

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Sara Koska

Genska raznolikost i stupanj hibridizacije zelenih žaba roda  
*Pelophylax* Fitzinger, 1843 (Anura: Ranidae) s područja Crne Mlake

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju za molekularnu evoluciju i taksonomiju životinja Zoologijskog zavoda na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod vodstvom izv.prof.dr.sc. Damjana Franjevića i neposrednim vodstvom dr.sc. Mišela Jelića, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

## ZAHVALE

Zahvaljujem mentoru izv.prof.dr.sc. Damjanu Franjeviću na prilici za izradu diplomskog rada pod njegovim vodstvom te na vremenu i trudu koji je uložio.

Velika hvala dr.sc. Mišelu Jeliću na temeljitim objašnjenjima, strpljivosti, velikoj pomoći i prenesenom znanju.

Hvala kolegi Nikoli na pomoći u radu u laboratoriju.

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Genska raznolikost i stupanj hibridizacije zelenih žaba roda *Pelophylax*  
Fitzinger, 1843 (Anura: Ranidae) s područja Crne Mlake

Sara Koska

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Zelene žabe roda *Pelophylax* Fitzinger, 1843 jedna su od najistraživanijih životinjskih skupina zbog prirodne hibridizacije nekih vrsta unutar roda. Posljednjih godina razvijene su molekularno biološke metode koje su se pokazale uspješnima u determinaciji vrsta unutar ovog roda, budući da između njih postoji određena genska raznolikost. Velika genska raznolikost zelenih žaba Hrvatske rezultat je njezine geološke prošlosti. U ovom istraživanju korištenjem molekularnih biljega citokrom b i serum albumin intronske regije 1 na području Crne Mlake utvrđena je prisutnost već ranije otkrivenih vrsta *Pelophylax lessonae* i *Pelophylax ridibundus* te njihovog hibrida *Pelophylax* kl. *esculentus*. Osim njih, utvrđena je i prisutnost dosad neotkrivenih vrsta na području Crne Mlake *Pelophylax kurtmuelleri* i *Pelophylax shqipericus* te hibrida *P. kurtmuelleri* x *P. shqipericus*. Također, zabilježeni su i dosad u literaturi neopisani hibridi *P. shqipericus* x *P. ridibundus*, *P. ridibundus* x *P. kurtmuelleri* te *P. lessonae* x *P. kurtmuelleri*. „Čiste“ vrste su učestalije od hibrida, a frekvencija „čistih“ vrsta i hibrida je podjednaka i u proljeće i u jesen. Molekularno-filogenetičke metode pokazuju jasno odvajanje *P. ridibundus* i *P. kurtmuelleri*. Alohtone vrste zbog svog brzog širenja predstavljaju potencijalnu opasnost za native vrste te je potrebno provesti daljnja istraživanja za utvrđivanje stupnja hibridizacije.

Diplomski rad ima: 51 stranicu, 13 slika, 6 tablica, 71 literaturni navod, izvornik hrvatski

Rad je pohranjen u: Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: rod *Pelophylax*, citokrom b, serum albumin intronska regija 1, alohtone vrste, hibridi

Voditelj: dr.sc. Damjan Franjević, izv.prof.

Neposredni voditelj: dr.sc. Mišel Jelić

Ocjenitelji: dr.sc. Damjan Franjević, izv.prof.

dr.sc. Domagoj Đikić, izv.prof.

dr. sc. Sven D. Jelaska, izv. prof.

Rad je prihvaćen 3. studenog 2016.

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

Gene diversity and degree of hybridisation in water frogs of the genus  
*Pelophylax* Fitzinger, 1843 (Anura: Ranidae) from Crna Mlaka

Sara Koska

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb, Croatia

Water frogs of the genus *Pelophylax* Fitzinger, 1843 are one of the most studied animal groups because some of the species of this genus naturally hybridise. During last few years, methods in molecular biology have been developed that are successful in determination of the genus species, when there is some gene variability among them. Croatia is located on a large green frogs gene variability area, which is a result of its geological past. In this study, by using molecular markers cytochrome b and serum albumin intron region 1, the results have shown the presence of previously known species *Pelophylax lessonae* and *Pelophylax ridibundus* and their hybrid *Pelophylax* kl. *esculentus* from Crna Mlaka area. The results have also shown the presence of previously unknown species for that area *Pelophylax kurtmuelleri* and *Pelophylax shqipericus* and hybrid *P. kurtmuelleri* x *P. shqipericus*. Also, until now unknown hybrids *P. shqipericus* x *P. ridibundus*, *P. ridibundus* x *P. kurtmuelleri* and *P. lessonae* x *P. kurtmuelleri* have been recorded. „Pure“ species are numerous than hybrids, but they are equally frequent both in spring and autumn. Molecular-phylogenetic methods show clear separation of *P. ridibundus* and *P. kurtmuelleri*. Allochthonous species represent potential danger for native species because of their rapid spreading and it is important to carry out further studies for establishing the degree of hybridisation.

Graduation thesis contains: 51 pages, 13 figures, 6 tables, 71 references, original written in Croatian

Thesis is deposited in: Central biological library

Keywords: genus *Pelophylax*, cytochrome b, serum albumin intron region 1, allochthonous species, hybrids

Supervisor: Dr. Damjan Franjević, Assoc. Prof.

Assistant Supervisor: Dr. Mišel Jelić

Reviewers: Dr. Damjan Franjević, Assoc. Prof.

Dr. Domagoj Đikić, Assoc. Prof.

Dr. Sven D. Jelaska, Assoc. Prof.

Thesis accepted November 3rd 2016.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. HIBRIDIZACIJA .....	2
1.2. LITERATURNI PREGLED RODA <i>PELOPHYLAX</i> FITZINGER, 1843 .....	3
1.3. KOMPLEKS <i>PELOPHYLAX</i> KL. <i>ESCULENTUS</i> .....	5
1.4. MOLEKULARNA FILOGENETIKA .....	12
1.4.1. MITOHONDRIJSKA DNA KAO MOLEKULARNI BILJEG.....	22
1.4.2. SERUM ALBUMIN INTRONSKA REGIJA 1 KAO MOLEKULARNI BILJEG.....	23
2. CILJ RADA .....	24
3. MATERIJALI I METODE .....	25
4. REZULTATI.....	33
4.1. ANALIZA PCR PRODUKATA SERUM ALBUMIN INTRONSKE REGIJE 1 ...	33
4.2. ANALIZA NUKLEOTIDNIH SLJEDOVA CITOKROM B BILJEGA.....	36
5. RASPRAVA .....	40
6. ZAKLJUČCI.....	44
7. LITERATURA .....	45

## 1. UVOD

Zelene žabe roda *Pelophylax* Fitzinger, 1843, poznate i pod nazivom palearktičke vodene žabe (eng. *Palaeartic Water Frogs*), jedna su od najistraživanijih životinjskih skupina danas. Razlog tomu je što neke vrste unutar tog roda prirodno hibridiziraju zbog nedostatka reproduktivne barijere i malih morfoloških razlika. Time se otvaraju pitanja o determinaciji vrsta i njihovoj konzervaciji, budući da alohtone vrste mogu u kratkom vremenu „onečistiti“ gene autohtonih vrsta (Holsbeek i Jooris 2010). Posljednjih nekoliko godina razvijene su molekularno-biološke tehnike koje su se pokazale uspješnima u determinaciji vrsta unutar ovog roda, budući da između njih postoji određena genska raznolikost (Domeneghetti i sur. 2013).

Genska raznolikost istočno mediteranskih zelenih žaba (uključujući i Hrvatsku) je rezultat postepene genske divergencije zbog alopatrije koja je povezana s geodinamičkom evolucijom Mediterana u srednjem miocenu (prije otprilike 11 milijuna godina; Plötner i sur. 2010). U zapadnoj palearktičkoj regiji jedan od važnih glacijalnih refugija tijekom kvartara, uz Apeninski i Pirenejski poluotok, bio je i Balkanski poluotok (Canestrelli i Nascetti 2008), pa se stoga i na području Hrvatske očekuje velika raznolikost roda *Pelophylax* Fitzinger, 1843. Prema Holsbeek i Jooris (2010), u Hrvatskoj se nalaze čiste populacije *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) na jugu, miješane populacije *P. ridibundus* – *Pelophylax* kl. *esculentus* (Linnaeus, 1758) u središnjoj Hrvatskoj te miješane populacije *P. ridibundus* – *P. kl. esculentus* – *Pelophylax lessonae* (Camerano, 1882) u ostatku kopnene Hrvatske. Do sada su na području Crne Mlake upotrebom molekularno-filogenetičkih metoda determinirane vrste *P. lessonae* i *P. ridibundus* te hibrid *P. kl. esculentus* (Korlević 2012).

## 1.1. HIBRIDIZACIJA

Hibridizacija vrsta je, uz mutacije, rekombinacije i genski drift, mehanizam koji omogućuje gensku raznolikost te je ujedno i najrjeđi od tih mehanizama. Genska raznolikost dovodi do evolucije novih vrsta i njihovog prilagođavanja na nove okolišne uvjete. Prirodna hibridizacija može doprinijeti adaptivnoj radijaciji uvođenjem novih gena ili „miješanjem“ postojeće genske raznolikosti (Hoffmann i sur. 2015). Hibridi to postižu na nekoliko načina, koji se zasnivaju na zaobilazanju mejotskih poremećaja tijekom gametogeneze heterospecifičnih genoma. Načini na koji to postižu su klonalno razmnožavanje (koji uključuju partenogenetske, ginogenetske i hibridogenetske organizme; Dawley 1989) te proizvodnja diploidnih gameta koja dovodi do aloploidije, odnosno genom potomka se sastoji od bar tri haploidna seta kromosoma dviju ili više roditeljskih vrsta (Arnold 1997). Evolucija klonalnog genoma je ograničena, budući da su mutacije jedina sila koja u tom slučaju utječe na gensku raznolikost, te je dugovječnost klonova smanjena zbog nakupljanja štetnih mutacija. Interspecijska hibridizacija, zbog prethodno navedenih razloga, može dovesti do različitih genetskih poremećaja, koji uključuju smrt embrija, nizak fertilitet ili neplodnost, te gensku inkompatibilnost (Coyne i Orr 2004). Niska genska raznolikost kloniranog genoma se može nadoknaditi većom genskom raznolikošću drugog genoma koji se prenosi seksualno.

Interspecijska hibridizacija se može definirati obzirom na reproduktivne mogućnosti prve generacije hibrida. Jedna od mogućnosti je sterilnost hibrida, druga je isključivanje jednog parentalnog genoma tijekom gametogeneze pri čemu ne dolazi do rekombinacije i introgresije, a treća je normalna gametogeneza s rekombinacijom i introgresijom (Quilodrán i sur. 2014).



1.2. LITERATURNI PREGLED RODA *PELOPHYLAX* FITZINGER, 1843

Zelene žabe rasprostranjene su diljem Europe, na Bliskom Istoku, u Rusiji, jugoistočnoj Aziji te sjevernoj Africi (Amphibian Species of the World 2016). Dijele se na zapadnu i istočnu skupinu, a do njihovog razdvajanja je došlo prije otprilike 15 milijuna godina. Zapadna skupina je više istraživana, no unatoč tomu i dalje nisu u potpunosti razjašnjeni filogenetički odnosi unutar skupine (Lymberakis i sur. 2007). Prema NCBI (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, USA 2016), taksonomski rod *Pelophylax* Fitzinger, 1843 spada u:

- koljeno Chordata – svitkovci,
- potkoljeno Craniata – lubanjci,
  - Vertebrata,
  - Gnathostomata – čeljustousti,
  - Teleostomi,
  - Euteleostomi,
  - Sarcopterygii,
  - Dipnotetrapodomorpha,
  - Tetrapoda,
- razred Amphibia – vodozemci,
  - nadred Batrachia,
    - red Anura – bezrepci,
      - podred Neobatrachia,
        - nadporodica Ranoidea,
          - porodica Ranidae – prave žabe.

Prema Amphibian Species of the World (Frost 2016) i AmphibiaWeb (2016), rod *Pelophylax* obuhvaća 21 vrstu te tri klepton vrste – *Pelophylax bedrigae* (Camerano, 1882), *Pelophylax caralitanus* (Arikan, 1988), *Pelophylax cerigensis* (Beerli, Hotz, Tunner, Heppich i Uzzell, 1994), *Pelophylax chosenicus* (Okada, 1931), *Pelophylax cretensis* (Beerli, Hotz, Tunner, Heppich i Uzzell, 1994), *Pelophylax cypriensis* (Plötner, Baier, Akn, Mazepa, Schreiber, Beerli, Litvinchuk, Bilgin, Borkin, Uzzell, 2012), *Pelophylax demarchii* (Scortecci, 1929), *Pelophylax*

*epeiroticus* (Scheider, Sofianidou, Kyriakopoulou-Sklavounou, 1984), *Pelophylax* kl. *grafi* (Crochet, Dubois, Ohler i Tunner 1995), *P. kl. esculentus*, *Pelophylax fukiensis* (Pope, 1929), *Pelophylax* kl. *hispanicus* (Bonaparte, 1839), *Pelophylax hubeiensis* (Fei i Ye, 1982), *Pelophylax kurtmuelleri* (Gayda, 1940), *P. lessonae*, *Pelophylax nigromaculatus* (Hallowell, 1861), *Pelophylax perezii* (López-Seoane, 1885), *Pelophylax plancyi* (Lataste, 1880), *Pelophylax porosus* (Cope, 1868), *P. ridibundus*, *Pelophylax saharicus* (Boulenger, 1913), *Pelophylax shqipericus* (Hotz, Uzzell, Günther, Tunner i Heppich, 1987), *Pelophylax tenggerensis* (Zhao, Macey i Papenfuss, 1988) i *Pelophylax terentievi* (Mezhzherin, 1992). Zapadne palearktičke vodene žabe su prema Lymberakis i sur. (2007) upotrebom mitohondrijskih biljega razvrstane u tri glavne linije – *perezii* liniju (obuhvaća vrste *P. perezii* i *P. saharicus*), *lessonae* liniju (obuhvaća *P. lessonae*, *P. kl. esculentus*, *P. shqipericus* i *P. bergeri*) te balkansko-anatolsku ili *ridibundus/bedrigae* liniju (obuhvaća *P. cretensis*, *P. epeiroticus*, *P. ridibundus*, *P. bedrigae*, *P. cerigensis* i *P. kurtmuelleri*). Prema Plötner i sur. (2010), istočno mediteranske zelene žabe pokazuju veliku gensku raznolikost, unatoč njihovoj velikoj morfološkoj sličnosti. Isti autori ih razvrstavaju u nekoliko linija – *P. bedrigae*, *P. cretensis*, *P. epeiroticus*, *P. ridibundus*, šest anatolijskih linija (*P. cf. bedrigae*) te izoliranu liniju s Cipra.

### 1.3. KOMPLEKS *PELOPHYLAX* KL. *ESCULENTUS*

Gotovo sve *P. kl. esculentus* jedinke se razmnožavaju hibridogenetski, odnosno isključuju jedan od parentalnih genoma, ili *lessonae* (L) ili *ridibundus* (R), tijekom gametogeneze, a neisključeni genom prenose na gamete klonalno. Hibridi se zatim pare s jedinkom one vrste čiji je genom isključen tijekom gametogeneze. Genom koji dolazi od jedinke vrste s kojom se hibrid pari prolazi kroz normalnu gametogenezu koja uključuje mejozu. Budući da *P. kl. esculentus* jedinke sadrže i rekombinanti genom i klonirani genom, za njih se kaže da se razmnožavaju hemiklonalno. Dodatak „kl.“ između imena roda i vrsnog imena označava klepton te potječe od starogrčke riječi *kleptos* što znači ukrasti, a time se želi naznačiti kako hibridogenetske žabe „kradu“ kromosome od drugih vrsta (Dubois 2009).

U populacijama u kojima hibridi pripadaju istim hemiklonovima (nose i prenose isti klonalni genom), potomci iz međusobnog parenja hibrida ne preživljavaju zbog nakupljanja štetnih mutacija u njihovim genomima (Vorburger 2001). Diploidne hibridne jedinke zato reproduktivno ovise o roditeljskim vrstama i smatraju se seksualnim parazitima. Međutim, u populacijama gdje postoji više klonova s različitim mutacijama, njihovi potomci mogu preživjeti (Guex i sur. 2002).

Smatra se da su za isključivanje L genoma tijekom hibridogeneze zaslužni aleli na R genomu jer se u većini slučajeva R genom prenosi, a L isključuje. Nadalje, R genom je prisutan u svim hibridogenetskim tipovima, te se niti jedan eksperimentalni interspecijski hibrid u kojem nije prisutan R genom ne može razmnožavati hibridogenetski (Holsbeek i Jooris 2010). Eliminacija kromosoma se događa tijekom mitoze ili uključuje enzimatsku razgradnju tijekom interfaze. Nakon enzimatske razgradnje, kromatin se izbacuje iz jezgre u obliku tjelešaca sličnih jezgri i potom izlazi iz stanice (Ogielska 1994). Doležalková i sur. (2016) su nedavnim istraživanjem utvrdili da genomska eliminacija u *P. kl. esculentus* mužjaka nije uvijek ograničena na stadije punoglavaca ili juvenilnih žaba, budući da su oba parentalna genoma utvrđena u njihovim zametnim stanicama. Smatraju da homologni i nehomologni bivalenti L i R kromosoma dovode do nevijabilnih gameta ili da se faza eliminacije događa nakon prve mejotske diobe. Postoji i mogućnost da nema eliminacije genoma, već da se homologni L i R kromosomi razdvajaju u anafazi I, što rezultira haploidnim L i R spermijima.

*Pelophylax kl. esculentus*, i mužjaci i ženke, stvaraju uvijek gamete s genomom *P. ridibundus* s X kromosomom (Berger 1988). Zbog toga parenje ženke *P. lessonae* i mužjaka *P. kl.*

*esculentus* daje samo ženske potomke, dok parenjem mužjaka *P. lessonae* i ženke *P. kl. esculentus* nastaje jednak broj muških i ženskih potomaka.

Hibridogenetski sustav *P. kl. esculentus* se može podijeliti na tri glavne strategije razmnožavanja:

- *P. lessonae* – *P. kl. esculentus* (LE) sustav,
- *P. ridibundus* – *P. kl. esculentus* (RE) sustav,
- potpuno hibridne (E) populacije.

LE sustav (Slika 1) je najbolje proučeni sustav, a nastao je davnom hibridizacijom između *P. ridibundus* i *P. lessonae* te se javljaju i muški i ženski hibridi. U tom sustavu *P. kl. esculentus* sintopijski živi s *P. lessonae*. Tijekom gametogeneze u hibrida, prije mejoze, za vrijeme prolongirane faze proliferacije oogonija (Tunner i Heppich 1981), L genom se odbacuje tijekom sukcesivnih mitiotičkih dioba (Ogielska 1994), pa gamete sadrže samo R genom. R genom se potom replicira kako bi se omogućila normalna mejoza i kako bi krajnji rezultat bio haploidan broj nerekombiniranih kromosoma u gametama. Parenjem hibrida s *P. lessonae*, nastaju jedinke s nepromijenjenim R genomom koji se klonalno prenosi. Međusobnim parenjem *P. kl. esculentus* hibrida u 97% slučajeva nastaju RR punoglavci s poteškoćama u razvoju koji ugibaju prije spolne zrelosti (Graf i Polls Pelaz 1989). Ostalih 3% RR punoglavaca nastalih parenjem između hibrida preživljava i sve su ženke, budući da se primarna hibridizacija dogodila između veće ženke *P. ridibundus* i manjeg mužjaka *P. lessonae* (Berger 1970) pa je prvotni klonirani preneseni R genom nosio X kromosom. U tih 3% ženki moguća je rekombinacija tijekom mejoze koja može smanjiti količinu štetnih mutacija na R genomu. RR ženke se dalje pare s *P. kl. esculentus* ili *P. lessonae* mužjacima, budući da u LE sustavu nema RR mužjaka, te tako prenose nove mutacije na R genomu čime povećavaju fitness hibridogenetske populacije (Som i Reyer 2006).

*Pelophylax ridibundus* ima dva različita tipa mitohondrijske DNA (mtDNA) – jedan tip je specifičan za *P. ridibundus*, dok je drugi tip nalik na onu *P. lessonae*. *Pelophylax kl. esculentus* jedinke bi trebale imati *P. ridibundus* mitohondrijski genom budući da je prvotna hibridizacija bila s *P. ridibundus* ženkom i da se hibridni sustav održava kroz povratno križanje ženskih hibrida s mužjacima *P. lessonae*. Međutim, većina hibridnih jedinki LE sustava sadrži mtDNA *P. lessonae*. U tom sustavu, većina parenja se događa između *P. kl. esculentus* ženki i *P. lessonae* mužjaka, ali moguća je i obrnuta kombinacija. Parenje *P. lessonae* ženki s *P. kl. esculentus* mužjacima stvara *P. kl. esculentus* potomke s L mitohondrijskim genomom.

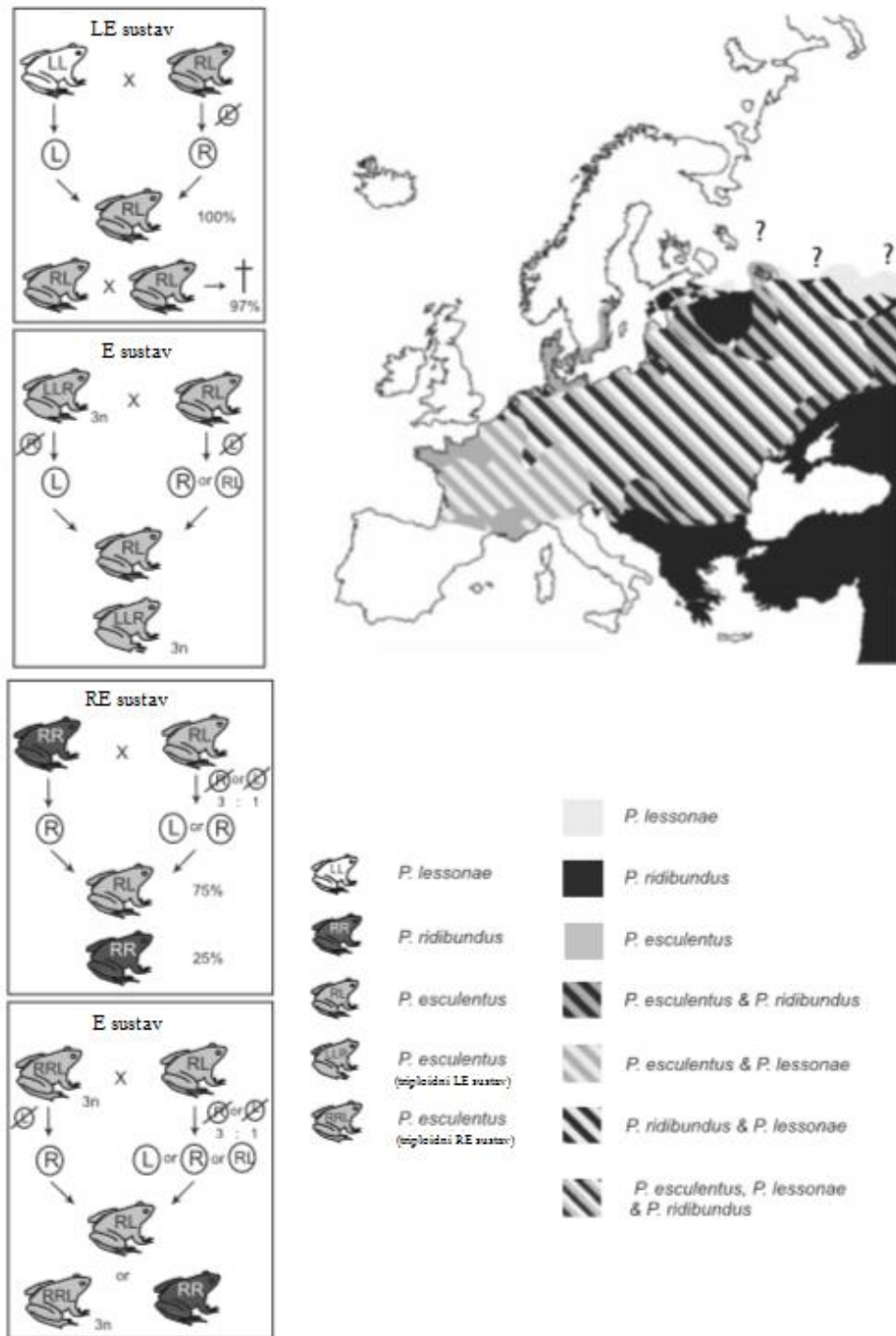
Introgresija *P. lessonae* mitohondrijskog genoma u *P. ridibundus* jedinke mogla se dogoditi na dva načina. Jedan od načina je da su parenjem između dva hibrida koji nose *P. lessonae* mitohondrijski genom nastale *P. ridibundus* jedinke. Drugi vjerojatniji način je nastanak *P. ridibundus* potomaka parenjem hibrida s *P. lessonae* mitohondrijskim genomom s *P. ridibundus* jedinkama (Spolsky i Uzzell 1984). Također, u introgresiji *P. lessonae* mitohondrijskog genoma u *P. ridibundus* jedinke važna su tri geografska raspona. Jedan obuhvaća simpatriju *P. ridibundus* i *P. lessonae*. To područje ujedno i definira moguće područje prvotne hibridizacije, a trenutno se proteže od sjeverne Ukrajine i zapadne Rusije do istočne Austrije i središnje Njemačke (Günther 1997). Drugo područje obuhvaća hibride s *P. ridibundus* genomima koji isključuju L genom i hemiklonalno se razmnožavaju. Obuhvaća središnju i većinu istočne Europe, osim područja od sjeverne Ukrajine do delte Dunava u istočnoj Rumunjskoj, gdje R genom ne inducira hemiklonalnu gametogenezu u hibridima s *P. lessonae* (Hotz i sur. 1985). Posljednji raspon obuhvaća područja u kojima omjer spolova u *P. kl. esculentus* ometa uobičajeno parenje između ženki *P. lessonae* i mužjaka *P. kl. esculentus*, što je potrebno za prijenos *P. lessonae* mtDNA u *P. kl. esculentus* te potom u *P. ridibundus*. Ta područja obuhvaćaju mnoge populacije panonskog bazena (uključujući i sjeveroistok Hrvatske; Berger i sur. 1998) te dio Rusije (Borkin i sur. 2006). Prema Plötner i sur. (2008), introgresija *P. lessonae* mitohondrijskog genoma u *P. ridibundus* je povezana s prisutnošću *P. kl. esculentus*. *Pelophylax ridibundus* jedinke s *P. lessonae* mitohondrijskim genomom su ograničene na područje središnje Europe sjevernije od 48° sjeverne geografske širine te između 8° i 22° istočne geografske dužine. U tom području hibridi žive sintopijski s roditeljskim vrstama u LE ili RE sustavima (Plötner 2005). Također, jedinke u središnjoj Europi su i diploidne i triploidne, dok su jedinke iz istočne Europe (posebice Rusije i Ukrajine) uglavnom diploidne (Borkin i sur. 2006) te se u njih ne javlja introgresija. Zbog uočenog geografskog uzorka introgresije te jednolične prisutnosti *P. lessonae* mitohondrijskog genoma u triploidnim jedinkama i njihove geografske rasprostranjenosti, Plötner i sur. (2008) smatraju da se prijenos događa putem LR ženki te triploidnih ženki. Prisutnost različitih *P. lessonae* specifičnih mitohondrijskih haplotipova u *P. ridibundus* jedinkama upućuje i na nekoliko neovisnih događaja prijenosa. Neki od prenesenih haplotipova su nađeni samo u *P. ridibundus*, što ukazuje na introgresiju prije holocena. Isti autori smatraju da bi jedinke s prenesenim *P. lessonae* mitohondrijskim genomom mogle imati adaptivnu prednost, budući da enzimi kodirani dijelom tog genoma utječu na metabolizam O<sub>2</sub> i CO<sub>2</sub>, a *P. lessonae* jedinke bolje podnose hipoksične uvjete. Iako je više od 90% mitohondrijskih proteina kodirano u jezgrinoj DNA, prijenos mitohondrijskog genoma ne utječe značajno na interakciju jezgrinog i

mitohondrijskog genoma, unatoč velikoj razlici u mitohondrijskom genomu između *P. lessonae* i *P. ridibundus*.

RE sustav (Slika 1) nije toliko čest te u njemu *P. kl. esculentus* jedinke žive s *P. ridibundus* jedinkama i odbacuju R genom u 2/3 slučajeva te time proizvode manje R gameta. U slučaju kad hibridi iz ovog sustava proizvedu R gamete i prenesu ih dalje, svi potomci su *P. ridibundus* ženke. Kad se dalje prenesu L gamete, nastanu *P. kl. esculentus* muški potomci. Taj fenomen je poznat kao hibridna amfispermija (Vinogradov i sur. 1991).

U potpuno hibridnim populacijama (Slika 1) nedostaju obje roditeljske vrste te su one učestale i u RE i u LE sustavima, međutim, bolje je proučen onaj koji se javlja u zapadnoj Europi, odnosno LE sustav. Osim diploidnih LR hibrida, koji su najčešće ženke, u ovim populacijama se nalaze i triploidne LLR jedinke koje su najčešće mužjaci i koje su preuzele ulogu *P. lessonae* jedinki – odbacuju R genom i opskrbljuju populaciju L gametama u kojima se odvija normalna segregacija. Poliploidija je rijedak, ali učinkovit način stvaranja novih fenotipova i genotipova koji se brzo prilagođavaju na nove okoliše i koloniziraju nova područja. Najčešći način triploidizacije u žaba je stvaranje nereduciranih jajašaca od strane diploidnih hibridnih ženki koja oplođuju haploidni spermiji (Christiansen 2009). Sam mehanizam stvaranja diploidnih jajašaca je nepoznat, ali je poznato da na njega utječu genetski i okolišni faktori. Hladna glacijalna i postglacijalna razdoblja su mogući poticatelj stvaranja nereduciranih gameta u interspecijskih hibrida, čime se izbjegavaju segregacijski problemi tijekom mejoze (Hoffmann i sur. 2015). LR jedinke nastaju spajanjem haploidnih gameta koje proizvode i diploidni i triploidni mužjaci i ženke, a LLR i LRR ovise o reproduktivnoj interakciji između diploidnih hibrida koji stvaraju diploidne gamete i triploidnih hibrida koji stvaraju haploidne gamete. Stvaranje nereduciranih diploidnih gameta se smatra prilagodbom na izbjegavanje izumiranja zbog nedostatka *P. lessonae* jedinki (Christiansen i sur. 2005). Diploidne gamete (LL spermiji) nastaju apomiksijom (Tunner i Heppich-Tunner 1992) ili automiksijom (LL i RR jajašca te RR spermiji; Christiansen 2009). Triploidi najčešće nastaju kad diploidna jajašca koja proizvode diploidne LR ženke oplode haploidni spermiji diploidnih (LR) ili triploidnih (LLR, LRR) mužjaka. Većina triploida prenosi genom koji je u njih prisutan u dvije kopije, odnosno LLR jedinke prenose L genom (ženke mogu stvarati i LL gamete), dok RRL jedinke prenose R genom. LR ženke prenose češće R genom od L genoma te stvaraju i diploidna LR jajašca, dok LR mužjaci stvaraju spermije ili s LR (u populacijama bogatim LRR jedinkama) ili s L genomom (Christiansen 2009). U nekim područjima moguće je da LLR mužjaci stvaraju diploidne LL spermije (Mikulíček i sur. 2015). Moguće je i spajanje diploidnih gameta kojim

nastaju tetraploidi (LLRR), ali to je rijetko (Christiansen 2009). Iako u ovim populacijama nema roditeljskih vrsta, mogu se naći *P. lessonae* i *P. ridibundus* punoglavci koji nikad ne dosegnu metamorfozu, a razlog još uvijek nije poznat (Berger 1988).



**Slika 1.** Prikaz LE, RE i E sustava *Pelophylax* kl. *esculentus* s različitim tipovima ploidezacije te njihova rasprostranjenost u Europi. Preuzeto i prilagođeno iz Holsbeek i Jooris 2010.

U zapadnoj Europi je došlo do antropogene introdukcije *P. ridibundus* iz središnje i južne Europe čime su nastali različiti tipovi njihovih potomaka. Parenjem unesenih jedinki *P. ridibundus* iz južne i nativnih *P. lessonae* iz zapadne Europe nastaju sterilni *P. kl. esculentus* hibridi, dok parenjem unesenih *P. ridibundus* iz centralne Europe s nativnim *P. lessonae* iz zapadne nastaju fertilni *P. kl. esculentus* (Holsbeek i Jooris 2010; Plötner i sur. 2010).

Prema Hoffmann i sur. (2015) postoje i populacije koje se sastoje od diploidnih i triploidnih hibrida te jednom ili obje roditeljske vrste, tako da jedinke iz te populacije mogu imati pet različitih genotipova – LL, LLR, LR, LRR i RR u različitim kombinacijama. Zbog svega toga hibridi imaju vrlo veliku ekološku plastičnost, pa se pojavljuju i u područjima u kojima nema roditeljskih vrsta i razmnožavaju se neovisno o njima. Budući da se populacije u kojima se nalaze samo hibridi nalaze u blizini populacija s LE, RE ili RLE jedinkama, pretpostavlja se da postoji protok gena između hibrida i roditeljskih vrsta (Plötner 2005). Obzirom na veliku genetičku i demografsku raznolikost populacija zelenih žaba, Hoffmann i sur. (2015) smatraju da bi se iz populacija miješane ploidijske mogle razviti „čiste“ triploidne populacije i tetraploidne populacije. Tetraploidi bi nastali spajanjem triploidnih i haploidnih gameta ili dviju diploidnih gameta, a oni bi dalje stvarali diploidne gamete uobičajenom kromosomskom segregacijom.

Prema Hotz i sur. (1985), mnoge južne populacije *P. ridibundus* (koje su zapravo *P. kurtmuelleri*) nisu u mogućnosti inducirati hibridogenezu u hibridima s *P. lessonae*, što ukazuje na geografsku varijabilnost mogućnosti *P. ridibundus* u eliminaciji genoma. Također, moguće je da je mogućnost isključivanja genoma nedavna prilagodba i javila se samo jednom, pa prema tome postoje dvije grupe *P. ridibundus* – ona koja ima mogućnost induciranja hibridogeneze i nehibridogenetska grupa (Guerrini i sur. 1997).

U prirodi brojnost *P. kl. esculentus* ovisi o veličini populacije *P. lessonae* i može iznositi 10 - 90% njezine brojnosti (Tietje i Reyer 2004). Te varijacije u brojnosti su vjerojatno uzrok karakteristika staništa. Sukladno tome, *P. lessonae* preferira manja jezera s obiljem submerzne vegetacije i srednjom količinom otopljenog kisika, *P. ridibundus* veća jezera s manje vegetacije i više otopljenog kisika te niskog saliniteta, a *P. kl. esculentus* intermedijerna staništa, iako je uspješna i u staništima koja pogoduju *P. lessonae* (Holenweg Peter i sur. 2002). U pravilu su *P. lessonae* i *P. kl. esculentus* simpatrijske, ali postoje i izolirane skandinavske *P. lessonae* populacije na baltičkoj obali središnje Švedske koje su glacijalni relikti (Nilsson 2013).

Hoffmann i sur. (2015) su utvrdili da različiti hibridi i roditeljski genotipovi nisu jednoliko raspoređeni diljem Europe, već da je njihova genska raznolikost strukturirana geografskom



širinom i dužinom i određena prisutnošću, odnosno nedostatkom roditeljskih vrsta, ali ne i triploida. Uočili su najveću gensku raznolikost u središnjoj i istočnoj Europi, a najmanju u sjeverozapadnoj, što su objasnili postglacijalnom ekspanzijom s jugoistočnih glacijalnih refugija. Upotrebom mikrosatelita zaključeno je da hibridi imaju višestruko porijeklo, odnosno imaju veliku raznolikost parentalnih genoma. Smatraju da se populacije bez roditeljskih vrsta i s različitom ploidiom mogu promatrati kao evolucijske jedinice koje su na putu hibridne specijacije.

Genska raznolikost je povezana i s rekombinacijskim potencijalom, pa su tako Arioli i sur. (2010) uočili najveću raznolikost u *P. lessonae* i *P. ridibundus* genomima u populacijama u kojima je moguća rekombinacija preko roditeljskih vrsta (LL, RR). Najmanja raznolikost je uočena u onim genomima koji se klonalno prenose preko diploidnih hibrida (LR), a srednja gdje se rekombinacija odvija putem triploidnih hibrida (LLR, LRR). Također, isti autori su uočili i da raznolikost L genoma ne ovisi o tome događa li se rekombinacija preko LL ili LLR jedinki, ali je raznolikost R genoma veća kad se događa preko parentalnih RR jedinki nego preko LRR hibrida. To je objašnjeno time što R spermiji daju samo kćeri jer se Y determinirajući faktor nalazi na L genomu hibrida, budući da je početna hibridizacija bila između *P. lessonae* mužjaka i *P. ridibundus* ženki. Time je omjer spolova u LLR izjednačen, dok u LRR gotovo nema mužjaka, pa se rekombinacija događa samo preko ženki (Christiansen i sur. 2005). Također, u potpuno hibridnim populacijama, L gamete proizvode samo LLR rekombinirajući genom, dok R gamete proizvode i rekombinirajući LRR genom i nerekombinirajući LR, zbog čega je prosječna rekombinacijska stopa R genoma niža od one u L genomu. Stoga u potpuno hibridnim populacijama rekombinacijska stopa u L genomu ne ovisi o proporciji rekombinirajućih (LLR) triploida, dok ona u R genomu ovisi o rekombinirajućim triploidima (LRR; Christiansen i Reyer 2009).

#### 1.4. MOLEKULARNA FILOGENETIKA

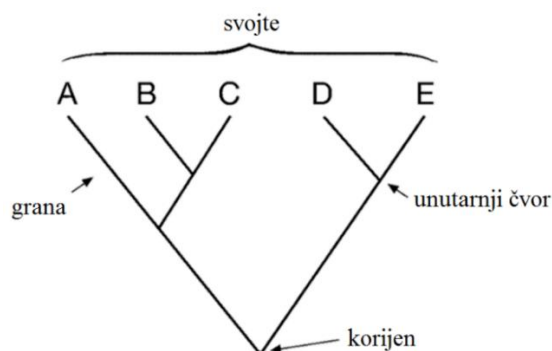
U svrhu istraživanja evolucije i veze između gena ili organizama koriste se različite metode. Prije razvoja molekularnih metoda u biologiji, morfologija je bila najčešći način tog istraživanja, a i danas se uvelike koristi. Međutim, ponekad, morfološke metode nisu uspješne ili dovoljne, a to je slučaj i sa zelenim žabama. Evolucijom organizama tijekom vremena, u njihovom genomu se nakupljaju mutacije koje uzrokuju fenotipske promjene. Zbog sve bržeg razvoja molekularnih metoda u biologiji i njihove sve veće dostupnosti, molekularni podaci u biologiji su vrlo vrijedan i gotovo neizostavan dio u današnjim biološkim istraživanjima.

Molekularna filogenetika je znanost o evolucijskoj vezi gena (ili drugih bioloških makromolekula) živih organizama koja analizira mutacije u nukleotidnim sljedovima i razvija hipoteze o njihovoj evolucijskoj povezanosti. Za predstavljanje srodnosti između tih organizama koristi se filogenetičkim stablima ili filogramima. Filogenijom se naziva uzorak grananja filogenetičkih stabala koji predstavlja evolucijsku divergenciju (Xiong 2006).

Postoji nekoliko pretpostavki za rekonstrukciju evolucijske prošlosti. Jedna od njih je homologija nukleotidnih sljedova, odnosno dijeljenje zajedničkog pretka te kasnije razdvajanje tijekom vremena. Za filogenetičku divergenciju se pretpostavlja da je bifurkatna, odnosno da se roditeljska grana razdvojila na dvije sestrinske grane. Druga pretpostavka je da je svaka pozicija u nukleotidnom slijedu evoluirala nezavisno pa je time raznolikost između njih dovoljno informativna za rekonstrukciju nedvosmislenog filogenetičkog stabla (Xiong 2006).

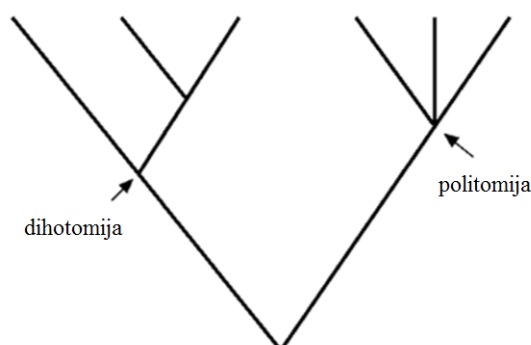
Linije na filogenetičkom stablu se nazivaju grane. U pojednostavljenom slučaju kada se analizira jedna jedinka po pojedinoj vrsti (filogenetička istraživanja), vršci grana na filogenetičkom stablu (eng. *terminal leafs*) smatraju se vanjskim čvorovima, svojstama ili operativnim taksonomskim jedinicama (eng. *operational taxonomic units*, OTUs; Xiong 2006). U slučaju kada se analizira veći broj jedinki koje pripadaju jednoj svojti (filogeografska istraživanja, populacijska istraživanja), blisko srodni haplotipovi čine jednu haplogrupu koja se može smatrati jednim OTU-om. Mjesto gdje se grane spajaju se naziva unutarnji čvor ili hipotetska taksonomska jedinica (eng. *hypothetical taxonomic unit*, HTUs), a predstavlja hipotetskog pretka operativnih taksonomskih jedinica. Na samom dnu filogenetičkog stabla nalazi se korijen, odnosno zajednički predak svih nukleotidnih sljedova u filogenetičkom stablu (Xiong 2006; Slika 2).

Skupina svojiti koje potječu od jednog zajedničkog pretka, odnosno pripadaju istoj grani, imaju monofiletsko porijeklo i nazivaju se kladij, klaster ili sestrinske grupe. Svojte koje dijele više od jednog najbližeg zajedničkog pretka nazivaju se parafiletskim, a kad postoji više od jednog najbližeg zajedničkog pretka skupine su polifiletske (Xiong 2006; Slika 2).



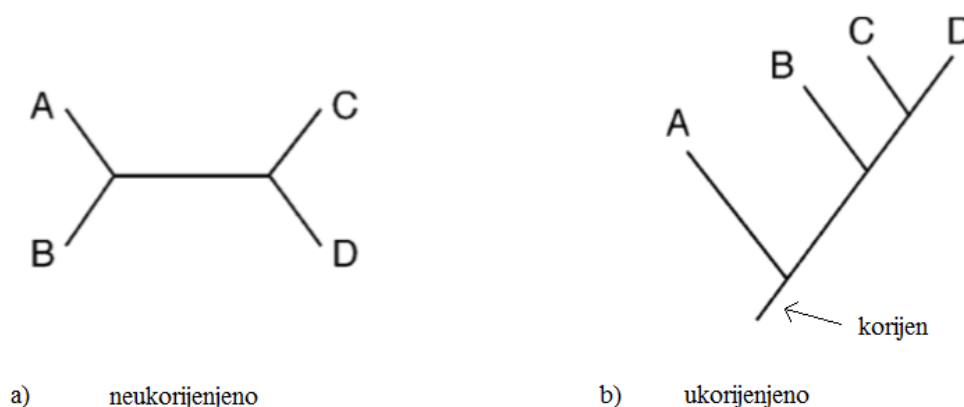
**Slika 2.** Prikaz filogenetičkog stabla s označenim svojitama, granama, korijenom i unutarnjim čvorovima. Stablo također prikazuje monofiliju (npr. svojite D i E), parafiliju (npr. svojite A, B i C) te polifiliju (npr. svojite C i D). Preuzeto i prilagođeno od Xiong 2006.

Topologija stabla je njegov uzorak grananja. Dihotomska stabla su ona u kojima su sve grane bifurkatne, odnosno ona u kojima svaki predak daje dva potomka. Politomija je slučaj kad u mjestu grananja postoje više od dva potomka čime nastaje multifurkatni čvor (Slika 3). Politomija može biti rezultat radijacije (predak daje više od dva potomka istovremeno) ili neriješene filogenije u kojoj se ne može odrediti točan redoslijed nastajanja potomaka (Xiong 2006).



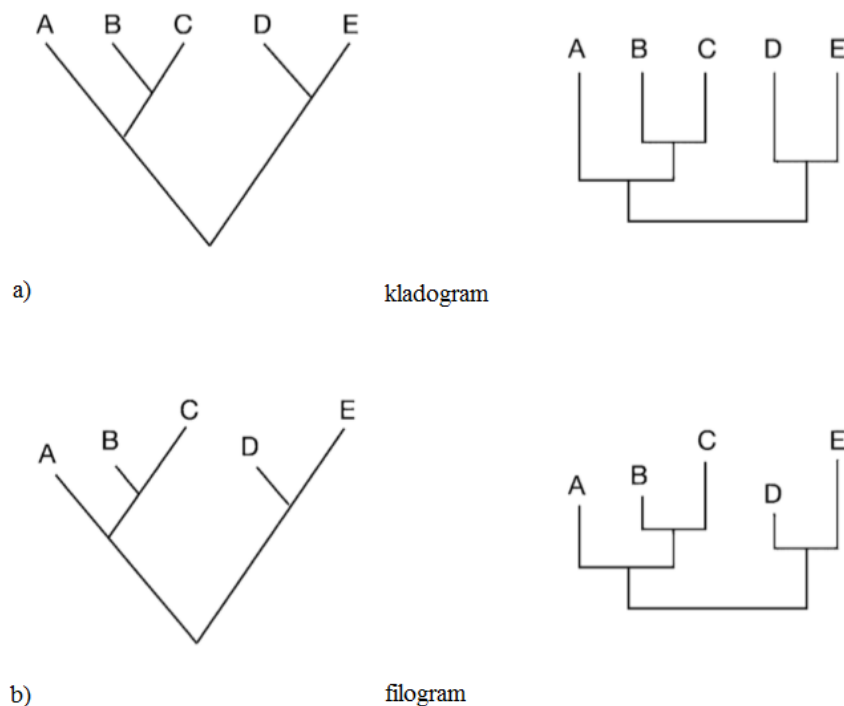
**Slika 3.** Prikaz filogenetičkog stabla s primjerom dihotomije (bifurkatnosti) i politomije (multifurkatnosti). Preuzeto i prilagođeno od Xiong 2006.

Filogenetičko stablo može biti ukorijenjeno ili neukorijenjeno. Neukorijenjeno stablo ne pretpostavlja tko je zajednički predak, već samo pokazuje odnose između svojti pa nema direktnog evolucijskog puta (Slika 4a). Ukorijenjeno stablo je informativnije budući da pokazuje smjer evolucijskog procesa, odnosno svi nukleotidni sljedovi imaju zajedničkog pretka (Slika 4b). Stablo se može ukorijeniti upotrebom vanjske grupe (eng. *outgroup*) koja je homologna s ostalim svojtima, ali i razdvojena od njih; ona je dalje povezana s njima. Drugi način ukorjenjivanja stabla je ukorjenjivanje središnjom točkom (eng. *midpoint rooting*), u kojem je korijen, prema duljinama svih grana u stablu, središnja točka dviju najodvojenijih svojti. Taj način ukorjenjivanja pretpostavlja hipotezu molekularnog sata, odnosno svi nukleotidni sljedovi evoluiraju konstantnom stopom pa je količina nakupljenih mutacija u njima proporcionalna evolucijskom vremenu (Xiong 2006). Prema tome, molekularnim satom se može odrediti vrijeme divergencije, odnosno koalescencije – trenutka kad je najraniji zajednički predak (eng. *most recent common ancestor*, MRCA) još uvijek postojao (Vandamme 2003).



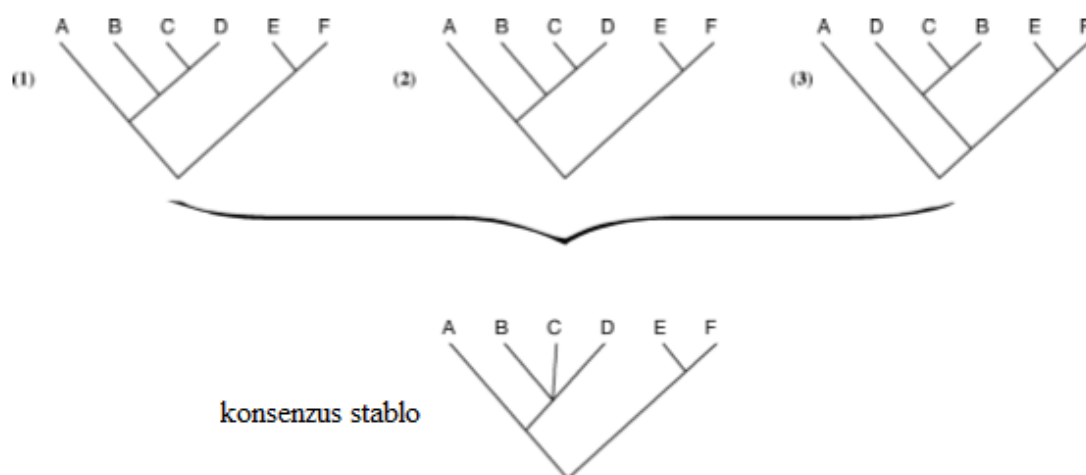
**Slika 4.** Prikaz neukorijenjenog (a) i ukorijenjenog (b) filogenetičkog stabla. Preuzeto i prilagođeno od Xiong 2006.

Kladogrami su tip filogenetičkih stabala u kojima duljina grana nije proporcionalna broju evolucijskih promjena, već je prikazan samo međusobni odnos svojti i nema filogenetičkog značenja (Slika 5a). Na filogramima duljina grana predstavlja količinu evolucijske divergencije pa one osim odnosa između svojti pokazuju i vremensku skalu (Slika 5b; Xiong 2006).



**Slika 5.** Prikaz filogenetičkog stabla kao kladograma (a) te kao filograma (b). Filogenetička stabla mogu biti prikazana i u obliku s kutevima između grana (lijevo) ili grane mogu biti povezane kvadratnim oblikom (desno). Preuzeto i prilagođeno od Xiong 2006.

Glavni cilj molekularne filogenetike je pravilna rekonstrukcija evolucijske prošlosti gena ili organizama, odnosno pronalazak točne topologije filogenetičkog stabla. To je vrlo teško i računalno zahtjevno jer broj mogućih filogenetičkih stabala eksponencijalno raste s brojem svojti koje su proučavane. Ponekad analiza može rezultirati i s nekoliko jednako optimalnih filogenetičkih stabala. U tom slučaju može se napraviti konsenzus stablo (Slika 6) prikazivanjem dobivenih bifurkatnih dijelova koji se ne slažu kao politomni čvor. Za to služe dvije metode. Jedna uključuje striktno konsenzus stablo u kojem se svi neslagajući čvorovi spajaju u jedan politomni čvor. Druga metoda se temelji na pravilu većine, odnosno oni neslagajući čvorovi koji se poklapaju u više od 50% slučajeva ostaju, dok se ostatak spaja u multifurkatni čvor (Xiong 2006).



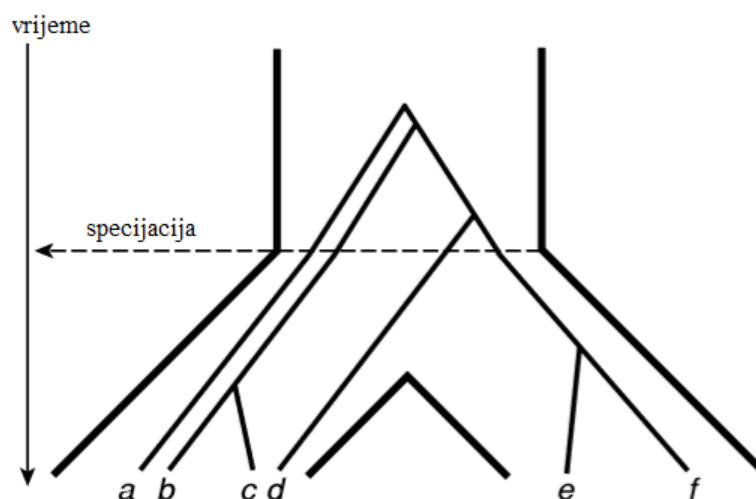
**Slika 6.** Prikaz konsenzus stabla dobivenog pravilom većine od tri individualna filogenetička stabla s neslagajućim čvorovima (B, C, D) prikazanim kao politomija. Preuzeto i prilagođeno od Xiong 2006.

Prema teoriji evolucije, svi organizmi su potekli od jednog zajedničkog pretka. Mutacije su najčešći izvor i mehanizam evolucije koji se koristi za otkrivanje veza između gena. Filogenetičke metode se baziraju na principu sličnosti između gena i pretpostavljaju da su homologni, odnosno da dijele zajedničkog pretka. Tijekom vremena se sličnost između gena mijenja zbog nakupljenih različitosti pa nukleotidni sljedovi ne pružaju dovoljno podataka za određivanje veza između gena. Zbog toga se termin homologije koristi kad je zajednički predak dovoljno blizak, a termin sličnosti za filogenetičke analize. Sličnost između nukleotidnih sljedova se može izračunati postotkom istih nukleotida u odnosu na cijelu duljinu nukleotidnog sljedova. Nukleotidni sljedovi s manje od 60% sličnosti neće dati filogenetička stabla velike točnosti. Geni blisko srodnih vrsta se razlikuju u samo malom broju točkastih mutacija, najčešće na trećoj kodonskoj poziciji otvorenih okvira čitanja (eng. *open reading frames*, ORFs), dok se geni udaljenijih vrsta razlikuju u velikom broju supstitucija. Neki geni su evolucijski očuvaniji od drugih, pogotovo oni koji kodiraju za proteine ili katalitička mjesta. Neki proteini udaljenijih vrsta ne moraju imati slične nukleotidne sljedove, ali imaju sličnu sekundarnu i tercijarnu strukturu (Vandamme 2009).

Dobivena filogenetička stabla mogu pružiti podatke o duplikacijskim ili specijacijskim događajima usporedbom određenih gena u filogenetičkim analizama. Paralogni geni su oni koji su nastali dovoljno recentnom duplikacijom koja se može odrediti na nivou nukleotidnih sljedova. Ortologni geni su homologni geni u različitim vrstama koji su u nekom trenu počeli neovisno evoluirati zbog specijacije. Također, iz filogenetičkih stabala može se zaključiti o

događajima paralelne ili konvergentne evolucije. Evolucija koja djeluje pod sličnim selekcijskim pritiskom dovodi do toga da različite sekvence imaju veću sličnost od očekivane te se to može zamijeniti za homologiju. Može se dogoditi i da nukleotidni sljedovi budu sličniji od onog što se očekuje iz njihove evolucijske prošlosti. Preokreti u nukleotidnim sljedovima se događaju kad se supstitucijom promijenjeni nukleotid vrati u originalni nukleotid. Moguće su i višestruke supstitucije na jednom nukleotidu, te paralelne supstitucije u različitim linijama (Vandamme 2009).

Filogenija gena opisuje evoluciju samo određenog gena koji može evoluirati sporije ili brže od ostatka genoma pa se ne može uvijek poistovjetiti s filogenijom vrste. U filogeniji gena unutarnji čvorovi predstavljaju događaj duplikacije gena, dok u filogeniji vrsta predstavljaju događaj specijacije. Filogenija vrsta uglavnom koristi više gena ili genskih porodica kako bi se dobila šira slika evolucije neke vrste (Xiong 2006). Budući da filogenetička stabla opisuju evolucijsku prošlost nukleotidnih sljedova, nazivaju se genska stabla, a ovisno o tome koriste li se u filogenetskoj analizi ortologni ili paralogni geni, mogu se nazivati i filogenetička stabla vrsta. Proučavanjem gena koji je polimorfan u obje vrste, čvorovi na filogenetičkom stablu će prikazivati odvajanje različitih alela, a ne specijaciju. Ako se proučavaju različiti geni i ako je postojala određena raznolikost u roditeljskoj vrsti, razdvajanje alela može i prethoditi i nastavljati se na specijaciju, što se naziva linijsko sortiranje (Slika 7; Vandamme 2009).



**Slika 7.** Prikaz linijskog sortiranja i specijacije. Neki se polimorfizmi (aleli b, c, e) razvijaju prije same specijacije, zbog čega se gensko stablo ne slaže sa stablom vrsta. Preuzeto i prilagođeno od Vandamme 2009.

Osnovni koraci u rekonstrukciji filogenetičkog stabla su odabir molekularnog biljega, višestruko sravnjivanje nukleotidnih sljedova, odabir evolucijskog modela, određivanje metode za izradu filogenetičkog stabla te procjena pouzdanosti filogenetičkog stabla (Xiong 2006).

Odabir molekularnog biljega ovisi o tome koja su njegova svojstva te što želimo proučiti. Za proučavanje blisko srodnih organizama bolje je koristiti nukleotidne sljedove koji brže evoluiraju od proteinskih. Među samim nukleotidnim sljedovima, nekodirajuće regije mitohondrijskog genoma se vrlo često koriste za proučavanje veza između jedinki u populaciji, dok se sporo evoluirajući nukleotidni sljedovi, poput ribosomske DNA, koriste za proučavanje veza između udaljenijih skupina organizama (Xiong 2006).

Višestruko sravnjivanje je najvažniji korak u filogenetičkoj analizi jer uspostavlja pozicijsku vezu u evoluciji te se za poravnate nukleotidne sljedove smatra da su genealoški povezani. Višestruke supstitucije i konvergencija na pojedinim pozicijama u nukleotidnom slijedu mogu dovesti do krive procjene evolucijske udaljenosti. Ta pojava je poznata kao homoplazija i rezultira netočnim filogenetičkim stablima (Xiong 2006). Za određivanje zajedničke prošlosti nukleotidnih sljedova, oni se moraju međusobno usporediti, odnosno mora im se odrediti pozicijska homologija poravnavanjem, budući da su dobro poravnati nukleotidni sljedovi ključni za dobro filogenetičko stablo. Poravnavanje se postiže algoritmima koji uglavnom prvo poravnaju dva najsljednija nukleotidna slijeda, pa potom progresivno dodaju ostale po redoslijedu sličnosti (Vandamme 2009). Postoji i lokalno sravnjivanje nukleotidnih sljedova, koje se najčešće izvodi heurističkom metodom BLAST (eng. *Best Local Alignment Search Tool*; Altschul i sur. 1990). BLAST se temelji na pronalasku kratkih segmenata identičnih ili gotovo identičnih slova u dva nukleotidna slijeda, koji se nazivaju riječi (eng. *words*). Osnovni princip je da dva povezana nukleotidna slijeda moraju imati barem jednu zajedničku riječ. Nakon pronalaska jedne riječi, dulji odsječci se koriste kako bi se pronašlo što više sličnih regija. Evolucijski modeli su statistički modeli koji služe za ispravljanje homoplazije. Postoji ih mnogo, a razlikuju se u tretiranju višestrukih supstitucija (Xiong 2006).

Nijedna metoda za rekonstrukciju filogenetičkih stabala nije najbolja te nijedna ne jamči da je dobiveno filogenetičko stablo točno. Metode se grupiraju obzirom na podatke koje koriste, pa tako postoje one bazirane na diskretnim stanjima karaktera te na matricama udaljenosti uparenih različitosti. U metodama baziranim na stanjima karaktera, pozicija bilo kojeg nukleotida u poravnatim nukleotidnim sljedovima predstavlja karakter, dok sami nukleotidi na toj poziciji predstavljaju stanje. Sve karakterne pozicije se analiziraju neovisno pa se za svaku kolonu u poravnatim nukleotidnim sljedovima pretpostavlja da je neovisan evolucijski proces



(Vandamme 2009). Te metode broje mutacijske događaje akumulirane na nukleotidnim sljedovima i time sprječavaju gubitak podataka, zbog čega su i računalno vrlo zahtjevne (Xiong 2006). Metode bazirane na matricama udaljenosti računaju mjere različitosti između parova svojti i na temelju tih mjera izvode filogenetičke veze između svojti. Uz to obično primjenjuju i evolucijske modele koji korigiraju višestruke mutacije na određenim pozicijama u slučaju prevelike razlike između nukleotidnih sljedova. Obzirom da odbacuju originalni karakter svojti, gube se podaci za rekonstrukciju karakternog stanja ancestralnog čvora. Međutim, ove metode su računalno puno manje zahtjevne, što je velika prednost u analiziranju velikog broja svojti (Vandamme 2009).

Metode se mogu podijeliti i obzirom na algoritme koje koriste u rekonstrukciji filogenetičkog stabla. Algoritam klasteriranja rezultira jednim filogenetičkim stablom, dok algoritam optimalnog kriterija procjenjuje različite topologije filogenetičkih stabala. Algoritmi koji koriste kriterije optimalnosti ispituju sve moguće topologije za pronalaženje filogenetičkog stabla koje zadovoljava matricu udaljenosti, zbog čega su računalno zahtjevne (Xiong 2006). Kod klasteriranja se koriste algoritmi s različitim metodama određivanja veza između svojti i računanja duljina grana i na temelju tog se postupno klasteriranjem svojti konstruira topologija stabla. Većina metoda baziranih na matrici udaljenosti koristi algoritme klasteriranja, dok metode bazirane na stanju karaktera koriste kriterij optimalnosti (Vandamme 2009).

Neke od najčešće korištenih metoda, koje su ujedno korištene i u ovom diplomskom radu, spadaju u metode bazirane na diskretnim stanjima karaktera te koriste algoritam optimalnosti.

Metoda najveće vjerojatnosti (eng. *maximum likelihood*, ML) uzima u obzir vjerojatnost kojom bi dobiveno filogenetičko stablo uistinu prezentiralo podatke (nukleotidne sljedove) pod određenim evolucijskim modelom. Izračunavanje vjerojatnosti uključuje sumiranje preko svih mogućih stanja nukleotida u ancestralnim čvorovima (Vandamme 2009). Upotrebom evolucijskih modela koji daju vjerojatnost pojave nekog nukleotida, računa se ukupna vjerojatnost da ancestralni nukleotidni sljedovi evoluiraju u unutarnje čvorove i dalje u vanjske čvorove. Zbog upotrebe statistike i svih nukleotida, metoda je računalno vrlo zahtjevna (Xiong 2006).

Bayesova metoda također primjenjuje princip vjerojatnosti, ali rezultira grupom različitih filogenetičkih stabala. Kod ove metode bitno je postaviti prethodnu distribuciju (na primjer duljinu grana), a zatim se na temelju podataka (nukleotidnih sljedova) procjenjuje kako bi se prijašnja distribucija trebala nadograditi. Posteriorne vjerojatnosti se procjenjuju tehnikom

uzorkovanja *Markov chain Monte Carlo* (MCMC) koja simulira nasumične parametre i predlaže njihovo novo stanje, odnosno novi set parametara, njihovom promjenom nasumičnim operatorima. Svakim korakom se za novo stanje računa omjer uvjetovane vjerojatnosti (frekvencija supstitucija) i prijašnje vjerojatnosti (vjerojatnost za sve moguće topologije prije analize). Ako je novo stanje bolje od prijašnjeg, parametri se prihvaćaju i nastavlja se na idući korak. Frekvencija kojom je određena topologija stabla uzorkovana je proporcionalna njegovoj posteriornoj vjerojatnosti. Moguće je od svih dobivenih filogenetičkih stabala napraviti jedno, konsenzus stablo ili *maximum a posteriori* stablo (Vandamme 2009). Budući da točno stablo nije poznato i da prijašnje metode proizvode samo jedno vjerojatno stablo, ova metoda proizvodnjom više vjerojatnih stabala ima veće šanse „pogoditi“ „pravo“ stablo. Uz to, računalno je manje zahtjevnja, brža i može se nositi s velikim skupom podataka (Xiong 2006).

Nakon konstrukcije filogenetičkog stabla, potrebno je statistički procijeniti njegovu vjerodostojnost te odrediti koliko je statistički bolje od nekog drugog filogenetičkog stabla. Jedna od metoda za procjenu vjerodostojnosti je *bootstrapping* koja testira greške uzorkovanja filogenetičkog stabla opetovanim uzorkovanjem promijenjenih podataka. Kako bi se odredila reproducibilnost dobivenog filogenetičkog stabla, konstruiraju se nova s promijenjenim poravnanjima i laganim varijacijama. Točnije filogenetičko stablo će imati dovoljno karaktera koji će ge podupirati, iako je u njemu došlo i do nekih perturbacija (Xiong 2006). Novi poravnati nukleotidni sljedovi se stvaraju iz nasumično odabranih kolona originalnih nukleotidnih sljedova. Svaka kolona može biti nasumično odabrana više puta, ali ne mora niti jednom. Računanjem proporcije svakog klada između *bootstrap* replikanata se dobiva statistička vjerodostojnost originalnog filogenetičkog stabla (Vandamme 2009). Perturbacije u originalnim podacima se mogu izvesti parametrijski i neparametrijski. Neparametrijskim se stvaraju novi poravnati nukleotidni sljedovi nasumičnom duplikacijom nekih mjesta u sekvenci, koji su iste duljine kao originalni i zamjenjuju neka druga mjesta u sekvenci. Zbog toga se neka mjesta pojavljuju više puta, a neka se ne pojavljuju niti jednom u novim poravnanjima. Sva ovom metodom novodobivena filogenetička stabla se sumiraju u jedno konsenzus stablo pravilom većine. Vrijednosti samoučitanja (eng. *bootstrap values*) su prikazane kod svakog čvora, a označavaju postotak pojavljivanja određenog klada. Parametrijske perturbacije koriste promijenjene skupove podataka s nasumičnim nukleotidnim sljedovima prema nekom supstitucijskom modelu. One mogu izbjeći problem prečestog odabiranja nekih mjesta. Vrijednosti samoučitanja iznad 70% otprilike odgovaraju intervalu pouzdanosti od 95% (Xiong 2006). Druga metoda za procjenu vjerodostojnosti filogenetičkog stabla je *jackknifing*. U toj

metodi je nasumično odabrana polovica mjesta u setu podataka izbrisana (zbog čega je manje računalno zahtjevna) te se iz tog novog seta podataka izrađuje filogenetičko stablo istom metodom kao i originalno. Isti postupak se ponavlja nekoliko puta. Ako se originalno filogenetičko stablo pojavljuje u svim rekonstruiranim stablima, *jackknifing* vrijednost je 100% i to je njegova najjača potvrda točnosti. I u ovom slučaju se grane s *jackknifing* vrijednosti manjom od 70% trebaju tumačiti s oprezom (Vandamme 2009).

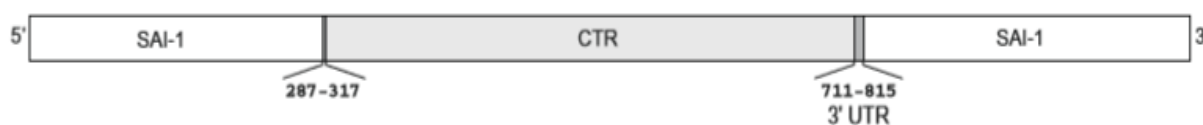
#### 1.4.1. MITOHONDRIJSKA DNA KAO MOLEKULARNI BILJEG

Mitohondrijska DNA je zadnjih nekoliko desetljeća jedan on najpopularnijih molekularnih biljega za zaključivanje o genskoj raznolikosti životinja, a postoji nekoliko razloga za to. Lako ju je amplificirati budući da se u stanicama nalazi u višestrukim kopijama. Njezini geni su visoko očuvani između različitih taksona, ali je vrlo promjenjiva zbog velike mutacijske stope, što pruža dobre podatke o populacijama kroz kratko vremensko razdoblje. Budući da su promjenjive regije omeđene očuvanim regijama, za njih je moguće napraviti početnice. Bitna značajka mtDNA je i njezino klonalno nasljeđivanje putem majke. Osim toga, za mtDNA se pretpostavlja da evoluirala gotovo neutralnom evolucijom. Njezini geni su uključeni u osnovne metaboličke uloge te se njezina evolucijska stopa uglavnom poklapa s vremenom divergencije zbog nedostatka pozitivne selekcije, odnosno zbog nakupljanja samo uglavnom neutralnih ili nekih štetnih mutacija (Galtier i sur. 2009).

Mitohondrijski genom većine višestaničnih organizama je kružna molekula veličine 14 – 17 kb te sadrži 36 ili 37 gena. Dva gena kodiraju za rRNA (16S rRNA i 12S rRNA), 22 za tRNA te 12 ili 13 za podjedinice multimernih proteina unutarnje mitohondrijske membrane, među koje spada i citokrom b (cytb). Uz kodirajuće regije, sadrži i one nekodirajuće varijabilne regije, kao što je kontrolna regija, koji reguliraju njenu replikaciju i transkripciju. Citokrom b je jedan od najboljih biljega za proučavanje veza između blisko srodnih organizama, odnosno na razinama porodica, rodova i vrsta (Hwang i Kim 1999).

## 1.4.2. SERUM ALBUMIN INTRONSKA REGIJA 1 KAO MOLEKULARNI BILJEG

U ovom diplomskom radu kao još jedan filogenetički biljeg korišten je jezgrin serum albumin gen, odnosno njegova intronska regija intron-1 (SAI-1; Slika 8). U tu intronsku regiju je ugrađeno i retrotranspozonsko kratko terminalno ponavljanje (eng. *non-long terminal repeat*, non-LTR) koje je klasificirano kao slično CR1 (eng. *chicken repeat 1*) i nazvano RanaCR1. RanaCR1 spada u duge raspršene jezgrine elemente (eng. *long interspersed nuclear elements*, LINE). Njegova prednost u korištenju u filogenetičkim studijama je visoka vjerojatnost da je dijeljenjem mobilnog elementa na istom lokusu između dva genoma on identičan po porijeklu. Za RanaCR1 se smatra da je nefunkcionalan element jer je na 5' kraju osakaćen te zbog delecija i stop kodona u okviru čitanja. Međutim, njezin 3' kraj je evoluirao različitim stopama unutar zelenih žaba. Zbog toga je moguće da ipak ima ulogu, a ona bi bila stabiliziranje strukture kromatina (Plötner i sur. 2009).



**Slika 8.** Prikaz serum albumin introna-1 zelenih žaba s umetnutim CR1 retrotranspozonom (sivo). CTR označava karboksi-terminalnu regiju. Brojke označavaju pozicije na kojima je umetnut motiv AATAT i predstavljaju mjesto duplikacije. 3'UTR (3' netranslatirana regija) predstavlja CA ponavljanja nakon stop kodona. Preuzeto iz Plötner 2009.

## 2. CILJ RADA

Cilj ovog diplomskog rada bio je na populaciji zelenih žaba roda *Pelophylax* Fitzinger, 1843 s lokacije Crna Mlaka analizom nukleotidnih sljedova mitohondrijskog gena i jezgrinog gena utvrditi:

- strukturu populacije, odnosno odrediti udio „čistih“ vrsta u odnosu na hibride,
- mijenja li se udio „čistih“ vrsta i hibrida obzirom na godišnje doba,
- molekularno-filogenetičke odnose između jedinki.

### 3. MATERIJALI I METODE

Šezdeset tri jedinke zelenih žaba prikupljene su na močvarnim lokacijama Crne Mlake u općini Jastrebarsko Zagrebačke županije u proljeće (29 jedinki) i jesen (34 jedinke) 2015. godine. Žabe nisu morfološki determinirane, osim pripadnosti rodu *Pelophylax* Fitzinger, 1834. Komadići nožnog prsta žaba bili su pohranjeni u 96%-tnom etanolu do izolacije DNA.

Ukupna stanična DNA izolirana je iz nožnog prsta žaba pomoću kompleta reagensa DNeasy® Blood & Tissue Kit proizvođača Qiagen prema njihovim uputama, čime je dobiveno 200 µL otopine s izoliranom DNA za svaku jedinku. Izolirana DNA (8 µL DNA s 2 µL boje u svaku jažicu) je potom stavljena na gel elektroforezu s 1%-tnim agaroznim gelom kako bi se provjerila njezina kakvoća.

Iz izolirane DNA izvedena je reakcija umnažanja fragmenata lančanom reakcijom polimerazom (eng. *polymerase chain reaction*, PCR) upotrebom kompleta reagensa HotStarTaq *Plus* Master Mix prema uputama proizvođača u reakcijskoj smjesi od 20 µL. HotStarTaq *Plus* Master Mix sadrži:

- 1 U HotStarTaq *Plus* DNA polimeraze,
- 1 x PCR pufer (1,5 mM MgCl<sub>2</sub>),
- 200 µM svakog dNTP.

Uz HotStarTaq *Plus* Master Mix u PCR je potrebno dodati i početnice, izoliranu DNA, boju koja će omogućiti vizualizaciju na gelu te vodu. Za umnažanje SAI-1 odsječaka korištene su početnice PEL-SA-F1 i PEL-SA-R2 (Hauswaldt i sur. 2012), a za umnažanje cytb odsječaka početnice cytb-L14850 i cytb-H15410 (Tanaka i sur. 1994). Svi sastojci te volumeni pojedinih sastojaka i ukupni volumen PCR-a za pojedini uzorak za cytb i SAI-1 su navedeni u Tablici 1. Detalji cijelog ciklusa umnažanja odsječaka PCR-om navedeni su u Tablici 2.

**Tablica 1.** Prikaz sastojaka PCR-a za cytb i SAI-1, volumeni pojedinog sastojka te ukupni volumen reakcijske smjese.

Sastojak	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix	10
Početnica „forward“	1
Početnica „reverse“	1
„RNase-Free“ voda	5
DNA	1
Boja	2
<b>Ukupno</b>	<b>20</b>

**Tablica 2.** Prikaz detalja pojedinog koraka PCR-a za cytb i SAI-1 s temperaturom i vremenom odvijana. U zagradi je navedena temperatura sljepljivanja početnica PCR-a s uzorcima koji nisu dobro umnoženi nakon prvotnog PCR-a.

PCR korak	Cytb	SAI-1
Preddenaturacija	95 °C 5 min	95 °C 5 min
Denaturacija	94 °C 30 s	94 °C 30 s
Sljepljivanje početnica	45 °C 30 s	59 °C (45 °C) 40 s
Sinteza novih DNA odsječaka	72 °C 60 s	72 °C 100 s
	35 ciklusa	35 ciklusa
Završna reakcija sinteze	72 °C 10 min	72 °C 10 min
Stajanje	4 °C $\infty$	4 °C $\infty$

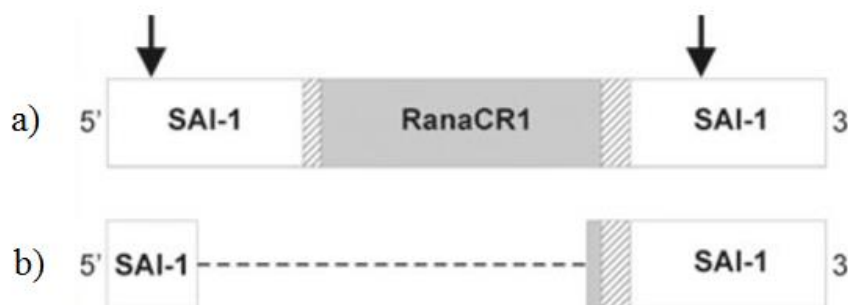
Provjera uspješnosti PCR-a napravljena je elektroforezom na 1,5%-tnom agaroznom gelu (5  $\mu\text{L}$  cytb, 15  $\mu\text{L}$  SAI-1), zajedno s GelPilot 100bp Plus ladder koji služi kao oznaka duljine umnoženih odsječaka. Nakon prvotne provjere uspješnosti umnažanja SAI-1 odsječaka, ponovno je napravljen PCR s uzorcima koji nisu bili vidljivi, ovoga puta s manjom



temperaturom sljepljivanja početnica. Vizualizacijom umnoženih SAI-1 odsječaka tako je ujedno i određena pripadnost vrsti ili hibridu. Pripadnost vrsti ili hibridu je moguće odrediti jer su SAI-1 regije različite duljine između različitih vrsta (Plötner i sur. 2009), a na temelju tog saznanja su Hauswaldt i sur. (2012) konstruirali početnice (Slika 10). Prema Hauswaldt i sur. (2012) te Vucić (2015), određena duljina SAI-1 odsječka je pripisana određenoj vrsti (Tablica 3).

**Tablica 3.** Prikaz očekivanih duljina PCR produkata u parovima baza (pb) različitih vrsta roda *Pelophylax* upotrebom početnica PEL-SA-F1 i PEL-SA-R2 (Hauswaldt i sur. 2012).

Vrsta	PCR produkt (pb)
<i>P. ridibundus</i>	893-843
<i>P. kurtmuelleri</i>	717
<i>P. bedriagae</i>	841
<i>P. cf. bedriagae</i>	839-840
<i>P. epeiroticus</i>	838
<i>P. cretensis</i>	847 / 828
<i>P. perezi</i>	853
<i>P. saharicus</i>	845-849
<i>P. nigromaculatus</i>	379
<i>P. lessonae</i>	306
<i>P. lessonae (P. bergeri)</i>	298
<i>P. shqipericus</i>	~1200



**Slika 9.** Prikaz serum albumin intron-1 regije a) *P. ridibundus* i b) *P. lessonae*. Kratice označavaju: SAI-1 = serum albumin intron-1, RanaCR1 = retrotranspozonsko kratko terminalno ponavljanje iz CR porodice. Iscrtana kutija na 5' kraju sadrži mjesto duplikacije i obrnuta ponavljanja, a na 3' kraju CA ponavljanja, obrnuta ponavljanja i mjesto duplikacije. Strelice označavaju mjesto vezanja početnica. Preuzeto i prilagođeno od Hauswaldt i sur. 2012.

Umnoženi cytb odsječci poslani su u europsku podružnicu tvrtke Macrogen u Nizozemskoj (Meibergdreef, Amsterdam) na određivanje nukleotidnih sljedova sekvenciranjem na ABI 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, SAD). Zajedno s umnoženim odsječcima poslano je i 10%-tno razrjeđenje cytb-L14850 početnice te im je određen nukleotidni slijed u jednom (eng. *forward*) smjeru. Rezultati određivanja nukleotidnog slijeda svakog uzorka očitani su iz kromatograma u .ab1 formatu.

Za molekularno-filogenetičke analize korišteni su sljedeći programi i programski paketi:

- Portable Sequencher 4.1.4 (Sequencher® version 5.4.5 sequence analysis software, Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI USA) – za sravnjenje i obradu nukleotidnih sljedova te pregledavanje kromatograma. Parametri su postavljeni tako da iz daljnje analize izbace nukleotidne sljedove koji se s ostalima ne poklapaju najmanje 20 baza i 85%;
- DNAsp 5.10.01 (Librado i Rozas 2009) – za pronalaženje identičnih nukleotidnih sljedova (haplotipova) nakon sravnjivanja koji su zatim korišteni za rekonstrukciju filogenetičkih stabala;
- BLAST (Altschul i sur. 1990) – za pronalaženje srodnih cytb nukleotidnih sljedova algoritmom blastn u NCBI GenBank bazi podataka;
- jModelTest 2.1.6 (Darriba i sur. 2012; Guindon i Gascuel 2003) – za pronalaženje najboljeg evolucijskog modela od njih 56 prema Bayesovom informacijskom kriteriju (eng. *Bayesian Information Criterion*, BIC). Kao model koji najbolje opisuje supstitucijske promjene odabran je Hasegawa-Kishino-Yano (HKY; Hasegawa i sur. 1985) koji dopušta različite stope transverzija i tranzicija, s gama distribucijom stope varijacije između nukleotidnih mjesta (+G) te značajnom proporcijom nevarijabilnih mjesta (+I);
- MEGA 6.06 (Tamura i sur. 2013) – za izradu filogenetičkog stabla ML metodom na temelju HKY+G+I modela. Korišten je po jedan nasumično odabran cytb nukleotidni slijed od svakog haplotipa dobivenog u ovom istraživanju te dodatni nukleotidni sljedovi vrsta roda *Pelophylax* dostupni na NCBI GenBank bazi podataka (Lymberakis i sur. 2007; Canestrelli i Nascetti G. 2008; Hofman i sur. 2012; Hofman i sur. 2014; Hofman i sur. 2015; Sumida i sur. 2001; Nie i sur. 2007). Time se konačni set podataka sastojao od 60 nukleotidnih sljedova dugih 620 pb (Tablica 4). Inicijalno filogenetičko stablo za heurističko pretraživanje je dobiveno automatski upotrebom algoritama susjednog sparivanja (eng. *Neighbour-Joining*, NJ) na matricu uparenih udaljenosti

procijenjene upotrebom pristupa složene najveće vjerojatnosti (eng. *Maximum Composite Likelihood*, MCL). U obzir su uzeta sva nukleotidna mjesta u nukleotidnim sljedovima. Stablo je ukorijenjeno vanjskim grupama. Statistička analiza vjerodostojnosti filogenetičkog stabla provedena je metodom samoučitanja u 1000 ponavljanja. Čvorovi na filogenetičkom stablu s vrijednostima samoučitanja većima od 70 su smatrani podržanima;

- MrBayes 3.2.6 (Huelsenbeck i Ronquist 2001; Ronquist i Huelsenbeck 2003; Altekar i sur. 2004) – za izradu filogenetičkog stabla Bayesovom metodom. Korišten je po jedan nasumično odabran cytb nukleotidni slijed od svakog haplotipa dobivenog u ovom istraživanju te dodatni nukleotidni sljedovi vrsta roda *Pelophylax* dostupni na NCBI GenBank bazi podataka (Lymberakis i sur. 2007; Canestrelli i Nascetti G. 2008; Hofman i sur. 2012; Hofman i sur. 2014; Hofman i sur. 2015; Sumida i sur. 2001; Nie i sur. 2007). Time se konačni set podataka sastojao od 60 nukleotidnih sljedova dugih 620 pb (Tablica 4). Stablo je izrađeno koristeći karakteristike univerzalnog koda i prema HKY+G+I (nst = 2) evolucijskom modelu. MCMC metoda je postavljena na 50 milijuna generacija s četiri simultana Monte Carlo lanaca. Konsenzus stablo je napravljeno iz grupe najboljih analiziranih stabala, izuzev prvih 12.5 milijuna generacija (*burnin* = 0.25). Čvorovi na filogenetičkom stablu s posteriornim vjerojatnostima većim od 0.90 su smatrani podržanima;
- FigTree 1.4.2 – za vizualizaciju i uređivanje dobivenih filogenetičkih stabala.

**Tablica 4.** Uzorci cytb iz ovog istraživanja i iz NCBI GenBank baze podataka korišteni za rekonstrukciju filogenetičkog stabla. Navedeni su i pristupni brojevi uzoraka, lokalitet na kojem su prikupljeni te imena autora koji su objavili nukleotidne sljedove.

Uzorak	Pristupni broj	Lokalitet	Referenca
<i>P. ridibundus</i> H1	/	Hrvatska – Crna Mlaka	iz ovog istraživanja
<i>P. kurtmuelleri</i> H2	/	Hrvatska – Crna Mlaka	iz ovog istraživanja
<i>P. ridibundus</i> H3	/	Hrvatska – Crna Mlaka	iz ovog istraživanja
<i>P. kurtmuelleri</i> H4	/	Hrvatska – Crna Mlaka	iz ovog istraživanja
<i>P. kurtmuelleri</i> H5	/	Hrvatska – Crna Mlaka	iz ovog istraživanja
<i>P. bedriagae</i>	DQ474131	Sirija – Krak des Chevaliers	Lymberakis i sur. (2007)
<i>P. bedriagae</i>	DQ474135	Grčka – Lezbos	Lymberakis i sur. (2007)
<i>P. bedriagae</i>	DQ474136	Cipar – izvor rijeke Cha	Lymberakis i sur. (2007)
<i>P. bedriagae</i>	DQ474139	Grčka – Makedonija (Dadia)	Lymberakis i sur. (2007)
<i>P. cerigensis</i>	DQ474142	Grčka – Karpatos	Lymberakis i sur. (2007)
<i>P. cerigensis</i>	DQ474144	Grčka – Karpatos	Lymberakis i sur. (2007)
<i>P. cretensis</i>	DQ474145	Grčka – Kreta	Lymberakis i sur. (2007)
<i>P. epeiroticus</i>	DQ474153	Grčka – Peloponez	Lymberakis i sur. (2007)
<i>P. epeiroticus</i>	DQ474155	Grčka – Peloponez	Lymberakis i sur. (2007)
<i>P. kurtmuelleri</i>	DQ474156	Grčka – Makedonija (Kerkini)	Lymberakis i sur. (2007)
<i>P. kurtmuelleri</i>	DQ474157	Grčka – Makedonija (Kerkini)	Lymberakis i sur. (2007)
<i>P. kurtmuelleri</i>	DQ474158	Grčka – Plastira	Lymberakis i sur. (2007)
<i>P. kurtmuelleri</i>	DQ474159	Grčka – Prespa	Lymberakis i sur. (2007)
<i>P. ridibundus</i>	DQ474160	Grčka – Trakija (Kotili)	Lymberakis i sur. (2007)
<i>P. ridibundus</i>	DQ474161	Grčka – Trakija (Nestos)	Lymberakis i sur. (2007)
<i>P. ridibundus</i>	DQ474162	Grčka – Trakija (Terma)	Lymberakis i sur. (2007)
<i>P. ridibundus</i>	DQ474163	Grčka – Trakija (Dadia)	Lymberakis i sur. (2007)

Tablica 4. Nastavak sa stranice 30.

Uzorak	Pristupni broj	Lokalitet	Referenca
<i>P. kurtmuelleri</i>	DQ474164	Grčka – Ewoia	Lymberakis i sur. (2007)
<i>P. kurtmuelleri</i>	DQ474165	Grčka – Plastira	Lymberakis i sur. (2007)
<i>P. kurtmuelleri</i>	DQ474166	Grčka – Zagori	Lymberakis i sur. (2007)
<i>P. kurtmuelleri</i>	DQ474167	Grčka – Ossa	Lymberakis i sur. (2007)
<i>P. kurtmuelleri</i>	DQ474168	Grčka – Ossa	Lymberakis i sur. (2007)
<i>P. kurtmuelleri</i>	DQ474169	Grčka – Kythira	Lymberakis i sur. (2007)
<i>P. kurtmuelleri</i>	DQ474170	Grčka – Pamisos	Lymberakis i sur. (2007)
<i>P. kurtmuelleri</i>	DQ474171	Grčka – Messologi	Lymberakis i sur. (2007)
<i>P. kurtmuelleri</i>	DQ474172	Grčka – Nestani	Lymberakis i sur. (2007)
<i>P. kurtmuelleri</i>	DQ474173	Grčka – Platykampos	Lymberakis i sur. (2007)
<i>P. kurtmuelleri</i>	DQ474174	Grčka – Skyros	Lymberakis i sur. (2007)
<i>P. kurtmuelleri</i>	DQ474175	Grčka – Sarantaporos	Lymberakis i sur. (2007)
<i>P. kurtmuelleri</i>	DQ474176	Grčka – Arta	Lymberakis i sur. (2007)
<i>P. lessonae</i>	EU047772	Italija – Sicilija	Canestrelli i Nascetti (2008)
<i>P. lessonae</i>	EU047773	Italija – Sicilija	Canestrelli i Nascetti (2008)
<i>P. lessonae</i>	EU047774	Italija – Sicilija	Canestrelli i Nascetti (2008)
<i>P. lessonae</i>	EU047775	središnja Italija	Canestrelli i Nascetti (2008)
<i>P. lessonae</i>	EU047776	središnja Italija	Canestrelli i Nascetti (2008)
<i>P. lessonae</i>	EU047781	središnja Italija	Canestrelli i Nascetti (2008)
<i>P. lessonae</i>	EU047784	središnja Italija	Canestrelli i Nascetti (2008)
<i>P. lessonae</i>	EU047785	središnja Italija	Canestrelli i Nascetti (2008)
<i>P. lessonae</i>	EU047789	sjeverna Italija	Canestrelli i Nascetti (2008)
<i>P. lessonae</i>	EU047790	sjeverna Italija	Canestrelli i Nascetti (2008)
<i>P. lessonae</i>	EU047793	sjeverna Italija	Canestrelli i Nascetti (2008)

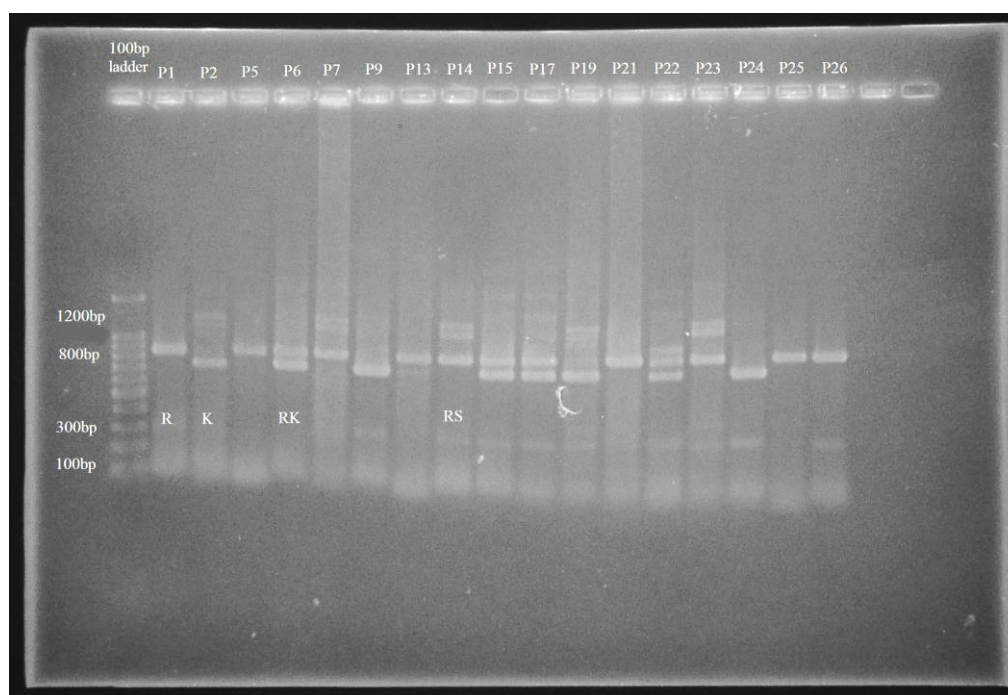
Tablica 4. Nastavak sa stranice 31.

Uzorak	Pristupni broj	Lokalitet	Referenca
<i>P. lessonae</i>	EU047794	sjeverna Italija	Canestrelli i Nascetti (2008)
<i>P. ridibundus</i>	JN627421	Poljska – Popowo, Goplo	Hofman i sur. (2012)
<i>P. lessonae</i>	JN627422	Poljska – Lesny Zakatek	Hofman i sur. (2012)
<i>P. ridibundus</i>	JN627423	Poljska – Rafa	Hofman i sur. (2012)
<i>P. kl. esculentus</i>	JN627424	Poljska – Spytkowice	Hofman i sur. (2012)
<i>P. ridibundus</i>	JN627425	Poljska – Spytkowice	Hofman i sur. (2012)
<i>P. lessonae</i>	JN627426	Poljska – Zurawiec	Hofman i sur. (2012)
<i>P. cretensis</i>	NC_025575	Grčka	Hofman i sur. (2014)
<i>P. cypriensis</i>	NC_026893	Grčka	Hofman i sur. (2015)
<i>P. epeiroticus</i>	NC_026894	Albanija	Hofman i sur. (2015)
<i>P. kurtmuelleri</i>	NC_026895	Grčka	Hofman i sur. (2015)
<i>P. shqipericus</i>	NC_026896	Grčka	Hofman i sur. (2015)
<i>P. nigromaculatus</i>	NC_002805	Japan – Hirošima	Sumida i sur. (2001)
<i>P. plancyi</i>	NC_009264	Kina – Peking	Nie i sur. (2007)

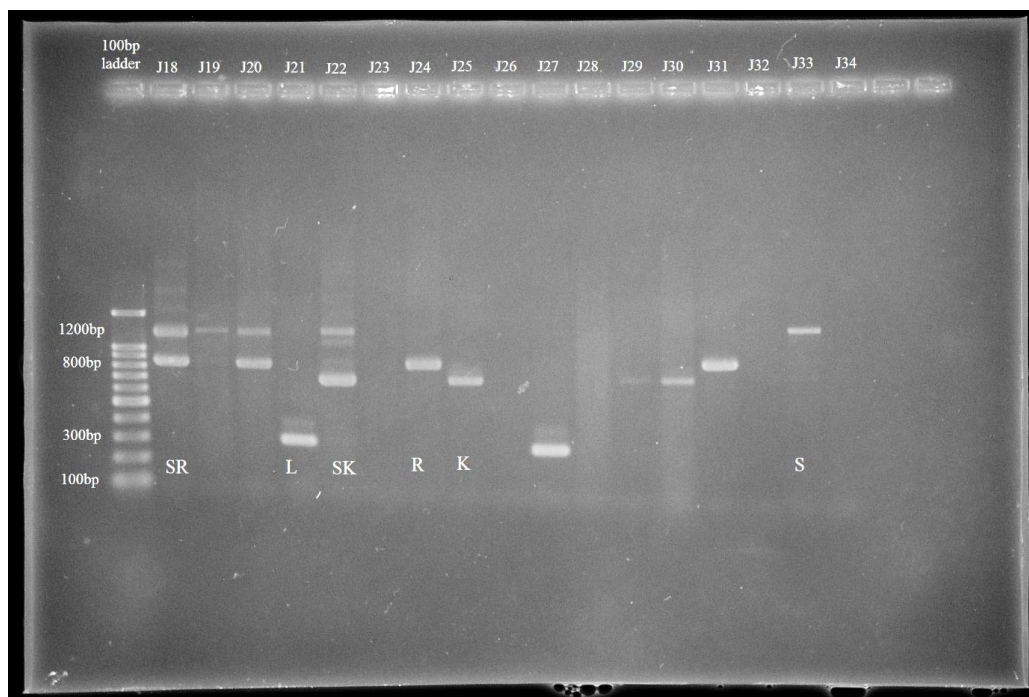
## 4. REZULTATI

## 4.1. ANALIZA PCR PRODUKATA SERUM ALBUMIN INTRONSKE REGIJE 1

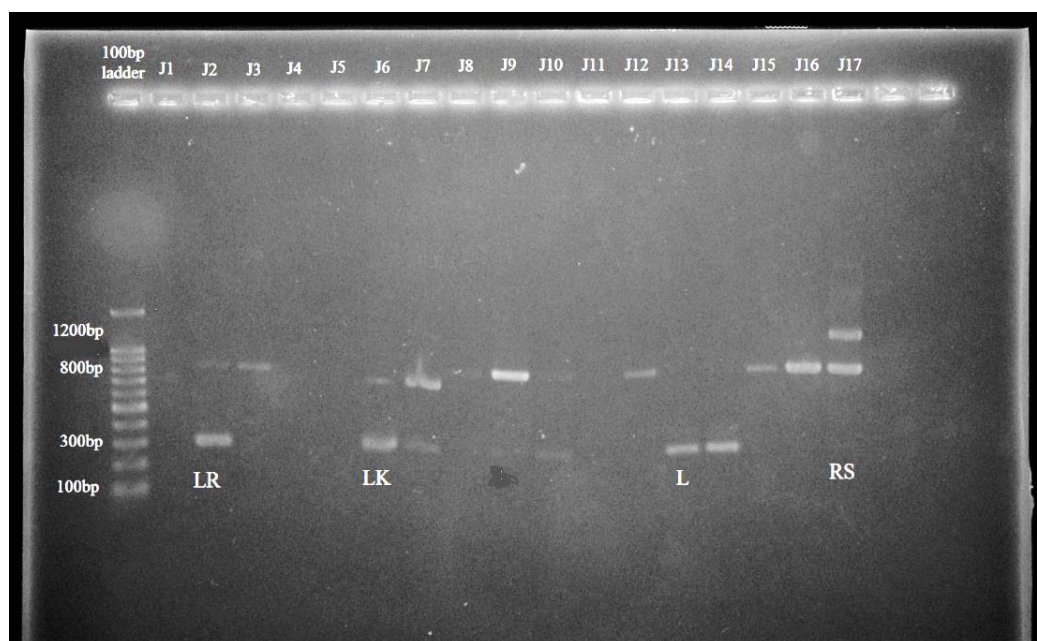
Prema rezultatima analize SAI-1 biljega, u analiziranoj populaciji je više „čistih“ jedinki, njih 45 (71,4%), dok je hibridnih jedinki 18 (28,6%; Tablica 5). Najviše jedinki spada u *P. ridibundus* vrstu, njih 26 od 63, odnosno 41,3% od ukupne populacije. Najmanji broj „čistih“ jedinki su pripadnici vrste *P. lessonae* i *P. shqipericus* (svaka vrsta po 8,9% „čiste“ populacije), dok su najmanji broj jedinki u cijeloj populaciji hibridi *P. kurtmuelleri* x *P. shqipericus* (1,6% ukupne populacije). Najčešći hibrid je *P. ridibundus* x *P. kurtmuelleri* (38,9% svih hibrida). Duljine PCR produkata za pojedinu vrstu i hibride prikazane su na Slikama 10 – 12.



**Slika 10.** Prikaz PCR produkata na agaroznom gelu nakon elektroforeze dobivenih upotrebom početnica PEL-SA-F1 i PEL-SA-R2 (Hauswaldt i sur. 2012). Kratice označavaju: R = *P. ridibundus*; K = *P. kurtmuelleri*; RK = *P. ridibundus* x *P. kurtmuelleri*; RS = *P. ridibundus* x *P. shqipericus*.



**Slika 11.** Prikaz PCR produkata na agaroznom gelu nakon elektroforeze dobivenih upotrebom početnica PEL-SA-F1 i PEL-SA-R2 (Hauswaldt i sur. 2012). Kratice označavaju: SR = *P. shqipericus* x *P. ridibundus*; L = *P. lessonae*; SK = *P. shqipericus* x *P. kurtmuelleri*; R = *P. ridibundus*; K = *P. kurtmuelleri*.



**Slika 12.** Prikaz PCR produkata na agaroznom gelu nakon elektroforeze dobivenih upotrebom početnica PEL-SA-F1 i PEL-SA-R2 (Hauswaldt i sur. 2012). Kratice označavaju: LR = *P. lessonae* x *P. ridibundus*; L = *P. lessonae*; LK = *P. lessonae* x *P. kurtmuelleri*; RS = *P. ridibundus* x *P. shqipericus*.



**Tablica 5.** Broj uzorka te njegova pripadnost vrsti ili hibridu prema SAI-1 biljegu. Kratice označavaju: K = *P. kurtmuelleri*, L = *P. lessonae*, R = *P. ridibundus*, S = *P. shqipericus*, KS = *P. kurtmuelleri* x *P. shqipericus*, LK = *P. lessonae* x *P. kurtmuelleri*, LR = *P. lessonae* x *P. ridibundus*, RK = *P. ridibundus* x *P. kurtmuelleri*, SR = *P. shqipericus* x *P. ridibundus*.

Uzorci	Vrsta ili hibrid prema SAI-1
J1, J3, J4, J8, J11, J12, J15, J16, J24, J26, J28, J31, J32, P1, P3 - P5, P7, P10, P11, P13, P21, P25 – P27, P29	R
J13, J14, J21, J27	L
J19, J33, P18, P28	S
J23, J25, J29, J30, P2, P9, P12, P16, P19, P20, P24	K
J2, J9, J10	LR
J17, J18, J20, P14, P23	SR
J5, J34, P6, P8, P15, P17, P22	RK
J6, J7	LK
J22	KS

„Čiste“ populacije prevladavaju u oba godišnja doba, pa tako u proljeće čine 75,9% ukupne populacije, a u jesen 67,6%. „Čista“ populacija zasebno je otprilike podjednako brojna i u proljeće i u jesen (48,9% i 51,1%), dok su hibridi učestaliji u jesen (61,1%) nego u proljeće (38,9%). Jedinke s L genomom, i u „čistim“ i u hibridnim populacijama, javljaju se samo u jesensko godišnje doba.

*P. ridibundus* i *P. kurtmuelleri* stvaraju hibride sa svim preostalim vrstama, dok *P. lessonae* i *P. shqipericus* stvaraju hibride s dvije vrste, i to obje s *P. ridibundus* i *P. kurtmuelleri*. Najzastupljeniji genom u hibrida je *P. ridibundus* genom, a nalazi se u njih 15, odnosno 83,4%. Najmanje zastupljeni genom u hibrida je genom *P. lessonae* u samo pet jedinki (27,78%). Genomi autohtonih vrsta *P. lessonae* i *P. ridibundus* se javljaju u 47 jedinki (74,6%), dok su genomi alohtonih vrsta *P. kurtmuelleri* i *P. shqipericus* zastupljeni s 47,7% (u 30 jedinki).

## 4.2. ANALIZA NUKLEOTIDNIH SLJEDOVA CITOKROM B BILJEGA

Prema rezultatima lokalnog sravnjenja nukleotidnih sljedova BLAST pretragom (Altschul i sur. 1990) i algoritmom blastn na NCBI, eksperimentalno određeni nukleotidni sljedovi cytb pokazali su najveću homologiju s nukleotidnim sljedovima parcijalnog mitohondrijskog genoma *P. ridibundus* (pristupni broj JN627423) te s kompletnim mitohondrijskim genomom *P. kurtmuelleri* (pristupni broj KP814011; Tablica 6). U *P. ridibundus* vrstu spada 21 jedinka (42%), od čega su 10 jesenske i 11 proljetne. U *P. kurtmuelleri* spada 29 jedinki (48%), od čega su 11 jesenske te 18 proljetne.

Nakon sravnjenja cytb nukleotidnih sljedova u programu Sequencher 4.1.4, otpalo je 13 (J2 – J4, J8, J10, J12, J14, J21, J25, J27, J29, J32, J34) nukleotidnih sljedova koji nisu zadovoljavali zadane parametre (minimalno preklapanje 20 baza i 85%). Pronalaskom identičnih nukleotidnih sljedova u višestrukome sravnjenju, podaci su svrstani u pet haplotipova (Tablica 6).

U svim haplotipovima se nalazi otprilike jednak broj jesenskih i proljetnih jedinki, osim u H3 koji broji samo jednu jedinku (jesensku) te H5 koji ima prilično više proljetnih (njih 11) od jesenskih jedinki (samo dvije). U usporedbi s lokalnim sravnjenjem nukleotidnih sljedova, uzorci svrstani u H1 i H3 pripadaju vrsti *P. ridibundus*, a uzorci svrstani u H2, H4 i H5 pripadaju vrsti *P. kurtmuelleri* (Tablica 6).

Jesenske jedinke svrstane su u svih pet haplotipova. Većina njih pripada haplotipovima H1 vrste *P. ridibundus* (42,9%) i H2 vrste *P. kurtmuelleri* (33,3%). Najmanje jesenskih jedinki, samo jedna, je haplotipa H3, a po dvije jedinke pripadaju u preostala dva haplotipa H4 i H5. Proljetne jedinke su raspoređene u četiri haplotipa. Najveći dio njih spada u haplotipove H1 i H5 (37,9%), a manji dio u H2 (17,2%) i H4 (6,9%). Jedini haplotip u kojem su jednako zastupljene i jesenske i proljetne jedinke (50%) je H4. Haplotipovi u kojima prevladavaju jesenske jedinke su H2 s 58,3% i H3 s 100%, a proljetne jedinke prevladavaju u haplotipovima H1 s 55% i H5 s 84,6%. U jesen *P. ridibundus* jedinke čine 47,6% populacije (deset od 21 jedinki), a *P. kurtmuelleri* 52,4% populacije (11 od 21 jedinki). U proljeće *P. ridibundus* čine 37,9% populacije (11 od 29 jedinki), a *P. kurtmuelleri* 62,1% populacije (18 od 29 jedinki).

**Tablica 6.** Prikaz raspodjele uzoraka po haplotipovima prema cytb biljegu te pripadnost vrsti prema BLAST analizi.

Haplotip	Uzorci	Vrsta prema BLAST-u
H1	J1, J6, J7, J9, J18, J23, J24, J30, J31, P1, P3, P6, P7, P10, P12, P17, P19, P23, P26, P27	<i>P. ridibundus</i>
H2	J5, J11, J15, J16, J26, J28, J33, P2, P5, P15, P18, P20	<i>P. kurtmuelleri</i>
H3	J13	<i>P. ridibundus</i>
H4	J17, J22, P16, P28	<i>P. kurtmuelleri</i>
H5	J19, J20, P4, P8, P9, P11, P13, P14, P21, P22, P24, P25, P29	<i>P. kurtmuelleri</i>

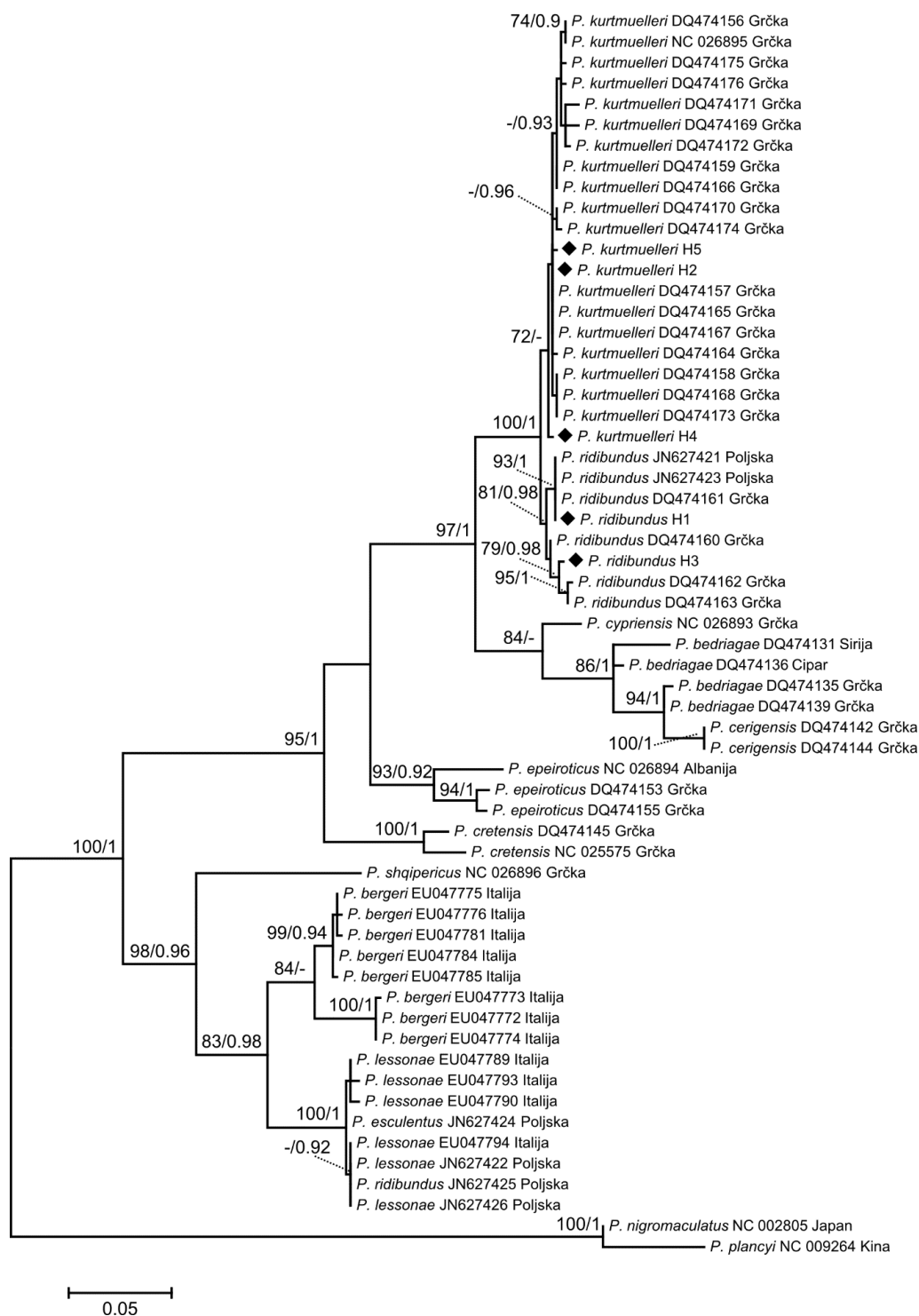
Uzorci kod kojih se poklapaju rezultati dobiveni cytb analizom i SAI-1 analizom su J1, J24, J31, P1, P3, P7, P10, P26 i P27. Oba biljega pokazuju da se radi o vrsti *P. ridibundus*. Svi navedeni uzorci pripadaju i istom haplotipu H1. Uzorci kod kojih također dolazi do poklapanja rezultata dobivenih analizom oba biljega su P2, P9, P16, P20 i P24, a pripadaju vrsti *P. kurtmuelleri*, te su raspoređeni u sva tri haplotipa.

U nekoliko uzoraka vidljivo je neslaganje rezultata analize cytb i SAI-1 biljegom. Uzorci J11, J15, J16, J26, J28, P4, P11, P13, P21, P25 te P29 analizom cytb spadaju u haplotipove H2, H4 ili H5 vrste *P. kurtmuelleri*, a analizom SAI-1 u *P. ridibundus*. Uzorci J23, J30, P12 te P19 pokazuju suprotno, odnosno prema cytb spadaju u *P. ridibundus* (svi haplotip H1), a prema SAI-1 u *P. kurtmuelleri*. Uzorak J13 prema cytb spada u *P. ridibundus*, a prema SAI-1 u *P. lessonae*. Uzorci J6 i J7 analizom mitohondrijskog biljega također spadaju u H1 vrste *P. ridibundus*, a prema SAI-1 biljegu pripadaju hibridu *P. kurtmuelleri* x *P. lessonae*. Uzorci J19, J33, P18 te P28 su svrstani u sva tri haplotipa vrste *P. kurtmuelleri* prema cytb biljegu, dok prema SAI-1 biljegu pripadaju vrsti *P. shqipericus*. Biljeg cytb je svrstao uzorke J20 i P14 u H5 vrste *P. kurtmuelleri*, a SAI-1 biljeg u hibrida *P. shqipericus* x *P. ridibundus*.

Djelomična preklapanja su vidljiva u uzorcima J5, P8, P15 te P22, koje cytb svrstava u H2 i H5 vrste *P. kurtmuelleri*, a SAI-1 biljeg u hibrida *P. kurtmuelleri* x *P. ridibundus*. Uzorci J17 i J22 su također svrstani prema cytb u *P. kurtmuelleri* (H4), a prema SAI-1 u hibrida *P. kurtmuelleri* x *P. shqipericus*. Uzorak J9 prema cytb spada u *P. ridibundus*, a prema SAI-1 u *P. kl. esculentus*.

Filogenetički odnosi haplotipova dobivenih u ovom istraživanju i nukleotidnih sljedova različitih vrsta roda *Pelophylax* dostupnih u NCBI GenBank bazi podataka prikazani su na slici 13. Bayesovom metodom i metodom najveće vjerojatnosti (ML) te upotrebom KHY+G+I modela dobivena su filogenetička stabla vrlo slične topologije, a prikazano je stablo s topologijom i duljinom grana dobiveno ML metodom. Stablo je ukorijenjeno vanjskim grupama *P. nigromaculatus* i *P. plancyi* te je prikazano s odnosima duljina grana prema skali, koje predstavljaju broj supstitucija po nukleotidnom mjestu. Metodom najveće vjerojatnosti dobiveno je stablo s najvećom log vjerojatnosti vrijednosti (-2661.4146). Diskretna gama distribucija je upotrijebljena za modeliranje razlika u evolucijskim stopama između nukleotidnih mjesta (pet kategorija; +G, parametar = 0.3988). Model stope varijacije je dozvolio da su neka mjesta evolucijski nevarijabilna ([+I], 39.8003%). Konsenzus stablo Bayesovom metodom je napravljeno iz grupe najboljih analiziranih stabala, izuzev prvih 12.5 milijuna. Na mjestu čvorova brojevi ispred kose crte označavaju postotak broja stabala koja su podržala prikazanu topologiju metodom samoučitanja u 1000 navrata, a brojevi iza kose crte označavaju posteriorne vjerojatnosti. Na čvorovima na kojima nema brojeva, topologija nije podržana niti jednom metodom.

Većina čvorova na filogenetičkom stablu je podržana od strane obje metode. Na filogenetičkom stablu jasno je vidljivo odvajanje vrste *P. kurtmuelleri* od *P. ridibundus* podržano od strane obje metode. Jasno je odvajanje i ostalih vrsta, odnosno nukleotidnih sljedova upotrebljenih iz NCBI GenBank. Jedine iznimke su uzorci *P. ridibundus* pristupnog broja JN627425 iz Poljske te uzorak *P. kl. esculentus* pristupnog broja JN627424, također iz Poljske. Nukleotidni sljedovi dobiveni u ovom istraživanju svrstavaju se u pet haplotipova (tri haplotipa *P. kurtmuelleri* i dva haplotipa *P. ridibundus*). Haplotip H1 vrste *P. ridibundus* grupiran je zajedno s jedinkama *P. ridibundus* iz Grčke i Poljske, te je uvelike podržan prema obje upotrebene metode filogenetičke rekonstrukcije. Haplotip H3 vrste *P. ridibundus* je pak grupiran kao zaseban te je odvojen i od grčkih i od poljskih jedinki. Taj čvor je također podržan od strane obje metode. Haplotip H2 vrste *P. kurtmuelleri* je grupiran zajedno s grčkim jedinkama te iste vrste. Haplotipovi H4 i H5 vrste *P. kurtmulleri* su grupirani kao zasebni. Međutim, niti jedan od tih čvorova nije podržan s obje metode. Najveća neslaganja u podržanosti vidljiva su na mjestima grupiranja *P. kurtmuelleri* jedinki. Dok ih Bayesova metoda s uglavnom velikom podržanosti odvaja, ML metoda ili ne podržava čvorove ili je ta podržanost niska.



**Slika 13.** Filogenetički odnosi vrsta roda *Pelophylax* upotrebom cytb biljega uzoraka iz ovog istraživanja (crni romb ispred imena uzorka) i iz NCBI GenBank baze podataka. Topologija i duljine grana su dobivene ML metodom upotrebom HKY+G+I modela. Brojevi ispred kose crte na mjestu čvorova označavaju postotak broja stabala koja su podržala prikazanu topologiju metodom samoučitanja u 1000 navrata ML metodom, a brojevi iza kose crte označavaju posteriorne vjerojatnosti dobivene Bayesovom metodom. Na čvorovima na kojima nema brojeva, topologija nije podržana niti jednom metodom. Stablo je ukorijenjeno vanjskim grupama *P. nigromaculatus* i *P. plancyi*. Skala predstavlja broj supstitucija po nukleotidnom mjestu i u odnosu je s duljinama grana.

## 5. RASPRAVA

Budući da se Hrvatska nalazi na području Mediterana i Balkanskog poluotoka koji su imali dinamičku geološku prošlost, pretpostavlja se da na tom području postoji velika raznolikost žaba unutar roda *Pelophylax* Fitzinger, 1843. Prema Korlević (2012), na području Crne Mlake molekularnim metodama ustanovljena je prisutnost vrsta *P. ridibundus* i *P. lessonae*. Upotrebom cytb molekularnog biljega u ovom radu potvrđena je prisutnost *P. ridibundus* vrste, dok je SAI-1 biljeg potvrdio prisutnost *P. ridibundus* i *P. lessonae*. Osim već prethodno poznatih vrsta na tom području utvrđena je prisutnost dosad nepoznatih novih vrsta: *P. kurtmuelleri* cytb molekularnim biljegom i *P. kurtmuelleri* i *P. shqipericus* SAI-1 biljegom.

Uzorci cytb koji se u ovom radu nisu mogli uključiti u analizu prilikom izrade filogenetičkog stabla (J2 – J4, J8, J10, J12, J14, J21, J25, J27, J29, J32, J34) su isti oni koji su slabije vidljivi na agaroznom gelu pri provjeri uspješnosti PCR-a. Svi uzorci pripadaju jesenskim jedinkama. Uzorci su dobro vidljivi na provjeri uspješnosti izolacije DNA, stoga je problem vjerojatno bio u nekom od koraka PCR-a, zbog čega su nukleotidni sljedovi loše očitani sekvenciranjem. Sličan problem je uočen u radu Korlević (2012), te je zaključeno da je uzrok lošoj amplifikaciji najvjerojatnije korištenje početnica koje nisu dovoljno selektivne i ne vežu se dobro za *P. lessonae* mtDNA kalup. Neke od jedinki iz ovog istraživanja koje nisu dobro amplificirane (J2, J10, J14, J21 i J27) prema SAI-1 biljegu sadrže *P. lessonae* jezgrin genom. Također, napravljena je BLAST pretraga njihovih cytb nukleotidnih sljedova, iako su dobiveni iz kromatograma loše kvalitete. Rezultati BLAST pretrage su pokazali najveću sličnost tih nukleotidnih sljedova s onima od vrsta *P. lessonae* ili u *P. kl. esculentus* koje se nalaze u NCBI GenBank bazi. Takvi loše očitani nukleotidni sljedovi nisu uvrštavani u sravnjenje za filogenetičke analize, jer bi se dobila lošija razlučivost filogenetičkih stabala, budući da bi se svi nukleotidni sljedovi trebali skratiti za više od 200 parova baza.

Korlević (2012) u svom radu primjećuje neslaganje u rezultatima determinacije prema mitohondrijskoj i jezgrinoj DNA, što je ukazivalo na mogućnost postojanja *P. kl. esculentus* hibrida ili introgresije *P. lessonae* mitohondrijskog genoma u *P. ridibundus* jedinke. Uzorci *P. ridibundus* pristupnog broja JN627425 iz Poljske te *P. kl. esculentus* pristupnog broja JN627424 također iz Poljske su prema filogenetičkom stablu iz ovog istraživanja svrstani među *P. lessonae* jedinke. Navedeni uzorci potječu iz istraživanja Hofman i sur. (2012) te su autori utvrdili kako se radi o introgresiji *P. lessonae* mtDNA u *P. ridibundus* jedinke preko *P. kl. esculentus* jedinki. Iako je nukleotidna divergencija između *P. lessonae* mtDNA i *P. ridibundus*

mtDNA dosta velika, ona očito ne dovodi do štetnih epistatskih učinaka (Hofman i sur. 2012). Plötner i sur. (2008) su u svom radu također utvrdili prijenos *P. lessonae* mtDNA u *P. ridibundus* jedinke i opisali mogući način tog prijenosa. Međutim, dosad nije uočeno da je moguć i suprotan uzorak, odnosno prijenos *P. ridibundus* genoma u *P. lessonae* jedinke, kao što je slučaj u ovom istraživanju (primjerice uzorak J13). U ovom istraživanju je također uočeno mnogo drugih neslaganja u identifikaciji vrsta prema *cytb* i SAI-1 biljegu te se ne može sa sigurnošću tvrditi koji oblik introgresije se dogodio, odnosno iz koje vrste u koju vrstu.

SAI-1 biljeg u ovom istraživanju pokazuje i prisutnost već ustanovljenih hibrida *P. kl. esculentus* na području Crne Mlake. Na istom području dosad nisu pronađeni hibridi između *P. kurtmuelleri* i *P. shqipericus*, ali i dosad neutvrđeni hibridi u literaturi (*P. shqipericus* x *P. ridibundus*, *P. ridibundus* x *P. kurtmuelleri* te *P. lessonae* x *P. kurtmuelleri*).

Hibridizacija između *P. kurtmuelleri* i *P. shqipericus* je zabilježena u radu Hotz i sur. (1985), ali su vrste navedene kao *P. ridibundus* i neimenovana balkanska vrsta. Hotz i sur. (1985) su također utvrdili da ti hibridi nisu hibridogenetski, odnosno genom *P. shqipericus* je otporan na isključivanje. Günther (1982) govori o učinkovitom antihibridizacijskom mehanizmu na područjima gdje *P. kurtmuelleri* živi sintopijski s *P. shqipericus*, iako je ipak uočen mali broj hibrida. Hotz i Uzzell (1982) su na područjima gdje je *P. kurtmuelleri* simpatrijski s *P. shqipericus* utvrdili otprilike 1% povratnih križanaca, što znači da hibridi nisu sterilni. Vucić (2015) na području Skadarskog jezera također uočava hibride *P. kurtmuelleri* x *P. shqipericus*.

Hauswaldt i sur. (2012) svoju metodu određivanja pripadnosti vrsti ili hibridu na temelju SAI-1 biljega procjenjuju 100% točnom, budući da su je provjerili određivanjem nukleotidnih sljedova dotičnog biljega za svaku vrstu ili hibrid. Autori su također upotrebom SAI-1 biljega ukazali na mogućnost introgresije *P. kurtmuelleri* na sjever Europe (Latvija i Poljska), budući da su alel specifičan za tu vrstu otkrili u jedinkama identificiranim kao pripadnicima *Pelophylax kl. esculentus* sustava. Vucić (2015) prvi objavljuje duljinu SAI-1 za *P. shqipericus*, obzirom da do tada nije bilo postojećih podataka u literaturi.

Prema BLAST analizi i svrstavanju *cytb* uzoraka u haplotipove, *P. kurtmuelleri* je brojnija jedinka od *P. ridibundus* te s tri haplotipa pokazuje veću gensku raznolikost od *P. ridibundus* s dva haplotipa. Također, jesenske jedinke pokazuju veću raznolikost od proljetnih jedinki, budući da su jesenske svrstane u svih pet dobivenih haplotipova, a proljetne u četiri.

Filogenetička stabla dobivena u ovom istraživanju potpuno i jasno odvajaju *P. ridibundus* od *P. kurtmuelleri*. Postoje različita proturječna istraživanja o statusu *P. kurtmuelleri*. Lymberakis

i sur. (2007) smatraju na osnovi mtDNA da se *P. kurtmuelleri* treba tretirati kao konspecifik s *P. ridibundus*. Novija pak istraživanja s čitavim mitohondrijskim genomom predlažu da je *P. kurtmuelleri* ipak zasebna vrsta (Hofman i sur. 2015). Plötner i sur. (2010) su na temelju mtDNA svrstali *P. ridibundus* i *P. kurtmuelleri* u istu haplogrupu. Isti autori predlažu da *P. kurtmuelleri* ipak ima status vrste zbog toga što ne može stvarati fertilne hibride s *P. lessonae*.

Situacija na Crnoj Mlaci iz perspektive rezultata dobivenih u ovom istraživanju je najbližnja onoj u središnjoj Italiji (Domeneghetti i sur. 2013). Na tom području prisutne su autohtone vrste *P. l. bergeri* te hibrid *P. kl. hispanicus*, a alohtone vrste su *P. ridibundus* i *P. shqipericus*. Domeneghetti i sur. (2013) su upotrebom mtDNA uputili i na mogućnost hibridizacije između alohtone *P. ridibundus* i autohtone *P. l. bergeri*. Iste autore zabrinjava mogućnost stvaranja hibrida čija bi se genealogija teško utvrdila, te nestanak autohtone *P. lessonae*, budući da se L genom isključuje tijekom hibridogeneze. Također, predlažu daljnja istraživanja kodominantnim biljezima kao što su mikrosateliti kako bi se bolje utvrdila stopa hibridizacije i poduzele potrebne mjere kontrole širenja alohtonih vrsta.

Moguće je da je prisutnost dosad neutvrđenih vrsta *P. kurtmuelleri* i *P. shqipericus* te hibrida *P. shqipericus* x *P. ridibundus*, *P. ridibundus* x *P. kurtmuelleri*, *P. lessonae* x *P. kurtmuelleri* te *P. kurtmuelleri* x *P. shqipericus* na području Crne Mlake posljedica čovjekove djelatnosti. Crna Mlaka je od početka 20. stoljeća ribnjačarsko mjesto te su u ribnjake unošene ribe iz drugih zemalja (Plančić 1976). Slučajne (primjerice preko ribnjaka) ili namjerne translokacije (primjerice iz kulinarskih razloga) zelenih žaba su učestale zadnje desetljeće (Holsbeek i Jooris 2010). Dolaskom na novo područje, alohtone vrste se nalaze pod novim selektivnim pritiscima (preživljavanje transporta i širenje u novom području) te time mogu utjecati i na autohtone vrste (Mack i sur. 2000). Iako novo unešene vrste tijekom unosa dožive smanjenje genske raznolikosti zbog male veličine populacije, ona i dalje može biti veća od one nativnih vrsta, čime se alohtonim vrstama povećava mogućnost za brzim širenjem u novom području (Suarez i Tsutsui 2008). Opasnost postoji i od stvaranja hibrida, koji također mogu imati ekološku prednost nad nativnim vrstama i dovesti do njihovog izumiranja (Parker i sur. 1999). Holsbeek i Jooris (2010) su u Belgiji utvrdili hibridizaciju između alohtonih vrsta *P. ridibundus* i *P. cf. bedrigae* te su to opisali kao posljedicu antropogene komercijalne djelatnosti. Iz rezultata dobivenih u ovom istraživanju, *P. kurtmuelleri* pokazuje veću raznolikost od *P. ridibundus*. Iako je po SAI-1 biljegu *P. ridibundus* najbrojnija jedinka, genom te vrste se nalazi i u mnogo hibrida koji dosad nisu opisani, a i *P. lessonae* jedinke su najmanje učestale od „čistih“ jedinki, kao što je i L genom u ukupnoj populaciji. Zbog navedenih razloga autohtone vrste zelenih žaba



na području Crne Mlake mogu biti u opasnosti od izumiranja, budući da jedinke alohtonih vrsta i njihovi hibridi zauzimaju priličan broj od ukupnog broja jedinki.

Za detaljniji uvid u filogenetičke odnose između zelenih žaba na području Crne Mlake potrebno je koristiti i jezgrine i mitohondrijske molekularne biljege. Bilo bi zanimljivo vidjeti kakvi rezultati bi se dobili određivanjem nukleotidnih sljedova dobivenih SAI-1 PCR produkata te njihovim svrstavanjem u filogenetičko stablo. Također, Hauswaldt i sur. (2012) su osmislili i metodu za otkrivanje kariotipa, odnosno stupnja ploidnosti kod hibrida. Metoda se temelji na fluorescentnom obilježavanju početnica, mjerenju intenziteta pojedinog alela te računanju odnosa između različitih alela. Time bi se mogao dobiti još bolji uvid u raspodjelu genoma invazivnih vrsta i njihovom utjecaju na autohtone.

## 6. ZAKLJUČCI

Molekularnim biljegom SAI-1 na području Crne Mlake potvrđena je prisutnost vrsta *P. ridibundus* i *P. lessonae* te hibrida *P. kl. esculentus*. Istim molekularnim biljegom utvrđena je prisutnost dosad nezabilježenih vrsta na ovom području *P. kurtmuelleri* i *P. shqipericus* te hibrida *P. kurtmuelleri* x *P. shqipericus*. Također, zabilježeni su i dosad u literaturi neopisani hibridi *P. shqipericus* x *P. ridibundus*, *P. ridibundus* x *P. kurtmuelleri* te *P. lessonae* x *P. kurtmuelleri*.

Prema SAI-1 biljegu, u analiziranoj populaciji je više „čistih“ jedinki u odnosu na hibridne jedinke. „Čiste“ populacije prevladavaju u oba godišnja doba u odnosu na hibride. Obje populacije su otprilike podjednako brojne i u proljeće i u jesen.

Molekularnim biljegom cytb na području Crne Mlake potvrđena je prisutnost vrste *P. ridibundus*. Istim molekularnim biljegom je utvrđena prisutnost dosad nezabilježene vrste na ovom području *P. kurtmuelleri*.

*P. kurtmuelleri* je na temelju cytb biljega brojnija vrsta i pokazuje veću gensku raznolikost od *P. ridibundus*. Također, jesenske jedinke pokazuju veću raznolikost od proljetnih jedinki.

Bayesovom metodom i metodom najveće vjerojatnosti (ML) na filogenetičkom stablu je vidljivo jasno odvajanje *P. kurtmuelleri* od *P. ridibundus*.

## 7. LITERATURA

- Altekar G., Dwarkadas S., Huelsenbeck J.P., Ronquist F. (2004): Parallel Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo for Bayesian phylogenetic inference. *Bioinformatics* 20:407-415.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. (1990): Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215(3):403-410.
- AmphibiaWeb: Information on amphibian biology and conservation. [web application]. 2016. Berkeley, California: AmphibiaWeb. Dostupno na: <http://amphibiaweb.org/>. (Pristupljeno: srpanj, 2016).
- Applied Biosystems, Foster City, SAD. Dostupno na: <http://appliedbiosystems.com/>.
- Arioli M., Jakob C., Reyer H. (2010): Genetic diversity in water frog hybrids (*Pelophylax esculentus*) varies with population structure and geographic location. *Molecular Ecology* 19:1814-1828.
- Arnold M.L. (1997): *Natural Hybridization and Evolution*. Oxford University Press, New York.
- Berger L. (1970): Some characteristics of the crosses within *Rana esculenta* complex in postlarval development. *Annales Zoologici* 27:373-416.
- Berger L. (1988): On the origin of genetic systems in european water frog hybrids. *Zoologica Poloniae* 35:5-32.
- Berger L., Uzzell T., Hotz H. (1998): Sex determination and sex ratios in western Palearctic water frogs: XX and XY female hybrids in the Pannonian Basin? *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 140:220-239.
- Borkin L.J., Lada G.A., Litvinchuk S.N., Melnikov D.A., Rosanov J.M. (2006): The first record of mass triploidy in hybridogenic green frog *Rana esculenta* in Russia (Rostov Oblast'). *Russian Journal of Herpetology* 13:77-82.
- Canestrelli D., Nascetti G. (2008): Phylogeography of the pool frog *Rana (Pelophylax) lessonae* in the Italian peninsula and Sicily: multiple refugia, glacial expansions and nuclear-mitochondrial discordance. *Journal of Biogeography* 35:1923-1936.
- Christiansen D., Fog K., Pedersen B.V., Boomsma J.J. (2005): Reproduction and hybrid load in all-hybrid populations of *Rana esculenta* water frogs in Denmark. *Evolution* 59:1348-1361.

- Christiansen D., Reyer H. (2009): From clonal to sexual hybrids: genetic recombination via triploids in all-hybrid populations of water frogs. *Evolution* 63:1754-1768.
- Christiansen D.G. (2009): Gamete types, sex determination and stable equilibria of all-hybrid populations of diploid and triploid edible frogs (*Pelophylax esculentus*). *BMC Evolutionary Biology* 9:doi:10.1186/1471-2148-9-135.
- Coyne J.A., Orr H.A. (2004): *Speciation*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. (2012): jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8):772.
- Dawley R.M. (1989): *An introduction to unisexual vertebrates*. U: Dawley RM, Bogart JP (ur): *Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates*. New York State Museum, Albany, New York, str. 1-18.
- Doležalková M., Sember A., Marec F., Ráb P., Plötner J., Choleva L. (2016): Is premeiotic genome elimination an exclusive mechanism for hemiclinal reproduction in hybrid males of the genus *Pelophylax*? *BioMed Central Genetics* 17:doi:10.1186/s12863-016-0408-z.
- Domeneghetti D., Bruni G., Fasola M., Bellati A. (2013): Discovery of alien water frogs (gen. *Pelophylax*) in Umbria, with first report of *P. shqipericus* for Italy. *Acta Herpetologica* 8(2):171-176.
- Dubois A. (2009): Asexual and metasexual vertebrates. *Alytes* 27(2):62-66.
- Frost D.R. (2016): *Amphibian Species of the World: an Online Reference*. Version 6.0. [web application]. American Museum of Natural History, New York, SAD. Dostupno na: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. (Pristupljeno: srpanj, 2016)
- Galtier N., Nabholz B., Hurst G.D.D. (2009): Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology* 18(22):4541-4550.
- Geer L.Y., Marchler-Bauer A., Geer R.C., Han L., He J., He S., Liu S., Shi W., Bryant S.H. (2009): The NCBI BioSystems database. *Nucleic Acids Research* 38:doi:10.1093/nar/gkp858.
- Graf J.D., Polls Pelaz M. (1989): Evolutionary genetics of *Rana esculenta* complex. U: Dawley R.M., Bogart J.P. (ur): *Evolution and ecology of unisexual vertebrates*. The New York State Museum Bulletin, Albany, str. 298-302.

- Guerrini F., Bucci S., Raghianti M., Mancino G., Hotz H., Uzzell T., Berger L. (1997): Genomes of two water frog species resist germ line exclusion in interspecies hybrids. *Journal of Experimental Zoology* 279:163-176.
- Gueux G., Hotz H., Semlitsch R.D. (2002): Deleterious alleles and differential viability in progeny of natural hemiclinal frogs. *Evolution* 56(5):1036-1044.
- Guindon S., Gascuel O. (2003): A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology* 52:696-704.
- Günther R. (1982): Ergebnisse experimenteller Kreuzungen zwischen Wasserfröschen (Anura, Ranidae) aus verschiedenen Ländern Europas und Mittelasiens. *Vertebr Hung* 21:157–167.
- Günther R. (1997): *Rana lessonae* Camerano, 1882. U: Gasc J.P., Cabela A., Crnobrnja-Isailovic J., Dolmen D., Grossenbacher K., Haffner P., Lescure J., Martens H., Martínez Rica J.P., Maurin H., Oliveira M.E., Sofianidou T.S., Veith M., Zuiderwijk A. (ur): Atlas of Amphibians and Reptiles in Europe. Paris: Societas Europaea Herpetologica, Muséum National d'Histoire Naturelle, str. 148-149.
- Hasegawa M., Kishino H., Yano T. (1985): Dating of human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22(2):160-174.
- Hoffmann A., Plötner J., Pruvost N. B. M., Christiansen D. G., Röthlisberger S., Choleva L., Mikulíček P., Gogălniceanu D., Sas-Kovács I., Shabanov D., Morozov-Leonov S., Reyer H. (2015): Genetic diversity and distribution patterns of diploid and polyploid hybrid water frog populations (*Pelophylax esculentus* complex) across Europe. *Molecular Ecology* 24:4371-4391.
- Hofman S., Pabijan M., Dziewulska-Szwajkowska D., Szymura J.M. (2012): Mitochondrial genome organization and divergence in hybridizing central European waterfrogs of the *Pelophylax esculentus* complex (Anura, Ranidae). *Gene* 491(1):71-80.
- Hofman S., Pabijan M., Osikowski A., Litvinchuk S.N., Szymura J.M. (2015): Phylogenetic relationships among four new complete mitogenome sequences of *Pelophylax* (Amphibia: Anura) from the Balkans and Cyprus. *Mitochondrial DNA part A* 27(5):3434-3437.
- Hofman S., Pabijan M., Osikowski A., Szymura J.M. (2014): Complete mitochondrial genome of the Greek marsh frog *Pelophylax cretensis* (Anura, Ranidae). *Mitochondrial DNA Part A* 27(3):1995-1996.

- Holenweg Peter A. K., Reyer H. U., Tietje G. A. (2002): Species and sex ratio differences in mixed populations of hybridogenetic water frogs: the influence of pond features. *Ecoscience* 9:1-11.
- Holsbeek G., Jooris R. (2010). Potential impact of genome exclusion by alien species in the hybridogenetic water frogs (*Pelophylax esculentus* complex). *Biological Invasions* 12:1-13.
- Hotz H. (1983): Genetic diversity among water frogs genomes inherited with and without recombination. Doktorska disertacija, Universität Zürich.
- Hotz H., Mancino G., Bucci-Innocenti S., Raghianti M., Berger L., Uzzell T. (1985): *Rana ridibunda* varies geographically in inducing clonal gametogenesis in interspecies hybrids. *Journal of Experimental Zoology* 236:199-210.
- Hotz H., Uzzell T. (1982): Biochemical detected sympatry of two water frog species: two different cases in the Adriatic Balkans (Amphibia: Ranidae). *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 134:50-79.
- Huelsenbeck J.P., Ronquist F. (2001): MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17:754-755.
- Hwang U., Kim W. (1999): General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *The Korean Journal of Parasitology* 37(4):215-228.
- Korlević P. (2012): Molekularno-filogenetski odnosi unutar roda *Rana* (Amphibia, Ranidae) na osnovi metode RFLP i analize sekvenci za 16S, cyt b i ITS2. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek.
- Librado P., Rozas J. (2009): DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Lymberakis P., Poulakakis N., Manthalou G., Tsigenopoulos C.S., Magoulas A., Mylonas M. (2007): Mitochondrial phylogeography of *Rana* (*Pelophylax*) populations in the Eastern Mediterranean region. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44(2007):115-125.
- Mack R.N., Simberloff D., Lonsdale W.M. (2000): Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences, and control. *Ecological Applications* 10:689-710.

- Mikuliček P., Kautman M., Kautmann J., Pruvost N.B.M. (2015): Mode of hybridogenesis and habitat preferences influence population composition of water frogs (*Pelophylax esculentus* complex, Anura: Ranidae) in a region of sympatric occurrence (western Slovakia). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 53:124-132.
- Nei M., Kumar S. (2000): *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Nilsson J. (2013): 2009 års inventering av gölgröda (*Rana lessonae*) i Norduppland. Länsstyrelsen i Uppsala län. Länsstyrelsens Meddelandeserie 2013:02.
- Ogielska M. (1994): Nucleus-like bodies in gonial cells of *Rana esculenta* (Amphibia, Anura) tadpoles – a putative way of chromosome elimination. *Zoologica Poloniae* 39:461-474.
- Parker I.M., Simberloff D., Lonsdale W.M., Goodell K., Wonham M., Kareiva P.M., Williamson M.H., Von Holle B., Moyle P.B., Byers J.E., Goldwasser L. (1999): Impact: toward a framework for understanding the ecological effects of invaders. *Biological Invasions* 1:3-9.
- Plančić J. (1976): Ribnjačarstvo Crna Mlaka – Zdenčina. *Croatian Journal of Fisheries: Ribarstvo* 31(5):105-112.
- Plötner J. (2005): *Die westpaläarktischen Wasserfrösche*. Laurenti-Verlag, Bielefeld.
- Plötner J., Köhler F., Uzzell T., Beerli P., Schreiber R., Guex G., Hotz H. (2009): Evolution of serum albumin intron-1 is shaped by a 5' truncated non-long terminal repeat retrotransposon in western Palearctic water frogs (Neobatrachia). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 53:784-791.
- Plötner J., Uzzell T., Beerli P., Akin C., Bilgin C. C., Haefeli C., Ohst T., Köhler F., Schreiber R., Guex G., Litvinchuk S.N., Westaway R., Reyer H., Pruvost N., Hotz H. (2010): Genetic divergence and evolution of reproductive isolation in Eastern Mediterranean water frogs. U: Glaubrecht M., Schneider H. (ur): *Evolution in Action: Case studies in Adaptive Radiation, Speciation and the Origin of Biodiversity*. Springer, Heidelberg, Germany, str. 373-403.
- Plötner J., Uzzell T., Beerli P., Spolsky C., Ohst T., Litvinchuk S.N., Guex G.D., Reyer H.U., Hotz H. (2008): Widespread unidirectional transfer of mitochondrial DNA: a case in western Palearctic water frogs. *Journal of Evolutionary Biology* 21(3):668-681.

- Quilodr n C.S., Montoya-Burgos J.I., Currat M. (2014): Modelling interspecific hybridization with genome exclusion to identify conservation actions: the case of native and invasive *Pelophylax* waterfrogs. *Evolutionary Applications*:199-210.
- Ronquist F., Huelsenbeck J.P. (2003): MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.
- Sequencher® version 5.4.5 sequence analysis software, Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI USA. Dostupno na: <http://www.genecodes.com>.
- Som C., Reyer H.U. (2006): Hemiclonal reproduction slows down the speed of Muller's ratchet in hybridogenetic frog *Rana esculenta*. *Journal of Evolutionary Biology* 20:650-660.
- Spolsky C., Uzzell T. (1984): Natural interspecies transfer of mitochondrial DNA in amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81:5802-5805.
- Suarez A.V., Tsutsui N.D. (2008): The evolutionary consequences of biological invasions. *Molecular Ecology* 17:351-360.
- Tanaka T., Matsui M., Takenaka O. (1994): Estimation of phylogenetic relationships among Japanese Brown frogs from mitochondrial cytochrome b gene (Amphibia, Anura). *Zoological Science (Tokyo)* 11:753-757.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. (2013): MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725-2729.
- Tietje G. A., Reyer H.U. (2004): Larval development and recruitment of juveniles in a natural population of *Rana lessonae* and *Rana esculenta*. *Copeia* 3:638-646.
- Tunner H.G., Heppich S. (1981): Premeiotic genome exclusion during oogenesis in the common edible frog, *Rana esculenta*. *Naturwissenschaften* 68:207-208.
- Tunner H.G., Heppich-Tunner S. (1992): A new population system of water frogs discovered in Hungary. In *Proceedings of the Sixth Ordinary General Meeting of the Societas Europaea Herpetologica*:453-460.
- Vandamme A. (2009): Basic concepts of molecular evolution. U: Lemey P., Salemi M., Vandamme A. (ur): *The Phylogenetic Handbook*. Cambridge, Cambridge University Press, str. 3-31.



Vinogradov A.E., Borkin L.J., Günther R., Rosanov J.M. (1991): Two germ cell lineages with genomes of different species in one and the same animal. *Hereditas* 114:245-251.

Vorburger C. (2001): Fixation of deleterious mutations in clonal lineages: evidence from hybridogenetic frogs. *Evolution* 55:2319-2332.

Vucić M. (2015): Određivanje vrsta i hibrida zelenih žaba roda *Pelophylax* sa Skadarskog jezera (Crna Gora) analizom molekularnih biljega. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek.

Xiong J. (2006): *Phylogenetics Basics*. U: Xiong J. (ur): *Essential Bioinformatics*. New York, Cambridge University Press, str. 127-142.