорке (95% интервала поверења, 34.1 – Беск.), 8.1 за БП узорке (95% интервала поверења, 3.2 – 15.9) и бесконачно за ГР узорке (95% интервала поверења, 30.3 – Беск.). Приликом коришћења методе вишка хетерозигота, два локалитета (БП и ГР) су имала вредност бесконачно, док су НК узорци имали средњу вредност 30.1 (95% интервала поверења, 3.5 – Беск.). Вредност бесконачно (Беск.) представља немогућност добијања коначног резултата са доступним подацима, као и да метод није могао разликовати високе и бесконачне вредности (Lecis et al., 2008).

Табела 12. Тест за присуство рецентног "уског грла" код анализираних популација кечиге у средњем и доњем току Дунава.

ТЕСТ		НК	БП	ГР
<i>Sign test</i>	95% <i>SMM</i>	0.172	0.359	0.560
	95% <i>TPM</i>	0.401	0.329	0.555
<i>Wilcoxon test</i>	95% <i>SMM</i>	0.375	0.846	1.000
	95% <i>TPM</i>	0.769	0.769	0.846
<i>Mode shift</i>		<i>Normal</i> <i>L-shaped</i>	<i>Normal</i> <i>L-shaped</i>	<i>Normal</i> <i>L-shaped</i>

3.5. Тестирање модела генетичке диференцираности и сличности између генетичке и морфолошке диференцијације

Мантелов тест сличности матрица генетичких и географских дистанци није показао значајну корелацију ($r = 0.5058$, $P=0.3190$), због чега није могао бити прихваћен модел изолације услед удаљености (енг. *isolation-by-distance*). Мантелов тест сличности матрица генетичких и Прокрустових дистанци (израчунатих из резидуалних вредности мултиваријатне регресије варијабли облика на варијаблу величине) такође није показао значајну корелацију (Табела 13).

Табела 13. Мантелов тест сличности матрица генетичких и Прокрустових дистанци. r – коефицијент корелације, P – статистичка значајност.

	r	P
Тело (латерална перспектива)	0.098	0.502
Тело (вентрална перспектива)	0.938	0.337
Глава (латерална перспектива)	0.802	0.173
Глава (вентрална перспектива)	0.776	0.173

4. ДИСКУСИЈА

Иако слив Дунава представља центар диверзитета јесетарских врста у Европи и једно је од кључних станишта за јесетровке у свету, за већину врста се сматра да су одавно прешле степен критичне угрожености. Кечига, као једна од преосталих јесетарских врста, представља врсту од економског значаја те је и даље предмет излова у овој реци, иако је у другој половини XX века дошло до значајног пада њене бројности. У *IUCN* Црвеној листи угрожених врста, ова врста је окарактерисана као рањива, а у Републици Србији постоји национална регулатива према којој је забрањен излов током пролећа у време мреста. Крајњи циљ истраживања је био давање препорука које би помогле у програмима заштите кечиге у Дунаву и Тиси, на основу резултата добијених морфометријским и генетичким методама.

Морфолошка диференцијација јединки по локалитетима је присутна, док изостаје генетичка диференцијација кечига са различитих локалитета у средњем и доњем сливу Дунава. Такође, резултати Мантеловог теста искључују модел изолације услед удаљености, као и одсуство сличности у обрасцима генетичке и морфолошке диференцијације. Резултати ове студије указују на фенотипску пластичност јединки, односно њихово прилагођавање условима средине.

Јединке са локалитета Гринду су биле мање у односу на јединке са локалитета Нови Кнежевац и Бачка Паланка, те се разлике у дужинама кечига и дистрибуцији њихових дужинских класа на различитим локалитетима могу објаснити периодом и методом узорковања. Јединке из румунског дела Дунава су узорковане агрегатом у јулу, док су јединке из Србије (Тиса и Дунав) узорковане у периоду септембар – новембар и то стајаћим рибарским мрежама (промер оцаца 40 mm). Како је период мреста кечиге април – мај, јединке из Србије су имале дужи временски период за раст. Такође, употреба мрежа је донекле селектовала узорак, јер су мање јединке вероватно имале могућност да избегну хватање у мреже или да се из њих избаве. Средње вредности укупне дужине тела јединки са локалитета Нови Кнежевац (333 ± 55 mm) и Бачка Паланка (308 ± 43 mm) у складу

су са вредностима 323 ± 20 mm које су утврдили *Lenhardt et al.* (2012) код Земуна, односно нешто су веће од вредности 276 ± 46 mm које је утврдила *Kolarević* (2004) код Београда. Ипак, забрињавајући тренд смањења броја јувенилних кечига присутан је у Румунији, где је у редовном годишњем узорковању јувенилних јединки (део програма мониторинга које спроводе колеге из *Danube Delta National Institute for Research and Development*) примећен значајан пад бројности у последњих неколико година (*Paraschiv, pers. comm.*). Изградња брана Ђердап 1 и 2 је знатно изменила режим протока воде у средњем и доњем току Дунава (*Djikanović et al.*, 2014), а како готово ништа није урађено на обнављању станишта у Римунији и Бугарској и поред постојећих планова (Национални план управљања јесетарским врстама у Румунији, 2006. и Акциони план за јесетровке у бугарском делу Дунава, 2004.), тренд смањења броја јувенилних јединки је очекиван. Смањење учесталости јувенилних јединки у словачком узорку су потврдили и *Holčík et al.* (2006), што може бити показатељ губитка места за природан мрест кечиге.

Применом метода геометријске морфометрије анализирана је морфолошка диференцијација кечиге у средњем и доњем току Дунава. Анализом варијансе утврђено је да између јединки различитих популација постоје статистички значајне разлике у величини тела и главног региона у обе анализирани перспективе (латерално и вентрално). Међутим, *post-hoc Tukey* тест је показао статистички значајне разлике у величини анализираних морфолошких целина између локалитета Гринду у односу на локалитете у средњем току Дунава (Нови Кнежевац и Бачка Паланка), док се јединке из Новог Кнежевца и Бачке Паланке међусобно нису разликовале у величини. Како су јединке из Румуније имале најмање средње вредности величине центроида у односу на јединке из Србије (График 5), а будући да је величина центроида (као мера величине у геометријској морфометрији) високо корелисана са дужином тела која је коришћена за утврђивање дистрибуције дужинских класа по локалитету, могуће је да су период и метода узорковања такође имали утицај на овај резултат.

Резултати мултиваријатних статистичких анализа (*MANOVA* и *CVA* укупне варијабилности облика) указују на присуство значајних разлика у облику тела и

главеног региона кечига са различитих локалитета. *СVA* укупне варијабилности облика је показала идентичан образац раздвајања локалитета по првој и другој *CV* оси за тело у обе перспективе. Наиме, по првој *CV* оси се одваја румунски локалитет од оба српска локалитета, док се по другој *CV* оси међусобно одвајају српски локалитети (График 6 и График 7). Сличан образац раздвајања анализираних популација присутан је и код *СVA* укупне варијабилности облика главеног региона у латералној перспективи (График 8), где *CVI* оса такође раздваја румунски локалитет од српских локалитета (дуж *CV2* осе се не уочава раздвајање анализираних локалитета). Изузетак од ученог (сличног) начина раздвајања популација по *CVI* и *CV2* оси представља *СVA* укупне варијабилности облика главеног региона у вентралној перспективи (График 9), јер само код ове *СVA* анализе, *CVI* оса раздваја локалитет са Тисе (Нови Кнежевац) од локалитета на Дунаву (Бачка Паланка и Гринду), док се дуж *CV2* осе не уочава раздвајање анализираних популација. Јединке са локалитета Гринду (латерална перспектива тела) имају шири труп и главени регион у односу на јединке из Србије, док јединке из Новог Кнежевца имају краћу главу, спуштен усни отвор, нешто робустније тело и положено репно пераје у односу на јединке из Дунава (Бачка Паланка). Такође, јединке са локалитета Гринду (вентрална перспектива тела) имају шири труп и главени регион у односу на јединке из Србије, док се јединкама са локалитета Нови Кнежевац грудна пераја померају ка глави, те имају краћу и ужу главу, и шири труп у односу на јединке са локалитета Бачка Паланка.

Будући да разлике на генетичком нивоу кечига са различитих локалитета у средњем и доњем сливу Дунава изостају, а присутна је морфолошка диференцијација, ове разлике могу указивати на фенотипску пластичност јединки, односно њихово прилагођавање условима средине. Тако, *Marić et al.* (2015) закључују да међу популацијама умбре (*Umbra krameri*) из Саве, при изостанку генетичких разлика, морфолошке разлике могу бити последица различитих еколошких карактеристика станишта која су релативно скоро фрагментисана услед антропогеног утицаја. Најуочљивија разлика у срединским факторима између локалитета у Румунији и Србији се огледа у великим разликама протока воде на местима узорковања, разликама раствореног наноса у води и температурама воде (Прилог 1, Прилог 2). Како укупна варијабилност облика

обухвата и варијабилност условљену разликама у величини (алометријску компоненту), а између јединки популације Гринду из Румуније и српских популација постоје статистички значајне разлике у величини, утврђена морфолошка диференцијација може бити последица и разлика у величини анализираних јединки. Међутим, између јединки из Тисе (Нови Кнежевац) и Дунава (Бачка Паланка) нема разлика у величини, па би се међу њима утврђене разлике на нивоу укупне варијабилности облика могле објаснити различитим еколошким карактеристикама станишта. Тако би разлике у облику тела у латералној перспективи између узорака из Тисе и Дунава (График 6) могле бити последица разлика у протоцима воде. Наиме, усправнија ивица репног пераја даје већи потисак јесетарским врстама да савладају отпор воденог стуба (*Qu et al.*, 2013). Код јединки са локалитета Бачка Паланка реп је благо усправљен у односу на тело а главени регион је издужен, док је код јединки из Тисе он положен, што јесте индикатор разлика у протоцима воде које кечиге морају да савладају на ова два локалитета. Такође, код јединки из Тисе, усни отвор је незнатно спуштен, док су базе грудних пераја подигнуте више ка леђима. Грудна пераја код кечиге имају стабилизирајућу улогу (*Long Jr*, 1995; *Wilga & Lauder*, 1999; *Drucker & Lauder*, 2002), али их такав положај и чини споријима. Како је проток воде мањи у Тиси, јединкама није потребно да савладавају велики отпор средине и самим тиме одсуствује потреба за брзим кретањем, а такође могу да проводе више времена на дну у потрази за храном. Пошто витко тело може да умањи енергетску потребу рибе приликом тражења и савладавања плена (*Kahilainen & Østbye*, 2006), промене у облику тела (латерално и вентрално) код јединки са локалитета Бачка Паланка могу да укажу на потребу за енергетском уштедом, будући да је отпор воденог стуба знатно већи од оног на Тиси.

Тестирањем хомогености нагиба регресионих кривих облика у односу на величину, утврђено је да локалитети показују исти тренд зависности облика од величине. Статистички значајан ефекат алометрије регистрован је код тела у вентралној перспективи, као и код главног региона у обе перспективе, док код тела у латералној перспективи није утврђено да разлике у величини статистички значајно утичу на разлике у облику. Да ефекат алометрије може бити статистички значајан на нивоу једне, али не и на нивоу друге анализираних перспективе

одређене морфолошке целине показала је и студија варирања облика дорзалног и вентралног кранијума код две врсте миша (*Cordeiro-Estrela et al.*, 2006). Алометријске промене облика тела (вентрална перспектива) се односе на смањење риле, сужавање главеног региона, као и померање грудних пераја ка глави. Алометријске промене облика главеног региона у латералној перспективи обухватају издуживање њеног врха, спуштање крова лобање и прве леђне плоче, померање ока и носних отвора ка оперкулуму, док је за алометријске промене облика главеног региона у вентралној перспективи типично издуживање риле и померање бркова ка усном отвору. Као што је већ споменуто, идентификација две морфе (краткориле и дугориле форме) превасходно је везана за разлике у главеном региону. На основу описаних алометријских промена облика главеног региона намеће се закључак да са повећањем његове величине долази до промена облика које одговарају тзв. дугорилој морфи.

На основу *СVA* неалометријске компоненте варијабилности облика тела у вентралној перспективи и главеног региона у латералној перспективи (График 13 и График 14), уочено је да се дуж *CVI* осе јединке румунске популације Гринду јасно раздвајају од јединки српских популација Нови Кнежевац и Бачка Паланка. Будући да је неалометријска компонента варијабилности облика у потпуности ослобођена утицаја разлика у вечини, раздвајање популација кечиге на нивоу неалометријске компоненте варијабилности може бити последица живота у различитим условима средине, али не и разлика у величини анализираних јединки. На нивоу неалометријске компоненте варијабилности облика тела у вентралној перспективи уочљиво је његово издуживање код кечига из Румуније у односу на кечиге из Србије (График 13), што би могло указати на то да је потребан већи потисак да би се савладао отпор воде. Према истраживању *Qu et al.* (2013), варирање у облику главе указује на морфолошку адаптираност јесетри у циљу смањења површине (како би смањиле енергетски утрошак), пошто излагање веће површине протоку воде повлачи са собом већи отпор. Такође, код издуженије и конкавне главе протицање воде се одвија дуж ивице риле како би се избегао додатни отпор, на шта указује облик главеног региона у латералној перспективи код јединки из Румуније (График 14). Такође, крупније очи и положај грудних пераја код кечига из Србије, може да укаже да је исхрана ових

јединки у дубљој и мање осветљеној зони, пошто су добро маневрисање и бољи вид предност у оваквим стаништима (*Kahilainen & Østbye, 2006*). На основу *CVI* неалометријске компоненте варијабилности облика главеног региона у вентралној перспективи (График 15), утврђено је да *CVI* оса раздваја јединке све три анализирани популације, са највећом разликом између румунске популације Гринду и популације Нови Кнежевац из Тисе. Такође, *CVI* неалометријске компоненте варијабилности облика главеног региона у обе перспективе указују на могућност да кечиге из Србије (нарочито оне из Тисе) одговарају краткорилој, док кечиге из Румуније одговарају дугорилој форми. Наиме, на нивоу неалометријских промена облика главеног региона у вентралној перспективи (График 15), код јединки популације Нови Кнежевац у односу на јединке популације Гринду присутна је краћа рила са брковима ближим њеном врху, а главени регион им је шири у нивоу основе бркова, а ужи у нивоу бочних ивица усног отвора и оперкулума. Јединке са локалитета Гринду, поред дуже риле са брковима удаљенијим од њеног врха, одликује и шири главени регион у нивоу бочних ивица усног отвора и оперкулума. Шири главени регион у нивоу бочних ивица усног отвора и оперкулума у складу је са ранијим запажањем да дугорилу форму одликује и шира глава (*Ristić, 1971*). Такође, описане разлике у облику главеног региона између јединки румунске и српских популација кечиге одговарају разликама између краткориле и дугориле морфе уоченим од стране *Ognjanović et al. (2008)* који су на два локалитета из средњег тока Дунава кроз Србију утврдили присуство обе морфе, са најизраженијим разликама у облику и дужини риле, нарочито у области риле испред бркова. Код јесетровки, олфакторна чула имају најважнију улогу у детекцији хране на већој раздаљини и њеном положају у воденом стубу (*Gerasimov & Vasyura, 2013*). Активна улога бркова, тј. њихово усмеравање ка напред и назад, помаже кечигама приликом копања дна врхом риле у потрази за храном (*Bloesch et al., 2006*). То додатно може указати на могућност да су кечиге из Србије више адаптиране за спорији ток (краћа рила) и за дуже време проведено на дну у потрази за храном (бркови ближи врху риле).

На крају, како морфометријске анализе варијабилности облика главеног региона у овој студији нису имале за циљ утврђивање унутарпопулационих разлика није могуће са сигурношћу потврдити постојање или одсуство две морфе

унутар појединачних локалитета. Међутим, спроведене морфометријске анализе варијабилности облика главног региона (нарочито оне на нивоу неалометријске компоненте) указују на чињеницу да кечиге из Србије одговарају краткорилој, а кечиге из Румуније дугорилој форми. Ипак, могуће је да је због промене услова средине у средњем току слива Дунава (смањење протока, повећање суспендованих честица) након изградње брана Ђердап 1 и 2 дошло до учесталије појаве краткориле форме, која је више прилагођена постојећим условима средине.

Коришћење генетичких маркера (мтДНК и микросателита) имало је за циљ утврђивање постојања разлика између јединки и популација, као и протока гена између популација у средњем и доњем току Дунава. Тако је анализа контролне регије указала на присуство истих хаплотипова у различитим деловима Дунава, што може бити последица порибљавања, великих миграција или постојања предачких хаплотипова. Неки хаплотипови (*HT01*, *HT08*, *HT10*, *HT29*), који су претходно детектовани у Словачкој и Мађарској (*Reinartz et al.*, 2011), овим истраживањима су утврђени и за српски и румунски део Дунава, као и за реку Тису. Неки од хаплотипова (*HT03*, *HT12*, *HT31*), који су раније регистровани у српском делу Дунава, сада су утврђени и у Румунији (Гринду). Занимљиво је и присуство хаплотипа *HT10* у узорку из Тисе (Нови Кнежевац), пошто је он до сада утврђен само у словачком делу Дунава (*Reinartz et al.*, 2011), и то на раздаљини од 700 километара. Будући да је ареал кретања кечиге у Дунаву између 200 и 300 километара од њиховог резиденталног станишта (*Ristić*, 1971), преклапање субпопулација омогућава сталан проток гена и панмиктичност популације, што је у складу са истраживањима *Reinartz et al.* (2011). Ипак, само мерење протока гена није довољно да би се уочио обим локалних адаптација које се јављају у великим популацијама које размењују мали број миграната и које су под високим селективним притиском (*Garcia de Leaniz et al.*, 2007). Проток гена, са једне стране мења и одржава генетички диверзитет и популациону структуру (*Song et al.*, 2011), док са друге стране смањује локалну адаптираност (*Kawecki & Ebert*, 2004). Анализа молекуларне варијансе мтДНК, као и ниске *Gst* вредности, потврђују да је генетичка варијабилност скоро искључиво везана за разлике између индивидуа, као и да изостаје генетичка диференцијација популација. Такође, анализа контролне регије указује да постоји интензиванији проток гена

између средњег и доњег тока Дунава, него између Тисе и других локалитета на Дунаву (Бачка Паланка и Гринду). Ипак, присуство брана је (генерацијски) сувише кратко да би се са сигурношћу утврдио ефекат на гентичку диференцијацију и проток гена код кечиге у овом делу Дунава. На неатрактивност Тисе за кечиге, осим бране код Новог Бечеја, утицај имају и мањи проток воде и количина суспендованог наноса у води јер чини ову реку неповољном за природан мрест. Тачних података о местима где се кечиге мресте у средњем и доњем току Дунава и Тисе готово да нема, па би то морало да буде предмет будућих истраживања. Према *Bloesch et al.* (2006) било која редукација протока воде у периоду миграција код јесетровки умањује привлачност одређене реке. На проток гена између јединки са различитих локалитета, а самим тим и на њихову већу способност дисперзије, указују и ниске F_{ST} вредности (између 0.018 и 0.038) у односу на F_{ST} вредности (у просеку 0.222) које су утврђене код слатководних рибљих врста (*Ward*, 2006). Ови резултати су у складу са ниским F_{ST} вредностима (између 0.003 и 0.051) које је за кечиге у Дунаву утврдио *Reinartz et al.* (2011). Такође, *NJ* стабло (добијено на основу D_{AS} дистанци; График 17) показује изостанак диференцијације међу јединкама са различитих локалитета. *Deiner et al.* (2007) су истраживали популациону структуру и генетички диверзитет калифорнијске пастрмке (*Oncorhynchus mykiss*) изнад и испод брана и природних препрека, и утврдили да су вредности F_{ST} (између 0.03 и 0.068) међу узорцима испод препрека биле доста сличне вредностима F_{ST} (између 0.06 и 0.091) међу узорцима изнад препрека. Ипак, просечна вредност F_{ST} (0.159) између узорака калифорнијске пастрмке изнад и испод препрека предочава диференцијацију популација. Разлог изостанка јасне диференцијације код узорака из ове студије можемо наћи у наводима *Harris & Taylor* (2010) према којима изостанак диференцијације може бити показатељ да је регион колонизиран од стране једне панмиктичне популације, па није било услова (физичке раздвојености и времена) који би омогућили диференцијацију. Како је генерацијско време кечиге око 7.8 година (*Froese & Pauly*, 2013), а бране на Тиси и Дунаву су ту свега 40 година (што одговара времену од пет генерација), податке о протоку гена и изостанку диференцијације у овом региону требало би размотрити уз додатна истраживања (маркирање, телеметрија). Истраживања на бледој јесетри (*Schrey & Heist*, 2007)

су показала да постоји статистички значајна ($P < 0.001$) диференцијација између јединки из река Мисури и Мисисипи, са вредностима F_{ST} између горњег Мисурија и осталих локалитета у распону између 0.054 и 0.068. Тест статистичке значајности и наведене F_{ST} вредности показују нешто виши ниво диференцијације код бледе јесетре у односу на резултате добијене у овој студији. Будући да су бране на рекама Мисури и Мисисипи грађене у периоду између 1933. и 1963. године, као и да је бледа јесетра слатководна риба и да јој је генерацијско време (7.1 година) слично кечиги, утицај изградње брана у Ђердапу на диференцијацију популација кечиге у Дунаву би могао да се осети у наредних 25 до 30 година.

Да постоји фрагментираност популација јединки на локалитетима у средњем и доњем току Дунава, указивала су ранија истраживања (*Hensel & Holčik, 1997; Holčik et al., 2006*) која су утврдила да маркиране кечиге у Дунаву и поред присуства преводница на брани не могу да мигрирају узводно. Резултати ове дисертације не потврђују претходно наведено, јер је анализа молекуларне варијансе код микросателита показала да је генетичка варијабилност скоро искључиво везана за индивидуе. Такође, код анализе структурираности, иако је вредност ΔK највећа за $K=4$ (9.57), то је значајно мање од популација које имају изражене високе вредности за ΔK у распону од 130 до 839 (*Haanes et al., 2011; Adnađević et al., 2012; Marić et al., 2012; Taugbøl et al., 2013*). Како ΔK није могуће израчунати код $K=1$ (*Evanno et al., 2005*), и како је вредност логаритмоване вредности ($\ln P(X/K)$) највећа за $K=1$, све указује да не постоји популациона диференцираност између испитиваних популација. Ипак, када се употреби модел који при анализи укључује и информације о популационој припадности, долази до слабог одвајања популације из Румуније. Слаба субструктурираност узорака из Србије може бити последица, како порибљавања ових река кечигама из мађарског дела Дунава, тако и уоченим масовним узводним миграцијама кечига након изградње брана на овим рекама (*Janković et al., 1994; Hensel & Holčik, 1997; Guti & Gaebeler, 2009*). На овај тренд указује и анализа статистике улова кечиге где је изражен пад улова у области брана Ђердап 1 и Ђердап 2, између 1969. и 1980. године, док у исто време долази до повећања улова у горњем делу Дунава (и доњем делу Тисе) у Србији (Прилог 3). Масовне миграције могу бити и разлог негативних вредности за D и (D^* и F^*) код узорака из средњег Дунава, пошто

негативне вредности представљају скорашње ширење популације. Такође, будући да кечиге у словачком и мађарском делу Тисе не мигрирају (*Hensel & Holčik, 1997*), изостанак диференцијације је можда последица порибљавања Тисе у Мађарској јединкама које потичу из Дунава (*Rideg, pers. comm.*). Одступање од *HW* равнотеже, које је утврђено код узорака из Тисе, указује на могуће порибљавање. У плановима управљања природним популацијама погрешна претпоставка о изостанку локално адаптираних популација (када оне постоје) може да допринесе већој штети од грешке управљања популацијама као да имају локалну адаптацију (а у стварности је немају) (*Garcia de Leaniz et al., 2007*). Због тога је утврђивању диференцијације популација и њиховој адаптацији неопходно посветити додатна истраживања.

И поред значајног смањења бројности популација кечига у Дунаву (*Reinartz, 2002; Lenhardt et al., 2004:1; Holčik et al., 2006; Guti & Gaebele, 2009; Smederevac-Lalić et al., 2011*), резултати ових истраживања нису са сигурношћу потврдили присуство "уског грла". Бројчано осиромашене популације могу да избегну "уско грло" ако успеју брзо да се опораве, ако је проток гена довољан да се супротстави генетичком дрефту, уколико је врста дугоживећа и уколико ефекат демографског "уског грла" није изузетно јак (*Chapman et al., 2011*). Кечиге се сматрају дуговечним рибама (максимална старост од 26 до 36 година; *Froese & Pauly, 2013*), те је могуће да генетички дрефт није имао довољно времена да смањи предачку генетичку варијабилност јер је првобитна популација била довољно велика. Такође, чак и код популација са великим падом бројности (95-99%) може да изостане генетичко "уско грло" ако је почетна популација била толико велика да остане довољан број јединки које би одржале ефективну величину популације на неколико стотина (*Chapman et al., 2011*). Према подацима *Smederevac-Lalić et al. (2012)*, део Дунава код Бачке Паланке је под великим риболовним притиском, јер на два километра тока рибари 12 рибара. Будући да *Peery et al. (2012)* сматрају да је за детекцију "уског грла" неопходно између 31 и 38 јединки са локалитета, постоји могућност да због недовољног броја испитиваних јединки ($n=25$) са овог локалитета, генетички дрефт није регистрован. Међутим, пошто изостаје ефекат инбридинга, и пошто је генетички диверзитет велики, сценарио изостанка "уског грла" услед мале величине узорка је

мало вероватан. Са друге стране, риболовни притисак на овој секцији Дунава може бити и разлог најниже краткорочне ефективне величине популације (8.1), те постоји могућност да "уско грло" може бити неприметно због програма порибљавања (*Guti & Gaebele, 2009; Smederevac-Lalić et al., 2011; Lenhardt et al., 2012*), који доводе до краткорочног повећавања генетичке варијабилности. У циљу избегавања или умањења инбридинг депресије у кратком временском периоду (нпр. пет генерација) ефективна величина популације би морала да буде између 50 и 100 јединки, док би за дугорочно одржавање популације било потребно између 500 и 1000 јединки (*Frankham et al., 2014*). Иако процењена ефективна величина популације из Тисе одговара опсегу за краткотрајну ефективну величину популације, популација из горњег дела Дунава у Србији испољава изражено смањење величине. Ипак, узимање узорака врста које имају узрасну структурираност условљава да се резултати *LD* методе тумаче као процена ефективног броја јединки које репродуктивно дају кохорту из које је узет узорак (*Waples & Do, 2010*). Пошто је у овом делу Дунава присутан тренд улова мањих дужинских класа (*Lenhardt et al., 2004:1*), могуће је да је N_e са овог локалитета заиста N_e кохорте. На жалост, и овакав сценарио је забрињавајући за заштиту ове врсте, па би требало размотрити увођење мораторијума на улов кечиге у Србији. Јаснија слика стања кечиге у овом делу Дунава изискује више података, па је препорука да се конзервативније поступа и да се кечиге из овог дела Дунава сматрају угроженим.

Резултати Мантеловог теста показују да детектована генетичка диференцијација јединки са различитих локалитета није у корелацији са променама у облику тела и главног региона, нити је последица географске удаљености. Једно од објашњења ових резултата јесте избор станишта миграната. Одступање од насумичне дистрибуције алела у ареалу доводи до појаве да постоји већи проток гена између удаљених станишта са истим условима средине у односу на блиска станишта са различитим условима средине (*Kawecki & Ebert, 2004*), на шта указују вредности за Nm добијени у овом истраживању. Изостанак везе између разлика у облику тела и главног региона (морфолошке диференцијације) и генетичке диференцијације испитиваних популација може указивати на фенотипску пластичност кечиге из слива Дунава. Према *Kawecki & Ebert (2004)*,

фенотипска пластичност води ка фенотипској диференцијацији не утичући на генетичку диференцираност. Управо би постојање две морфе било пример фенотипске пластичности кечиге. Резултати ових истраживања показују да, иако је кечига реофилна рибља врста, јединке из средњег тока Дунава, чији облик главеног региона одговара краткорилој морфи, поседују низ морфолошких карактеристика које им омогућавају успешан боравак у средини са слабијим протоком воде и већом количином суспендованог наноса. Иако *Ristić* (1971) наводи да постоји репродуктивна изолованост између краткориле и дугориле форме кечиге, проток гена између румунске популације (чије јединке више одговарају дугорилим) и популација из Србије (чије јединке више одговарају краткорилим) утврђен овом студијом, не иде у прилог његовој тврдњи. Присуство и учесталост различитих форми кечиге (краткорила и дугорила) би могао бити индикатор услова средине, а избор адекватних јединки (за порибљавање одређеног станишта) основа правилних мера заштите кечиге у сливу Дунава. Међутим, јаснији увид у морфолошку диференцијацију кечиге у сливу Дунава пружила би додатна обимнија истраживања која би обухватала бројнији узорак, већи број анализираних локалитета и већи број узрасних класа. Такође, учестали мониторинг генетичке структуре дивљих популација кечиге је адекватан приступ код утврђивања да ли је нека појава правилност или специфичан догађај.

5. ЗАКЉУЧЦИ

- Присуство мањих јединки у узорку кечиге из средњег и доњег тока Дунава је и даље преовлађујућа појава.
- Постоје морфолошке разлике (у величини и облику тела и главеног региона) између кечига са различитих локалитета. Утврђене међупопулационе разлике у облику анализираних морфолошких целина, присутне на нивоу укупне и неалометријске компоненте варијабилности облика су највероватније последица разлика у условима средине.
- На нивоу неалометријске компоненте варијабилности облика главеног региона у обе анализираних перспективе установљено је да јединке из Румуније у односу на јединке из Србије имају издуженију и конкавнију рилу, бркове удаљеније од врха риле и главени регион ужи у нивоу основе бркова, а шири у нивоу бочних ивица усног отвора и оперкулума, што указује на могућност да кечиге из Србије (нарочито оне из Тисе) одговарају краткорилој, док кечиге из Румуније одговарају дугорилој форми.
- Генетичка структура кечига из средњег и доњег тока Дунава показује скоро потпун изостанак генетичке диференцираности између јединки са различитих локалитета. Генетичка варијабилност скоро у потпуности припада индивидуама у оквиру локалитета. Такође, детектован је значајан генетички диверзитет употребом оба типа маркера.
- Будући да разлике на генетичком нивоу кечига са различитих локалитета у средњем и доњем сливу Дунава изостају, уочене међупопулационе разлике на морфолошком нивоу могу указивати на фенотипску пластичност јединки, односно њихово прилагођавање условима средине.
- Утицај изградње брана на проток гена између кечига из Дунава и Тисе још увек нема изражен ефекат, што је последица њихове не тако давне изградње. Међутим, изражен је њихов негативан утицај на животни циклус кечиге у Дунаву, индиректно путем промене животне средине.
- Морфолошке специфичности кечига из Тисе у односу на дунавске, као и мањи проток воде и већи пронос лебдећег наноса показују да ова река постаје неатрактивна за природан мрест ове врсте.

- Укључити анализе геометријске морфометрије и молекуларне генетике у програме порибљавања кечиге, како би изабране јединке биле одговарајуће за дато станиште.
- Резултати генетичких анализа указују на и даље присутан риболовни притисак у средњем делу Дунава, те би требало увести забрану излова кечиге на територији Србије.
- Неопходно је утврдити места мреста кечиге у Дунаву и Тиси, и ставити их под строги режим заштите.

6. ЛИТЕРАТУРА

Adnađević T., Bugarski-Stanojević V., Blagojević J., Stamenković G., Vujošević M. (2012). Genetic differentiation in populations of the yellow-necked mouse, *Apodemus flavicollis*, harbouring B chromosomes in different frequencies. *Population Ecology* **54**, 537-548.

Arlati G., Hernando J.A., Poliakova-Belysheva L.A., Soriguer M.C. (1999). Some meristic characteristics of hybrids between *Acipenser naccarii* and *Acipenser baerii*. *Journal of Applied Ichthyology* **15**, 54-56.

Bacalbasa-Dobrovici N., Patriche N. (1999). Environmental studies and recovery actions for sturgeons in the Lower Danube River system. *Journal of Applied Ichthyology* **15**, 114-115.

Bakhshalizadeh S., Bani A., Abdolmalaki S. (2013:1). Comparative morphology of the pectoral fin spine of the Persian sturgeon *Acipenser persicus*, the Russian sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii*, and the Starry sturgeon *Acipenser stellatus* in Iranian waters of the Caspian Sea. *Acta Zoologica* **94**, 471-477.

Bakhshalizadeh S., Bani A., Abdolmalaki S. (2013:2). Morphometric features in the pectoral fin spine of the great sturgeon (*Huso huso*) and the ship sturgeon (*Acipenser nudiventris*, Lovetsky, 1828). *Journal of Applied Ichthyology* **29**, 730-732.

Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N., Bonhomme F. (1996-2004). GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France).

Berg, L.S. (1932). Ribi presnih vod SSSR i sopredelnih strain. Č.I. Izd. 3., 52-53.

Берг, Л.С. (1934). Яровые и озимые расы у рыб. Извест. А.Н. СССР, отд. мат. и естест. наук. № 5, Москва – Ленинград.

Birstein V.J., Doukakis P., DeSalle R. (2000). Polyphyly of mtDNA lineages in the Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*: forensic and evolutionary implications. *Conservation Genetics* **1**, 81-88.

Birstein V.J., Doukakis P., DeSalle R. (2002). Molecular phylogeny of Acipenseridae: nonmonophyly of Scaphirynchidae. *Copeia* **2**, 287-301.

Bloesch J., Jones T., Reinartz R., Stribela B. (2006). Action Plan for the conservation of sturgeons (Acipenseridae) in the Danube River Basin. Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats (Bern Convention). *Nature and Environment* **144**, 122 pp.

Bookstein F.L. (1991). Morphometric tools for landmarks data. Geometry and biology. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Bowcock A.M., Ruiz-Linares A., Tomfohrde J., Minch E., Kidd J.R., Cavalli-Sforza L.L. (1994). High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* **368**, 455-457.

Brown J.R., Beckenbach A.T., Smith M.J. (1997). Intraspecific DNA Sequence Variation of the Mitochondrial Control Region of White Sturgeon (*Acipenser ruthenus*). *Molecular Biology and Evolution* **10** (2), 326-341.

Chapman D.D., Simpfendorfer C.A., Wiley T.R., Poulakis G.R., Curtis C., Tringali M., Carlson J.K., Feldheim K.A. (2011). Genetic diversity despite population collapse in a critically endangered marine fish: the smalltooth sawfish (*Pristis pectinata*). *Journal of Heredity* **102**(6), 643-652.

Chauhan T., Rajiv K. (2010). Molecular markers and their applications in fisheries and aquaculture. *Advances in Bioscience and Biotechnology* **1**, 281-291.

Chow S., Okamoto H., Uozumi Y., Takeuchi Y., Takeyama H. (1997). Genetic stock structure of the swordfish (*Xiphias gladius*) inferred by PCR-RFLP analysis of the mitochondrial DNA control region. *Marine Biology* **127**, 359-367.

Clement M., Posada D., Crandall K.A. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* **9**, 1657-1659.

- Cordeiro-Estrela P., Baylac M., Denys C., Marino-Filho J. (2006). Interspecific patterns of skull variation between sympatric Brazilian vesper mice: geometric morphometrics assessment. *Journal of Mammalogy* **87**, 1270-1279.
- Cornuet J.M., Luikart G. (1996). Description and Power Analysis of Two Tests for Detecting Recent Population Bottleneck From Allele Frequency Data. *Genetics* **144**, 2001-2014.
- Costa C., Tibaldi E., Pasqualetto L., Loy A. (2006). Morphometric comparison of the cephalic region of cultured *Acipenser baerii* (Brandt, 1869), *Acipenser naccarii* (Bonaparte, 1836) and their hybrid*. *Journal of Applied Ichthyology* **22**, 8-14.
- Cvijanović G., Adnađević T., Lenhardt M., Marić S. (2015:1). New data on sterlet (*Acipenser ruthenus* L.) genetic diversity in the middle and lower Danube section, based on mitochondrial DNA analyses. *Genetika* **47**(3), 1051-1062.
- Cvijanović G., Kašpar V., Lenhardt M. (2015:2). Comparative shape analysis of wild and reared sterlet (*Acipenser ruthenus* L.). In: conference proceedings of 7th International Conference "Water & Fish", Faculty of Agriculture, Belgrade-Zemun, Serbia, Jun, 10-12. 2015.
- Cvijanović G., Adnađević T., Jarić I., Lenhardt M., Marić S. (2016). Genetic analysis of sterlet (*Acipenser ruthenus* L.) populations in the Middle and Lower Danube sections. *North-Western Journal of Zoology* (online first): art. 151403.
- Debus L. (1999). Meristic and morphological features of the Baltic sturgeon (*Acipenser sturio* L.). *Journal of Applied Ichthyology* **15**, 38-45.
- Deiner K., Garza J.C., Coey R., Girman D.J. (2007). Population structure and genetic diversity of trout (*Oncorhynchus mykiss*) above and below natural and man-made barriers in the Russian River, California. *Conservation Genetics* **8**, 437-454.
- de la Herrán R., Fontana F., Lanfredi M., Congiu L., Leis M., Rossi R., Rejón C.R., Rejón M.R., Garrido-Ramos M.A. (2001). Slow rates of evolution and sequence homogenization in an ancient satellite DNA family of sturgeons. *Molecular Biology and Evolution* **18**, 432-436.

Dillman C.B., Wood R.M., Kuhajda B.R., Ray J.M., Salnikov V.B., Mayden R.L. (2007). Molecular systematics of Scaphirhynchinae: an assessment of North American and Central Asian freshwater sturgeon species. *Journal of Applied Ichthyology* **23**, 290-296.

Djikanović V., Skorić S., Lenhardt M., Smederevac-Lalić M., Višnjić-Jeftić Ž., Spasić S., Mićković B. (2014). Review of sterlet (*Acipenser ruthenus* L. 1758) (Actinopterygii: Acipenseridae) feeding habitats in the River Danube, 1694-852 river km. *Journal of Natural History* **49**, 411-417.

Do C., Warples R.S., Peel D., Machbeth G.M., Tillett B.J., Ovenden J.R. (2014). NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. *Molecular Ecology Resources* **14**, 209-214.

Doukakis P., Birstein V.J., De Salle R. (2005). Intraspecific structure within three caviar-producing sturgeons (*Acipenser gueldenstaedtii*, *A. Stellatus*, and *Huso huso*) based on mitochondrial DNA analysis. *Journal of Applied Ichthyology* **21**, 457-460.

Drucker E.G., Lauder G.V. (2002). Wake dynamics and locomotor function in fishes: interpreting evolutionary patterns in pectoral fin design. *Integrative and Comparative Biology* **42**, 997-1008.

Dryden I.L., Mardia K.V. (1998). Statistical shape analysis. John Wiley and Sons, New York.

Dudgeon C.L., Blower D.C., Broderick D., Giles J.L., Holmes B.J., Kashiwagi T., Kruck N.C. Mogran J.A.T., Tillett B.J., Ovenden J.R. (2012). A review of the application of molecular genetics for fisheries management and conservation of sharks and rays. *Journal of fish biology* **80**, 1789-1843.

Earl D.A., vonHoldt B.M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetic Resources* **4**, 359-361.

Evanno G., Regnaut S. & Goudet J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**, 2611-2620.

Excoffier L., Lischer H.E.L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* **10**, 564-567.

Excoffier L., Estoup A., Cornuet J.M. (2005). Bayesian Analysis of an Admixture Model With Mutations and Arbitrarily Linked Markers. *Genetics* **169**, 1727-1738.

Fopp-Bayat D., Kuzniar P., Kolman R., Liszewski T., Kucinski M. (2015). Genetic analysis of six sterlet (*Acipenser ruthenus*) populations – recommendations for the plan of restitution in the Dniester River. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* **14**, 634-645.

Frankham R., Ballou J.D., Briscoe D.A. (2002). Introduction to Conservation Genetics. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 617 p.

Frankham R., Bradshaw C.J.A., Brook B.W. (2014). Genetic in conservation management: Revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability analyses. *Biological Conservation* **170**, 56-63.

Froese R., Pauly D. (Eds). (2013). FishBase. World Wide Web electronic publication. version 02/2013. [<http://www.fishbase.org>., – проверено 30. јануара 2016. године]

Fu Y.-X., Li W.H. (1993). Statistical test of neutrality of mutations. *Genetics* **123**, 597-601.

Garcia de Leaniz C., Fleming I.A., Einum S., Verspoor E., Jordan W.C., Consuegra S., Aubin-Horth N., Lajus D., Letcher B.H., Youngson A.F., Webb J.H., Vøllestad L.A., Villanueva B., Ferguson A., Quinn T.P. (2007). A critical review of adaptive genetic variation in Atlantic salmon: implications for conservation. *Biological Reviews* **82**, 173-211.

Garrido-Ramos M.A., Soriguer M.C., de la Herrán R., Jamilena M., Rejón C.R., Domezain A., Hernando J.A., Rejón M.R. (1997). Morphometric and genetic analysis as

proof of the existence of two sturgeon species in the Guadalquivir river. *Marine Biology* **129**, 33-39.

Garza J.C., Williamson E.G. (2001). Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology* **10**, 305-318.

Gerasimov Yu.V., Vasyura O.L. (2013). Growth and feeding of juvenile sterlet *Acipenser ruthenus* L. (Acipenseridae) in a pond after various durations of being preliminarily kept in tanks. *Inland Water Biology* **6**(3), 228-235.

Goudet J. (2002). FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). [<http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>. – проверено 30. января 2016. године]

Gould S.J. (1966). Allometry and size in ontogeny and phylogeny. *Biological Review* **41**, 587-640.

Guti G. (2006). Past and present status of sturgeon in Hungary. Proceedings 36th International Conference of IAD, 143-147. Austrian Committee Danube Research/IAD, Vienna.

Guti G., Gaebele T. (2009). Long-term changes of sterlet (*Acipenser ruthenus*) population in the Hungarian section of the Danube. *Opuscula Zoologica Budapest* **40**, 17-25.

Haanes H., Røed K.H., Perez-Espinosa S., Rosef O. (2011). Low genetic variation support bottlenecks in Scandinavian red deer. *European Journal of Wildlife Research* **57**, 1137-1150.

Harris L.N., Taylor E.B. (2010). Genetic population structure of broad whitefish, *Coregonus nasus*, from the Mackenzie River, Northwest Territories: implications for subsistence fishery management. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **67**, 905-918.

Heist E.J., Nicholson E.H., Sipiorski J.T., Keeney D.B. (2002). Microsatellite markers for the paddlefish (*Polyodon spathula*). *Conservation Genetics* **3**, 205-207.

Hensel K., Holčík J. (1997). Past and current status of sturgeons in the upper and middle Danube River. *Environmental Biology of Fishes* **48**, 185-200.

Holčík J., Klindová A., Masár J., Mészáros J. (2006). Sturgeons in the Slovakian rivers of the Danube River basin: an overview of their current status and proposal for their conservation and restoration. *Journal of Applied Ichthyology* **22**, 17-22.

Hubisz M.J., Falush D., Stephens M., Pritchard J.K. (2009). Inferring weak population structure with assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources* **9**, 1322-1332.

ICPDR (2015). International Commission for the Protection of the Danube River Database – TNMN. [<http://www.icpdr.org> – проверено 30. јануара 2016. године]

IUCN (2015). *The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015-4*. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources [www.iucnredlist.org – проверено 30. јануара 2016. године]

Ivanović A., Kalezić M. (2013). Evolucionarna morfologija: teorijske postavke i geometrijska morfometrija. *Biološki fakultet*, Beograd, 1-223.

Jager I.H. (2005). Genetic and demographic implications of aquaculture in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) conservation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* **62**, 1733-1745.

Janković D. (1958). Ekologija Dunavske kečige (*Acipenser ruthenus* L.). *Biološki Institut N.R. Srbije, Posebna izdanja*, knjiga 2, Beograd.

Janković D., Pujin V., Hegediš A., Maletin S., Krpo J., Lenhardt M., Kostić D., Anđelković D., Miljaković B. (1994). Community structure of the fish fauna in the Danube and its tributaries. p 137-148. In: Janković D.V., Jovičić M.Ž. (eds), *Danube in Yugoslavia – contamination, protection and exploitation*, Belgrade.

Јарић И. (2010). Хистопатолошке промене и акумулација тешких метала у популацијама кечиге (*Acipenser ruthenus* L.) у Дунаву. Докторска дисертација, Универзитет у Београду.

- Jarić I., Lenhardt M., Cvijanović G., Ebenhard T. (2009). *Acipenser sturio* and *Acipenser nudiventris* in the Danube – extant or extinct? *Journal of Applied Ichthyology* **25**, 137-141.
- Jarić I., Ebenhard T., Lenhardt M. (2010). Population viability analysis of the Danube sturgeon population in a Vortex simulation model. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **20**, 219-237.
- Jarić I., Višnjić-Jeftić Ž., Cvijanović G., Gačić Z., Jovanović Lj., Skorić S., Lenhardt M. (2011). Determination of different heavy metal and trace element accumulation in liver, gills, intestine and muscle of sterlet (*Acipenser ruthenus*) from the Danube River in Serbia by ICP-OES. *Microchemical Journal* **98**, 77-81.
- Jarne P., Lagoda P.J.L. (1996). Microsatellites, from molecular to populations and back. *TREE* **11**(10), 424-429.
- Jenneckens I., Meyer J.-N., Hörstgen-Schwark G., May B., Debus L., Wedekind H., Ludwig A. (2001). A fixed allele at microsatellite locus LS-39 exhibiting species-specificity for the black caviar producer *Acipenser stellatus*. *Journal of Applied Ichthyology* **17**, 39-42.
- Kahilainen K., Østbye K. (2006). Morphological differentiation and resource polymorphism in three sympatric whitefish *Coregonus lavaretus* (L.) forms in a subarctic lake. *Journal of Fish Biology* **68**, 63-79.
- Kawecki T.J., Ebert D. (2004). Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters* **7**, 1225-1241.
- Keenlyne K.D., Henry C.J., Tews A., Clancey P. (1994). Morphometric comparison of Upper Missouri River Sturgeons. *Transaction of the American Fisheries Society* **123**, 779-785.
- Kimura M. (1983). *The neutral theory of Molecular Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, Massachusetts.

King T.A., Lubinski B.A., Spidle A.P. (2001). Microsatellite DNA variation in the Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*) and cross-species amplification in the Acipenseridae. *Conservation Genetic* **2**, 103-119.

Klingenberg C.P. (1996). Multivariate allometry. Pp. 23-49 in: Marcus L.F., Corti M., Loy A., Naylor G.J.P., Slice D.E., eds, *Advances in Morphometrics*. New York: Plenum Press.

Klingenberg C.P. (2011). MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources* **11**, 353-357.

Klingenberg C.P. (2013). Visualizations in geometric morphometrics: how to read and how to make graphs showing shape changes. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy* **24**, 15-24.

Klingenberg C.P. (2016). Size, shape, and form: concepts of allometry in geometric morphometrics. *Development Genes and Evolution* (doi: 10.1007/s00427-016-0539-2.) у штампи.

Kolarević J. (2004). Populaciono-ekološka studija kečige (*Acipenser ruthenus* L.) u vodama Dunava na području Beograda. Magistarski rad, Univerzitet u Beogradu, Srbija.

Kottelat M., Freyhof J. (2007). Handbook of European freshwater fishes. Kottelat, Cornol, Switzerland and Freyhof, Berlin, Germany.

Krieger J., Hett A.K., Fuerst P.A., Artyukhin E., Ludwig A. (2008). The molecular phylogeny of the order Acipenseriformes revisited. *Journal of Applied Ichthyology* **24**, 36-45.

Kruglyak S., Durrett R.T., Schug M.D., Aquadro C.F. (1998). Equilibrium distribution of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 10774-10778.

Lakra W.S., Mohindra V., Lal K.K. (2007). Fish genetics and conservation research in India: status and perspective. *Fish Physiology and Biochemistry* **33**, 475-487.

Langella O. (1999). Populations 1.2.31. Logiciel de génétique des populations. Laboratoire Populations, génétique et evolution. CNRS UPR 9034, Gif-sur-Y vette. [<http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/>. – проверено 30. јануара 2016. године]

Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947-2948.

Lecis R., Ferrando A., Ruiz-Olmo J., Mañas S., Domingo/Roura X. (2008). Population genetic structure and distribution of introduced American mink (*Mustela vison*) in Spain, based on microsatellite variation. *Conservation Genetics* **9**, 1149-1161.

Lenhardt M., Cakic P., Kolarevic J., Gacic Z. (2003). Morphometric recognition of two morphs in sterlet (*Acipenser ruthenus* L.) population induced by different reproductive behaviour. Fish as models of behavior. The Fisheries Society of the British Isles. Annual International Symposium, University of East Anglia, Norwich, England, 30 June – 4 July 2003.

Lenhardt M., Cakic P., Kolarevic J., Mickovic B., Nikcevic M. (2004:1). Changes in sterlet (*Acipenser ruthenus* L.) catch and length frequency distribution in the Serbian part of the Danube River during the twentieth century. *Ecohydrology & Hydrobiology* **4**, 193-197.

Lenhardt M., Cakić P., Kolarević J., Gačić Z., Mićković B., Jarić I., Nikčević M. (2004:2). Length – weight relationship of sterlet (*Acipenser ruthenus* L.) juvenils in the Danube River. Proceedings, 35th International Conference of IAD, 553-536. Austrian Committee Danube Research/IAD, Vienna, Austria.

Ленхардт М., Хегедиш А., Јарић И. (2005). Акциони план управљања јесетарским врстама у риболовним водама Републике Србије. Институт за биолошка истраживања "Синиша Станковић". Урађено за потребе Министарства за науку и заштиту животне средине Републике Србије.

Lenhardt M., Jaric I., Kalauzi A., Cvijanovic G. (2006). Assessment of extinction risk and reasons for decline in sturgeons. *Biodiversity and Conservation* **15**, 1967-1976.

Lenhardt M., Gyore K., Smederevac-Lalić M., Hegediš A., Mićković B., Gačić Z., Jarić I., Cvijanović G., Višnjić-Jeftić Ž. (2008). Activity plan for the conservation of sterlet (*Acipenser ruthenus* L.) in Serbia and Hungary, XXXII Scientific Conference on Fisheries and Aquaculture. Proceedings of the International Workshop on Sturgeon Conservation and Breeding, Szarvas, Hungary, 15-116 May 2008, 49-50.

Lenhardt M., Jarić I., Cvijanović G., Kolarević J., Gačić Z., Smederevac-Lalić M., Višnjić-Jeftić Ž. (2012). Comparison of morphological characters between wild and cultured sterlet (*Acipenser ruthenus* L.). *Slovenian Veterinary Research* **49**, 177-184.

Librado P., Rozas J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**, 1451-1452.

Long Jr. J.H. (1995). Morphology, mechanics, and locomotion: the relation between the notochord and swimming motions in sturgeon. *Environmental Biology of Fishes* **44**, 199-211.

Lovetzky, A. (1834). Diagnosis piscium and genus *Acipenserinum pertinentium*, praeprimis eorum qui habitat in aquis Imperii Rossici. *Nouveaux mémoires de la Société imperial des naturalists de Moscou* **3**, 253-264.

Loy A., Bronzi P., Molteni S. (1999). Geometric morphometrics in the characterisation of the cranial growth pattern of Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii*. *Journal of Applied Ichthyology* **15**, 50-53.

Ludwig A. (2006). A sturgeon view on conservation genetics. *European Journal of Wildlife Research* **52**, 3-8.

Ludwig A., May B., Debus L., Jenneckens I. (2000). Heteroplasmy in the mtDNA Control Region of Sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*). *Genetics* **156**, 1933-1947.

Ludwig A., Belfiore N.M., Pitra C., Svirsky V., Jenneckens I. (2001). Genome duplication events and functional reduction of ploidy levels in sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*). *Genetics* **158**, 1203-1215.

- Ludwig A., Lippold S., Debus L., Reinartz R. (2009). First evidence of hybridization between endangered sterlets (*Acipenser ruthenus*) and exotic Siberian sturgeons (*Acipenser baerii*) in the Danube River. *Biological Invasions* **11**, 753-760.
- Mantel N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* **27**, 209-220.
- Marić S., Kalamujić B., Snoj A., Razpet A., Lukić-Bilela L., Pojskić N., Sušnik Bajec S. (2012). Genetic variation of European grayling (*Thymallus thymallus*) populations in the Western Balkans. *Hydrobiologia* **691**, 225-237.
- Marić S., Snoj A., Sekulić N., Krpo-Ćetković J., Šanda R., Jojić V. (2015). Genetic and morphological variability of the European mudminnow *Umbra krameri* (Teleostei, Umbridae) in Serbia and in Bosna and Herzegovina, a basis for future conservation activities. *Journal of Fish Biology* **86**, 1534-1548.
- May B., Krueger C.C., Kincaid H.L. (1997). Genetic variation at microsatellite loci in sturgeon: primer sequence homology in *Acipenser* and *Scaphirhynchus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **54**, 1542-1547.
- McDermid J.L., Wozney K.M., Kjartanson S.L., Wilson C.C. (2011). Quantifying historical, contemporary, and anthropogenic influences on the genetic structure and diversity of lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) populations in the northern Ontario. *Journal of Applied Ichthyology* **27**(2), 12-23.
- McEachem M.B., Van Vuren D.H., Floyd C.H., May B., Eadie J.M. (2011). Bottlenecks and rescue effects in a fluctuating population of golden-mantled ground squirrels (*Spermophilus lateralis*). *Conservation Genetics* **12**, 285-296.
- McQuown E.C., Sloss B.L., Sheehan R.J., Rodzen J., Tranah G.J., May B. (2000). Microsatellite analysis of genetic variation in the sturgeon: new primer sequences for *Scaphirhynchus* and *Acipenser*. *Transactions of the American Fisheries Society* **129**, 1380-1388.
- Miller M.P. (1997). *Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA)*, version 1.3. Northern Arizona University, Flagstaff, AZ.

- Moghim M., Javanmard A., Pourkazemi M., Tan S.G., Panandam J.M., Kor D., Laolei F. (2013). Application of microsatellite markers for genetic conservation and management of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*, Borodin, 1897) in the Caspian Sea. *Journal of Applied Ichthyology* **23**, 696-703.
- Murphy C.E., Hoover J.J., George S.G., Killgore K.J. (2007). Morphometric variation among river sturgeons (*Scaphirhynchus* spp.) of the Middle and Lower Mississippi River. *Journal of Applied Ichthyology* **23**, 313-323.
- Nei M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of National Academy of the United States of America* **70**, 3321-3323.
- Ognjanović D., Nikolić V., Simonović P. (2008). Morphometrics of two morphs of sterlet, *Acipenser ruthenus* L., in the middle course of the Danube River (Serbia). *Journal of Applied Ichthyology* **24**, 126-130.
- Pantić V. (1997). Biologija ćelije. Univerzitet u Beogradu, Beograd: 140-153.
- Peery M.Z., Kirby R., Reid B.N., Storeling R., Doucet-Beer E., Robinson S., Vasquez-Carrillo C., Pauli J.N., Palsbøll R.J. (2012). Reliability of genetic bottleneck tests for detecting recent population declines. *Molecular ecology* **21**, 3403-3418.
- Piry S., Luikart G., Cornuet J.-M. (1999). Computer note. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data. *The Journal of Heredity* **90**, 502-503.
- Poleksić V., Lenhardt M., Jarić I., Djordjević D., Gačić Z., Cvijanović G., Rašković B. (2010). Liver, gills and skin histopathology and heavy metal content of the Danube sterlet (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758). *Environmental Toxicology and Chemistry* **29**, 512-521.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 958-959.
- Qu Y., Duan M., Yan J., Feng G., Liu J., Zhang L., Zhuang P. (2013). Effects of lateral morphology on swimming performance in two sturgeon species. *Journal of Applied Ichthyology* **29**, 310-315.

Queller D.C., Strassmann J.E., Hughes C.R. (1993). Microsatellites and Kinship. *TREE* **8**(8), 285-288.

Reinartz R. (2002). *Sturgeons in the Danube River. Biology, Status, Conservation. Literature study*. International Association for Danube Research (IAD), Bezirk Oberpfalz, Landesfischereiverband Bayern, e.V.

Reinartz R., Lippold S., Lieckfeldt D., Ludwig A. (2011). Population genetic analyses of *Acipenser ruthenus* as a prerequisite for the conservation of the uppermost Danube population. *Journal of Applied Ichthyology* **27**, 477-483.

Reinartz R., Bloesch J., Sandu C., Suciú R., Lenhardt M., Guti G., Jahrl J. (2012). Sturgeon conservation in the Danube River Basin: How to implement the Sturgeon Action Plan 2005. Proceedings 39th IAD Conference Szentendre, Hungary, August 21-24, 2012.

PXM3 (2007). *I. Površinske vode*. Хидролошки годишњак 2007. Републички хидрометеоролшки завод Србије (PXM3), Београд.

PXM3 (2008). *I. Površinske vode*. Хидролошки годишњак 2008. Републички хидрометеоролшки завод Србије (PXM3), Београд.

Ristić M.Đ. (1971). Prilog objašnjenju postojanja kratkorilih i dugorilih kečiga (*Acipenser ruthenus* L. *Morpha kamensis et typica* Lovetzky 1834, *Berg* L.S. 1932-1934) kao posebnih formi u Dunavu, Savi i Tisi. *Ribarstvo Jugoslavije* **26**, 25-28.

Riva Rossi C.M., Pascuale M.A., Aedo Marchant E., Basso N., Ciancio J.E., Mezga B., Fernández D.A., Ernst-Elizalde B. (2012). The invasion of Patagonia by Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*): inferences from mitochondrial DNA patterns. *Genetica* **140**, 439-453.

Robles F., de la Herrán R., Ludwig A., Rejón C.R., Rejón M.R., Garrido-Ramos M.A. (2004). Evolution of ancient satellite DNAs in sturgeon genomes. *Gene* **338**, 133-142.

Rohlf F.J. (1990). Morphometrics. *Annual Reviews of Ecology and Systematics* **21**, 299-316.

- Rohlf F.J. (2010:1). TpsDig, ver 2.16. Ecology and Evolution, SUNY at Stone Brook. <http://life.bio.sunysb.edu/morph/> – проверено 30. јануара 2016. године
- Rohlf F.J. (2010:2). TpsRelw, ver 1.49. Ecology and Evolution, SUNY at Stony Brook. <http://life.bio.sunysb.edu/morph/> – проверено 30. јануара 2016. године
- Rohlf F.J., Slice D. (1990). Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Zoology* **39**, 40-59.
- Rohlf F.J., Marcus L.F. (1993). A revolution in morphometrics. *Tree* **8**(4), 129-132.
- Schrey A.W., Heist E.J. (2007). Stock structure of pallide sturgeon analyzed with microsatellite loci. *Journal of Applied Ichthyology* **23**, 297-303.
- Schwartz R.S., May B. (2008). Genetic Evaluation of Isolated Populations for Use in Reintroduction Reveals Significant Genetic Bottleneck in Potential Stocks of Sacramento Perch. *Transaction of the American Fishing Society* **137**, 1764-1777.
- Secor D.H., Arefjev V., Nikolaev A., Sharov A. (2000). Restoration of sturgeons: lessons from the Caspian Sea Sturgeon Ranching Programme. *Fish and Fisheries* **1**, 215-230.
- Sheets H.D. (2000). Integral Morphometrics Package (IMP). [<http://www2.canisius.edu/csheets/> – проверено 30. јануара 2016. године]
- Симоновић П. (2001). *Рубе Србије*. ННК Интернационал, Завод за заштиту природе Србије, Биолошки факултет Универзитета у Београду, Београд, Србија.
- Smederevac-Lalić M., Jarić I., Višnjić-Jeftić Ž., Skorić S., Cvijanović G., Gačić Z., Lenhardt M. (2011). Management approaches and aquaculture of sturgeons in the Lower Danube region countries. *Journal of Applied Ichthyology* **27**(3), 94-100.
- Smederevac-Lalić M., Pešić R., Cvejić S., Simonović P. (2012). Socio-economic features of commercial fishery in the bordering upper Danube River area of Serbia. *Environmental Monitoring and Assessment* **184**, 2633-2646.

- Sokolov L.I., Vasilev V.P. (1989). *Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758. In: Holcick (ed.) The Freshwater fish of Europe, Vol. I, Part. II: General introduction to fishes, Acipenseriformes., p: 227-263. Aula-Verlag.
- Song N., Nwafili S.A., Gao T.X. (2011). Genetic diversity and population structure of *Chrysichthys nigrodigitatus* from Niger Delta based on AFLP analysis. *Biochemical Systematics and Ecology* **39**, 320-327.
- StatSoft. Inc. (2007). STATISTICA (data analysis software system).version 8.0. www.statsoft.com.
- Strel'nikova A.P. (2012). Feeding of juvenile sterlet (*Acipenser ruthenus*, Acipenseridae) in the Danube River Midstream. *Journal of Ichthyology* **52**, 85-90.
- Swatdipong A., Primmer C.R., Vasemägi A. (2010). Historical and recent genetic bottleneck in European grayling, *Thymallus thymallus*. *Conservation Genetics* **11**, 279-292.
- Szczepkowska B., Kolman R., Szczepkowski M. (2011). Morphological characters of artificially induced hybrids of Siberian sturgeon, *Acipenser baerii baerii* Brandt, and green sturgeon, *Acipenser medirostris* Ayres. *Archives of Polish Fisheries* **19**, 77-85.
- Tajima F. (1989). The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics* **123**, 597-601.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetic Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**, 2725-2729.
- Taugbøl A., Junge C., Quinn T.P., Herland A., Vøllestad L.A. (2013). Genetic and morphometric divergence in threespine stickleback in the Chignik catchment, Alaska. *Ecology and Evolution* **4**(2), 144-156.
- Tsekov A., Ivanova P., Angelov M., Atanasova S., Bloesch J. (2008). Natural sturgeon hybrids along Bulgarian Black Sea coast and in Danube River. *Acta Zoologica Bulgarica* **60**, 311-316.

- Van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P. (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* **4**, 535-538.
- Valentin A.E., Penin X., Chanut J.-P., Power D., Sévigny J.-M. (2014). Combining microsatellites and geometric morphometrics for the study of redfish (*Sebastes* spp.) population structure in the Northwest Atlantic. *Fisheries Research* **154**, 102-119.
- Vassilev M. (2006). Lower Danube – the last refuge for surviving of sturgeon fishes in the Black Sea Region. In Hubert P. (ed.) *Water Observation and Information System for Decision Support*. Conference Proceedings, Balwois, Ohrid, Macedonia.
- Vassilev M., Pehlivanov L. (2003). Structural changes of sturgeon catches in the Bulgarian Danube section. *Acta Zoologica Bulgarica* **55**, 97-102.
- Ward D.R. (2006). The importance of identifying spatial population structure in restocking and stocking enhancement programmes. *Fisheries Research* **80**, 9-18.
- Warples R.S., Do C. (2008). LDNE: a programme for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Resources* **8**, 753-756.
- Waples R.S., Do C. (2010). Linkage disequilibrium estimates of contemporary Ne using highly variable genetic markers: a largely untapped resource for applied conservation and evolution. *Evolutionary Applications* **3**, 244-262.
- Wilga C.D., Lauder G.V. (1999). Locomotion in sturgeon: function of the pectoral fins. *The Journal of Experimental Biology* **202**, 2413-2432.
- Williamson-Natesan E.G. (2005). Comparison of methods for detecting bottleneck from microsatellite loci. *Conservation Genetics* **6**, 551-562.
- Williot P., Arlati G., Chebanov M., Gulyas T., Kasimov R., Kirchbaum F., Patriche N., Pavlovskaya L.P., Poliakova L., Pourkazemi M., Kim Y., Zhuang P., Zholdasova I.M. (2002). Status and management of Eurasian sturgeon: An overview. *International Review of Hydrobiology* **87**, 483-506.

Wolf D.E., Takebayashi N., Rieseberg L.H. (2001). Predicting the risk of extinction through hybridization. *Conservation Biology* **15**, 1039-1053.

Zelditch M.L., Swiderski D.L., Sheet H.D., Fink W.L. (2004). *Geometric morphometrics for biology: a primer*. Elsevier Academic Press: London, UK.

Zhdanova O.L., Pudovkin A.I. (2008). Nb_HetEx: a program to estimate the effective number of breeders. *Journal of Heredity* **6**, 694-695.

7. ПРИЛОЗИ

Прилог 1. Проток и температура воде на тачкама које су најближе местима узорковања, у периоду 2007 – 2009 година. Дате су средње вредности за месец, годину, као и најнижа и највиша измерена вредност.

	ПРОТОК (m ³ /s)			ТЕМПЕРАТУРА(°C)		
	НК	БП	ГР	НК	БП	ГР*
2007						
I	909	2050	4576	5.2	4.0	/
II	1560	2440	6226	5.6	4.0	/
III	1520	2970	7642	8.2	5.4	/
IV	655	2520	6860	13.6	11.7	/
V	644	2310	4760	19.0	17.3	/
VI	530	2370	4959	23.7	22.3	/
VII	389	2580	4159	23.3	25.9	/
VIII	282	1980	3657	23.8	26.4	/
IX	556	3810	4917	16.6	21.5	/
X	405	2400	4989	13.3	12.5	/
XI	743	2780	6718	7.3	6.3	/
XII	891	3200	8134	3.7	2.2	/
Годишње	757	2620	5626	13.6	13.3	/
Мин (год.)	193	1380	3420	1.4	0.0	/
Макс (год.)	1820	5530	8840	26.3	27.0	/
2008						
I	562	2280	5588	2.4	0.6	1.2
II	662	2250	5775	4.7	2.3	9.8
III	1470	2890	6429	6.8	4.9	9
IV	1530	3030	9348	10.4	10.2	11.3
V	1200	3160	8429	15.3	17.5	17
VI	694	3340	6662	18.8	22.9	22.7
VII	668	2990	5028	19.9	24.0	25.5

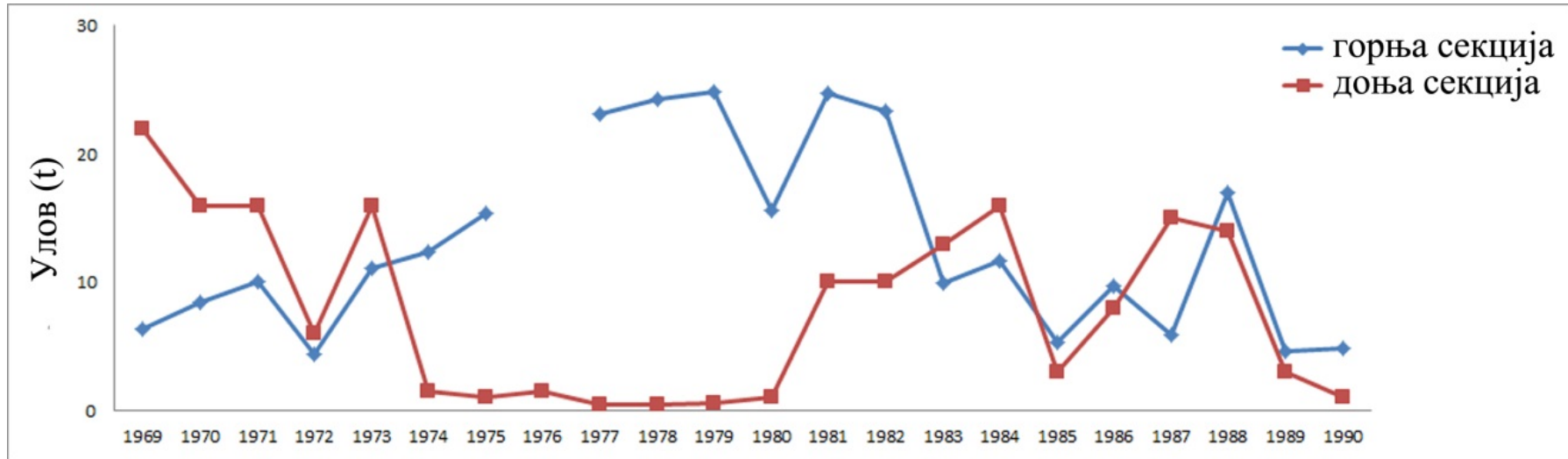
VIII	917	2940	5858	19.7	22.8	26
IX	330	1990	3965	16.5	19.7	22.9
X	449	1820	4011	12.5	14.1	15.8
XI	403	1870	3706	8.8	9.7	12.6
XII	1010	2300	6103	4.4	4.3	7.6
Годишње	825	2570	5909	11.7	12.7	15.1
Мин (год.)	265	1610	3430	0.4	0.0	0.5
Макс (год.)	2070	3940	10430	21.8	25.9	26.5
2009						
I	607	1830	5469	1.1	0.4	2.3
II	1010	2130	7719	2.6	1.6	6.3
III	1330	3620	9265	5.2	4.7	6.0
IV	1150	4710	10936	10.9	13.0	10.0
V	436	4010	7560	15.3	19.6	18.5
VI	527	3570	5914	17.1	21.5	22.3
VII	493	5530	8120	18.4	25.5	24.5
VIII	304	3200	5089	20.3	24.8	25.8
IX	221	2630	3929	17.7	22.1	22.8
X	399	2030	3629	12.7	14.7	16.4
XI	748	2260	5267	7.7	7.8	9.5
XII	563	2090	5152	4.5	4.8	9.3
Годишње	649	3130	6492	11.1	13.4	14.4
Мин (год.)	180	1590	3100	0.0	0.1	2
Макс (год.)	1740	6930	11850	21.3	26.9	26

*- температура на овом локалитету је мерана два или три пута месечно (пошто није аутоматизовано мерење), па су донекле непоуздани подаци. Сви остале вредности су бележене сваки дан.

Прилог 2. Пронос лебдећег наноса на тачкама које су најближе местима узорковања, за 2007. годину. Дате су средње вредности за месец, годину, као и најнижа и највиша измерена вредност.

	ПРОНОС ЛЕБДЕЋЕГ НАНОСА (kg/s)	
	НК	БП
I	70.4	14.8
II	170	18.2
III	163	29.2
IV	36.2	15.3
V	34.5	14.9
VI	25.5	16.1
VII	14.5	18.9
VIII	7.97	9.92
IX	29.6	65.1
X	16.4	13.9
XI	44.9	24.9
XII	64.7	33.7
Годишње	56.5	22.9
Мин (год.)	3.90	4.99
Макс (год.)	222	168

Прилог 3. Укупан годишњи улов кечиге: \diamond – горња секција (укључујући горњу секцију Дунава и доњу секцију Тисе у Србији) и \square – доња секција (укључујући доњу секцију Дунава у Србији – подручје око брана Ђердап 1 и 2) (извор: *Свијановић et al.*, 2016).



Биографија аутора

Горчин Д. Цвијановић рођен је 03.11.1978. године у Београду, где је завршио основно и средње образовање са одличним успехом. Школске 1997/98. године уписао је студије на смеру Екологија и заштита животне средине, Биолошког факултета Универзитета у Београду. Звање дипломирани биолог-екологије и заштите животне средине стекао је децембра 2002. године, одбраном дипломског рада под називом: "Дужинско-тежински односи код букве (*Boops boops* L.)".

Школске 2003/04 године је уписао последипломске (магистарске) студије на смеру Управљање животном средином у Центру за мултидисциплинарне студије Универзитета у Београду. Звање магистра наука стекао је децембра 2009. године, одбраном магистарске тезе под насловом: "Таксономске и еколошке карактеристике америчког патуљастог сома (*Ameiurus melas* Rafinesque, 1820) у сливу реке Тисе и могућност његове економске експлоатације".

Од 2002. до 2009. године радио је као истраживач приправник у Центру за мултидисциплинарне студије, Универзитета у Београду (касније Институту за мултидисциплинарна истраживања, Универзитета у Београду). У звање истраживач сарадник изабран је 2009. године. Горчин Цвијановић је током истраживачког рада учествовао у реализацији три национална пројекта Министарства за науку, технологију и развој Републике Србије (1354), односно Министарства за науку и заштиту животне средине Републике Србије (143045) и Министарства образовања, науке и технолошког развоја Републике Србије (173045). Такође, у периоду између 2004. и 2008. године био је учесник два међународна пројекта, финансирана од стране Владе Краљевине Норвешке, односно Европске агенције за реконструкцију. Од 2012. до 2016. године је учесник *NETLAKE* пројекта (*ECOST* 1201).

Током свог досадашњег истраживачког рада објавио је 23 научна рада у међународним и националним часописима.

Изјава о ауторству

Потписани: Горчин Д. Цвијановић

Изјављујем

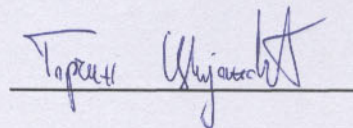
Да је докторска дисертација под насловом

Морфолошка и генетичка диференцијација кечиге (*Acipenser ruthenus* L.) у средњем и доњем току Дунава

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 22.04.2016. године


Горчин Цвијановић

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Горчин Д. Цвијановић

Наслов рада: Морфолошка и генетичка диференцијација кечиге (*Acipenser ruthenus L.*) у средњем и доњем току Дунава

Ментори: др Тања Аднађевић и др Саша Марић

Потписани: Горчин Цвијановић

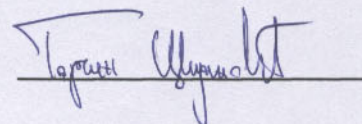
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао за објављивање на порталу Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су моје 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 Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 22.04.2016. године



Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку "Светозар Марковић" да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом: **Морфолошка и генетичка диференцијација кечиге (*Acipenser ruthenus* L.) у средњем и доњем току Дунава**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао сам у електронском формату за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (*Creative Commons*) за коју сам се одлучио.

1. Ауторство
2. Ауторство – некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молим да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 22.04.2016. године

