

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Matej Vucić

Određivanje vrsta i hibrida zelenih žaba (rod *Pelophylax*) sa
Skadarskog jezera (Crna Gora) analizom molekularnih biljega

Diplomski rad

Zagreb, 2015.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za ekotoksikologiju na Zoologijskom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Gōrana Klobučara i pomoćnim voditeljstvom dr. sc. Mišela Jelića. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra ekologije i zaštite prirode.

ZAHVALE

Najljepše se zahvaljujem mentorima prof. dr. sc. Goranu Klobučaru i dr. sc. Dušanu Jeliću na ukazanom povjerenju te svom vremenu i pomoći koju su mi pružili.

Hvala Hrvatskom Herpetološkom Društvu „Hyla“ koje je omogućilo izradu ovog rada financijskim sredstvima.

Hvala kolegama iz Crne Gore, posebice Bjanki Prkljačić na skupljenim uzorcima.

Veliko hvala doc. dr. sc. Ani Galov i dr. sc. Haidi Arbanasić na pomoći oko kloniranja.

Najveće hvala dr. sc. Mišelu Jeliću koji me vodio kroz diplomski rad od početka do kraja, koji je utrošio mnogo vremena i živaca na mene te uz kojeg sam naučio više nego iz bilo koje knjige. Hvala ti Mišel, riječi nisu dovoljne!

Također, hvala mojim roditeljima i sestri koji su mi omogućili školovanje i koji su me trpili i bili uz mene cijelo vrijeme!

I hvala mojim prijateljima, koji su uvijek bili tu za mene!

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Određivanje vrsta i hibrida zelenih žaba (rod *Pelophylax*) sa Skadarskog jezera (Crna Gora) analizom molekularnih biljega

Matej Vucić

Rooseveltov trg 6. 10000 Zagreb, Hrvatska

Provedeno je istraživanje zelenih žaba sa Skadarskog jezera (Crna Gora) u svrhu određivanja vrsta i hibrida ove zanimljive skupine vodozemaca na navedenom području. Zelene žabe (rod: *Pelophylax*) su iznimno složena skupina životinja s opisanih 25 vrsta i 3 hibridna kompleksa, od kojih je najbolje istražen *Pelophylax* kl. *esculentus*. Prethodna istraživanja zelenih žaba na Skadarskom jezeru temeljena na morfološkim karakteristikama i složenim molekularnim metodama poput citogenetike i elektroforeze alozima ukazuju na postojanje barem dvije vrste te njihovog hibrida. Budući da izualne i morfološke metode determinacije zelenih žaba nisu uvijek pouzdane ciljevi ovog diplomskog rada su: utvrditi koje su vrste zelenih žaba prisutne na području Skadarskog jezera koristeći mitohondrijske i jezgrine biljege i utvrditi dolazi li do hibridizacije različitih vrsta zelenih žaba na području Skadarskog jezera. Molekularno istraživanje je temeljeno na vrlo jednostavnoj metodi kojom se po duljini albuminske intronske regije može odrediti koje vrste imamo u uzorku i postoje li hibridi. Dodatno je obrađena i mitohondrijska ND3 regija kako bi se sa sigurnošću utvrdile vrste, budući da postoje veliki setovi podataka u on-line bazama podataka nukleotidnih sekvenci kao što je GenBank.

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: Balkanski poluotok, *Pelophylax kurtmuelleri*, *P. shqipericus*, serum albumin gen intronska 1 regija, mitohondrijska regija ND3

Voditelj: Dr. sc. Göran Klobučar, red. prof.

Neposredni voditelj: dr. sc. Mišel Jelić

Ocjenitelji: Dr. sc. Zlatko Liber, izv. prof.
Dr. sc. Ana Galov, doc.
Dr. sc. Göran I. V. Klobučar, red. prof.

Rad prihvaćen: 2. srpnja 2015.

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation thesis

Determination of species and hybrids of water frogs (genus *Pelophylax*) from Skadar Lake, Montenegro using molecular markers

Matej Vucić

Rooseveltovej trg 6. 10000 Zagreb, Hrvatska

The study of water frogs from Skadar Lake (Montenegro) is conducted in order to clarify the number of species and hybrids of this interesting group of amphibians in this area. Water frogs (genus: *Pelophylax*) is an extremely complex group of animals with 25 described species and 3 hybrid complex of which *Pelophylax* kl. *esculentus* is the best studied one. Previous studies of water frogs on Lake Skadar based on morphological characteristics and complex molecular methods such as cytogenetics and allozyme electrophoresis indicate the existence of at least two species and their potential hybrid. Visual and morphological methods of determination of water frogs are not completely reliable so the objectives of this thesis are: to determine which species of water frogs are present in the area of Skadar Lake using mitochondrial and nuclear markers and determine whether there is a hybridization. Molecular research is based on simple method, where the species is determined by the length of the albumin intron region. Hybrids are determined accordingly. Additionally, ND3 mitochondrial region was analyzed in order to determine species with certainty, since there are large sets of data in the open access sequence databases such as GenBank.

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: Balkan Peninsula, *Pelophylax kurtmuelleri*, *P. shqipericus*, length variation of serum albumin gene intron-1, mitochondrial region ND3

Supervisor: Dr. sc. Göran I. V. Klobučar, Prof.

Assistant Supervisor: Dr. sc. Mišel Jelić

Reviewers: Dr. sc. Göran I. V. Klobučar, Prof.

Dr. sc. Zlatko Liber, Prof.,

Dr. sc. Ana Galov, Asst. Prof.

Thesis accepted: July 2nd, 2015

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. LITERATURNI PREGLED.....	2
1.1.1. Razred Amphibia (vodozemci).....	2
1.1.2. Red Anura (bezrepci).....	2
1.1.3. Porodica Ranidae (prave žabe).....	3
1.1.4. Rod <i>Pelophylax</i>	4
1.1.4.1. Evolucija roda <i>Pelophylax</i>	7
1.1.4.2. <i>Pelophylax</i> kl. <i>esculentus</i> kompleks.....	8
1.1.5. Hibridizacija.....	10
1.1.5.1. Općenite značajke hibridizacije i hibridogeneze.....	10
1.1.5.2. Hibridizacija roda <i>Pelophylax</i>	11
1.1.6. Pregled očekivanih vrsta i hibrida na području istraživanja.....	14
1.1.6.1. <i>Pelophylax ridibundus</i>	15
1.1.6.2. <i>Pelophylax lessonae</i>	16
1.1.6.3. <i>Pelophylax</i> kl. <i>esculentus</i>	17
1.1.6.4. <i>Pelophylax shqipericus</i>	19
1.1.6.5. <i>Pelophylax kurtmuelleri</i>	20
2. CILJEVI.....	22
3. MATERIJALI I METODE.....	23
3.1. PODRUČJE ISTRAŽIVANJA.....	23
3.2. MATERIJALI.....	24
3.2.1. Životinjski materijal.....	24
3.2.2. Kemikalije i pribor.....	25
3.3. METODE.....	28
3.3.1. Izolacija DNA.....	28
3.3.2. Lančana reakcija polimerazom.....	28
3.3.3. Kloniranje.....	30
3.3.4. Elektroforeza.....	33
3.3.5. Sekvenciranje.....	34
3.3.6. Analiza sekvenci.....	34
4. REZULTATI.....	36
4.1. ANALIZA PCR PRODUKTA SERUM ALBUMIN INTRONSKE 1 REGIJE NA AGAROSNOM GELU.....	36
4.2. ANALIZA SEKVENCI SERUM ALBUMIN GEN INTRONSKE 1 REGIJE.....	37
4.3. ANALIZA SEKVENCI ND3 MITOHONDRIJSKOG BILJEGA.....	40
5. RASPRAVA.....	43
6. ZAKLJUČAK.....	47
7. LITERATURA.....	48

1. UVOD

Danas se zelene žabe (rod *Pelophylax*) intenzivno istražuju, ponajprije zbog postojanja fertilnih hibrida. Sama pojava hibridizacije nije neobična u životinjskom svijetu. Neprestano se pronalazi sve više primjera fertilnih hibrida koji egzistiraju u prirodnim uvjetima.

Zelene žabe su evolucijski gledano vrlo mlade vrste, koje su divergirale od zajedničkog pretka prije otprilike 5 milijuna godina (Lymberakis i sur. 2007) te se često na mjestima preklapanja areala vrsta javljaju hibridi (Arnold i Ovenden 2004). Ipak, hibridi zelenih žaba su po mnogočemu specifični. Za način razmnožavanja zelenih žaba koristi se izraz hemiklonalno razmnožavanje. Pri takvom razmnožavanju, hibridna jedinka se pari s jednom od roditeljskih vrsta te se set kromosoma kojeg prenosi hibridna roditeljska jedinka nasljeđuju klonalno (genetska varijabilnost tog kromosomskog seta nije utjecana pojavom rekombinacije i nasumičnim razmještajem homolognih kromosoma u mejozi) dok se drugi kromosomski set nasljeđuje iz gamete jedinke roditeljske vrste s kojom se hibrid pario i koji je posljedica mejotičke diobe.

U Europi postoji više tipova kompleksa fertilnih hibrida zelenih žaba [*Pelophylax* kl. *esculentus* Linnaeus, 1758, *Pelophylax* kl. *grafi* Crochet, Dubois, Ohler i Tunner, 1995 i *Pelophylax* kl. *hispanicus* (Bonaparte, 1839)] koje karakterizira hemiklonalno razmnožavanje (Holsbeek i Jooris 2009). Najistraženiji je hibridni kompleks *P.* kl. *esculentus* koji je nastao križanjem vrsta *Pelophylax lessonae* Camerano, 1882 i *Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771. Hibridogenetska priroda reprodukcije ovog hibridnog kompleksa (Berger 1973) je prepoznata par godina nakon definiranja pojma „hibridogeneza“ (Schultz 1969). Kod hibrida *P.* kl. *esculentus*, u Europi su trenutno prepoznata 3 različita sustava hemiklonalnog razmnožavanja: L – E sustav (*P. lessonae* – *P.* kl. *esculentus*), R – E sustav (*P. ridibundus* – *P.* kl. *esculentus*) i E sustav (samo *P.* kl. *esculentus*) (Hoolsbek i Jooris 2009).

Unatoč slaboj istraženosti područja Balkanskog poluotoka (naročito područje zapadnog Balkana), smatra se da je u svim područjima južno od Save u Hrvatskoj, Bosni i Hercegovini te Srbiji prisutna samo vrsta *P. ridibundus*. Tek od područja Skadarskog jezera smatra se da počinje areal distribucije vrste *P. shqipericus* (Uzzell i Crnobrnja Isailović 2009).

Preliminarna istraživanja morfoloških karakteristika zelenih žaba na Skadarskom jezeru ukazuju na postojanje barem dvije vrste te njihovog potencijalnog hibrida (Vološen 2014).

U ovom diplomskom radu je provedeno molekularno istraživanje na uzorcima tkiva zelenih žaba s područja Skadarskog jezera u Crnoj Gori. Analizirani su mitohondrijski i jezgrini molekularni biljezi.

1.1. LITERATURNI PREGLED

1.1.1. RAZRED AMPHIBIA (VODOZEMCI)

Vodozemci su potomci prvih kralježnjaka (*Triadobatrachus*) koji su naselili kopno i morfološki i fiziološki se izrazito razlikuju od svih ostalih kopnenih kralježnjaka (Hillman i sur. 2009). Vodozemci predstavljaju jedinstveni evolucijski model kojim se objašnjava prelazak kralježnjaka iz mora na kopno te koji omogućuje uvid kako su Amniota postali uspješni u osvajanju kopna (Hillman i sur. 2009). Živućí vodozemci su skupina kralježnjaka za koje se smatra da dijele jednog zajedničkog pretka te se time definiraju kao monofiletička skupina, što je podržano rezultatima morfoloških i molekularno filogenetskih istraživanja.

Danas je prepoznato više od 6800 vrsta vodozemaca (Lissamphibia, moderni vodozemci) (Hillman i sur. 2009) i time su oni jedna od najraznolikijih skupina kopnenih kralježnjaka. Podijeljeni su u tri skupine: Anura (bezrepći, žabe), Caudata (repaši, daždevnjaci) te Gymnophiona (beznošći). Ove skupine predstavljaju dugu filogenetsku povijest koja datira najkasnije iz ranog trijasa (Rage i Rocek 1989), ali je otkriveno relativno malo fosilnih zapisa „modernih vodozemaca“ (Lissamphibia). Podrijetlo i međuodnosi ovih triju redova vodozemaca su nejasni (Meyer i Zardoya 2003). Istraživanja pokazuju da su se beznošći prvi odvojili od zajedničkog pretka prije otprilike 367 milijuna godina, a potom su se odvojili repaši i žabe prije otprilike 357 milijuna godina. Ova vremena divergiranja govore da su ova tri reda vodozemaca nastala u paleozoiku, odmah nakon prelaska na kopno, a također su se redovi odvojili vrlo brzo u svojoj evolucijskoj povijesti (San Mauro i sur. 2006).

1.1.2. RED ANURA (BEZREPCI)

Evolucija ranih bezrepaca (žaba) je vjerojatno započela još za vrijeme postojanja jedinstvenog kopna, Pangee (Rage i Rocek 1989). Primjerice, rodovi *Triadobatrachus* na Madagaskaru i *Czatobatrachus* u Poljskoj su se razvili već u ranom trijasu. Stoga se čini da su se svi podredovi (lat. Archaeobatrachia i Mesobatrachia) razvili prije nego je došlo do razdvajanja Pangee na Gondwanu i Lauraziju, no čini se da ove skupine nisu monofiletske (San Mauro i sur. 2005, Frost i sur. 2006). Većina preostalih porodica (podred Neobatrachia) koju čini oko 96% svih današnjih vrsta, je podijeljena u dvije nadporodice, a to su: Ranoidea i

Hyloidea. Ove skupine su se razvijale jako brzo, evolucijski gledano, prije 65 (Ranoidea) i 95 milijuna godina (Hyloidea), nakon razdvajanja Gondwane. Neke male skupine neobatrachida, kao južnoafrički *Heleophrynidae*, australski *Miobatrachidae*, sejšelski *Sooglossidae* i neotropski *Caudiverbera*, najvjerojatnije su bile prisutne prije razdvajanja Gondwane. Štoviše, u prošlosti su te skupine bile raznolikije i raširenije nego danas, ali su reducirane i potisnute kompeticijom s modernim Ranoidea/Hyloidea.

Danas su bezrepci zasigurno najuspješnija i najraznolikija skupina Lissamphibia sa preko 5300 vrsta svrstanih u 42 porodice (Frost i sur. 2006), koji žive na različitim staništima po cijelom svijetu, osim na velikim nadmorskim visinama na obje hemisfere, na većini oceanskih otoka i većini pustinskih regija. Velika brojnost sinapomorfijskih osobina podržava teoriju da su žabe monofiletska skupina unutar Lissamphibia. Neke od njih uključuju redukciju i spajanje kostiju glave, redukciju u broju presakralnih kralježaka itd. Stražnji udovi i stopala su jako izduženi kod većina vrsta, osim fosorijalnih i polufosorijalnih, te nedostatak repa karakterizira sve vrste ove skupine. Jezik bezrepaca je jedinstven unutar svih skupina kralježnjaka, a karakterizira ga to što je pričvršćen na prednjem dijelu vilice, dok je stražnji potpuno slobodan. Oplodnja je u većini slučajeva vanjska i jaja se polažu u vodu ili u njenoj blizini. Unutarnja oplodnja je poznata kod neki vrsta, na primjer: *Ascaphus*, dvije vrste roda *Eleutherodactylus* te kod roda *Mertensophyrne*. Ličinke žaba su jedinstvene za sve skupine Lissamphibia; nemaju udove, nemaju prave zube, imaju velike unutarnje škrge te za razliku od ličinki beznožaca i repaša, reorganiziraju svoje tijelo kroz proces metamorfoze pri prelasku na kopno pri čemu se potpuno razvijaju prednji i stražnji udovi te gube škrge i rep. Punoglavci su najčešće filtratori ili herbivori (Hillman 2009).

Velika i raznolika skupina bezrepaca predmet je brojnih filogenetskih istraživanja. Napredak molekularne biologije te razvoj sekvenciranja i analize podataka su puno pridonijeli poznavanju filogenije ove skupine. Neke važne, ekološke i morfološke karakteristike se još uvijek uvelike koriste kako bi se definirale razlike između određenih rodova i vrsta ove skupine. Takve karakteristike uključuju razna obilježja lubanje, broj kralježaka te izgled pojedinog kralješka, izgled prsnog koša, muskulatura, morfologija punoglavaca i pojedine karakteristike u ponašanju (Pough i sur. 1998).

1.1.3. PORODICA RANIDAE (PRAVE ŽABE)

Porodica Ranidae (prave žabe) spada u red Anura (bezrepci). To je velika i najrasprostanjenija porodica s 1300 do sad opisanih vrsta, svrstanih u 13 potporodica (Pyron i

Wiens 2011). Prave žabe su rasprostranjene na svim kontinentima, osim na Antartici. Porodica je nešto je rjeđa u Australaziji i jugu Južne Amerike. Unutar porodice, zelene žabe su izdignute kao rod (Fitzinger 1843). Ipak, do nedavno se smatralo kako su zelene žabe, podrod (*Pelophylax*) unutar roda *Rana*, čime ih se svrstalo u zajednički rod sa smeđim žabama. Ipak, primjenom molekularnih metoda, dokazana je Fitzingerova hipoteza o postojanju posebnog roda (Frost i sur. 2006). Štoviše, neki autori tvrde da zelene žabe ne samo da su zaseban rod, nego ni ne pripadaju potporodici Raninae i s time nisu bliske rodu *Rana* (Stuart 2008), no to još uvijek nije potvrđeno niti prihvaćeno kao takvo.

Ipak zelene i smeđe žabe dijele neke zajedničke karakteristike na europskom području rasprostranjenosti. Lako se razlikuju od ostalih žaba i alohtone američke vrste *Pelophylax catesbeiana* po horizontalno postavljenim zjenicama i jasno vidljivim dorzolateralnim naborima. Sve imaju tanak struk, duge noge i relativno glatku kožu. Agilne su na kopnu gdje se kreću skakanjem, a u vodi su vrlo dobri plivači (Holman 1998). No, za razliku od smeđih, zelene žabe su često glasnije, više ovise o vodi te su obično društvenije. Suprotnost su tišim, češće više terestričkim smeđim žabama, te se razlikuju od njih po bliže položenim očima, nedostatku tamne maske s obje strane glave i po prisustvu vanjskih zvučnih mjehura položenih postrano na glavi mužjaka. Njihovo obojenje jako varira i odrasle ženke su veće nego mužjaci. Jaja polažu u veće nakupine (do 10000 jajašaca), a iz njih se razvijaju punoglavci koji prolaze metamorfozu potrebnu za odvijanje života na kopnu (Amold i Ovenden 2004).

1.1.4. ROD *Pelophylax*

Zelene žabe roda *Pelophylax* nazivaju se još i Palearktičke vodene žabe (eng. *Paelearctic water frogs*), a dijele se na zapadnu (europsku) i dalekoistočnu skupinu. Zapadna frakcija roda *Pelophylax* je najistraživanija skupina unutar porodice Ranidae, ali unatoč tomu filogenetski odnosi unutar skupine još nisu u potpunosti razjašnjeni (Lymberakis i sur. 2007).

Sistematika roda *Pelophylax* (prema National Center for Biotechnology Information - NCBI):

Koljeno: CHORDATA – svitkovci

Potkoljeno: CRANIATA – lubnjaci

VERTEBRATA – kralježnjaci

Nadrazred: GNATHOSTOMATA – čeljustouste

TELEOSTOMI

EUTELEOSTOMI

SARCOPTERYGII

TETRAPODA – kopneni kralježnjaci

Razred: AMPHIBIA – vodozemci

Nadred: BATRACHIA

Red: ANURA – žabe

Podred: NEOBATRACHIA

Nadporodica: RANOIDEA

Porodica: RANIDAE – prave žabe

Potporodica: RANINAE

Rod: *Pelophylax*

Do sada je opisano 25 vrsta unutar roda *Pelophylax*, uključujući tri klepton vrste (definicija na stranici 9) tj. hibrida (Amphibian species of the world 2009):

Pelophylax bedriagae (Camerano, 1882) – (eng. *Levant water frog*)

Pelophylax bergeri (Gunther In Engelmann, Fritzsche, Gunther i Obst, 1986) – (eng. *Italian pool frog*)

Pelophylax caralitanus (Arikan, 1988)

Pelophylax cerigensis (Beerli, Hotz, Tunner, Heppich i Uzzell, 1994) – (eng. *Karpathos frog*)

Pelophylax chosenicus (Okada, 1931) – (eng. *Seoul frog*)

Pelophylax cretensis (Beerli, Hotz, Tunner, Heppich i Uzzell, 1994) – (eng. *Cretan frog*)

Pelophylax demarchii (Scortecci, 1929) – (taksonomski status upitan, moguća klepton vrsta)

Pelophylax epeiroticus (Schneider, Sofianidou i Kyriakopoulou–Sklavounou, 1984) – (eng. *Epirus water frog*)

Pelophylax fukienensis (Pope, 1929) – (bivši *P. plancyi*)

Pelophylax hubeiensis (Fei i Ye, 1982) – (možda pripada u *P. plancyi*)

Pelophylax kurtmuelleri (Gayda, 1940) – (eng. *Balkan frog*)

Pelophylax lateralis (Boulenger, 1887) – (eng. *Kokarit frog, yellow frog, "wood frog"*)
(možda pripada u *Hylarana*)

Pelophylax lessonae (Camerano, 1882) – mala zelena žaba

Pelophylax nigromaculatus (Hallowell, 1861) – (eng. *dark-spotted frog*) (možda uključuje i *P. tenggerensis*)

Pelophylax perezii (López–Seoane, 1885) – (eng. *Perez's frog*)

Pelophylax plancyi (Lataste, 1880) – (eng. *eastern golden frog*) (možda uključuje i *P. hubeiensis*)

Pelophylax porosus (Cope, 1868) – (eng. *Daruma pond frog*)

Pelophylax ridibundus (Pallas, 1771) – velika zelena žaba

Pelophylax saharicus (Boulenger, 1913) – (eng. *Sahara frog*)

Pelophylax shqipericus (Hotz, Uzzell, Guenther, Tunner i Heppich, 1987) – (eng. *Albanian water frog*)

Pelophylax tenggerensis (Zhao, Macey i Papenfuss, 1988) – (možda pripada u *P. nigromaculatus*)

Pelophylax terentievi (Mezhzherin, 1992) – (taksonomski status upitan, moguća klepton vrsta)

Tri kleptona (hibridne forme) su:

Pelophylax kl. *esculentus* (Linnaeus, 1758) – zelena žaba (*P. lessonae* × *P. ridibundus*)

Pelophylax kl. *grafi* (Crochet, Dubois, Ohler i Tunner, 1995) – (eng. *Graf's hybrid frog*) (*P. perezi* × *P. ridibundus*)

Pelophylax kl. *hispanicus* (Bonaparte, 1839) – (eng. *Italian edible frog*) (*P. bergeri* × *P. ridibundus* / *P. kl. esculentus*)

Za neke vrste roda *Pelophylax* status je upitan budući da neke vrste još nisu jasno sistematski definirane. U starijoj literaturi se za sve vrste roda *Pelophylax* koristio naziv *Rana* (primjerice *Rana ridibunda* ili *Rana lessonae*). No ovdje ćemo koristiti novo nazivlje *P. ridibundus* i *P. lessonae*.

1.1.4.1. Evolucija roda *Pelophylax*

Rod *Pelophylax* se u Europi javlja za vrijeme ranog oligocena na što upućuju fosilni nalazi jedinki sličnih današnjoj vrsti *P. ridibundus* (Holman 1998). Čini se da su se rodovi *Pelophylax* i *Rana* usporedo razvijali jer su iz istog perioda nađeni i fosilni ostaci roda *Rana*, a kasnije, u pliocenu, dolazi do razvoja novih vrsta poput *Rana arvalis* i *Rana temporaria*. U ovom toplom razdoblju dolazi do invazije staništa vrstama *Rana dalmatina* i *P. lessonae*.

Većina fosila zelenih žaba s područja Europe loše je opisana. Zbog velike osteološke sličnosti često dolazi do problema kod identifikacije. Zbog toga se kod determinacije fosilnih ostataka zelenih žaba iz pleistocena često koristi samo naziv *Rana (ridibunda)* sp., što označava da uzorak može biti *R. ridibunda*, *R. lessonae* ili *Rana kl. esculenta*. U Hrvatskoj nalazimo nekoliko fosilnih nalazišta roda *Rana* pleistocenske starosti. Najveće i najpoznatije nalazište pleistocenske herpetofaune Europe nalazi se u špilji Šandalja pokraj Pule (Holman 1998).

Zelene žabe [rod *Pelophylax (Rana)*] su idealna skupina kralježnjaka za proučavanje procesa specijacije jer predstavljaju genetski i filogenetski kompleksnu skupinu (Plötner 2010). Zelene žabe zauzimaju gotovo sva pogodna slatkovodna staništa, ali fiziologija njihove kože ih čini vrlo osjetljivima na suha staništa te izolaciju uzrokovanu nepovoljnim okolišnim uvjetima kao što su morska voda ili pustinje (Beerli i sur. 1996). Kompleksna

geološka povijest tercijara i klimatske oscilacije u doba kvartara oblikovale su danas dobro poznatu distribuciju vrsta i njihovu genetičku varijabilnost (Lymberakis i sur. 2007). Punjenje Mediteranskog bazena na kraju Mesinske krize saliniteta prije otprilike 5,5 – 5,3 milijuna godina, se smatra događajem koji je izolirao određene populacije zelenih žaba (Kreta, Cipar) od onih na kopnu (Anatolija u Turskoj, Peloponez u Grčkoj, Levant) te od onih u Španjolskoj i sjevernoj Africi. Poplavljanje Mediterana nakon Mesinske krize se dogodilo jako brzo te se izolacija populacija zelenih žaba može smatrati sinkroniziranim događajem diljem cijelog Mediteranskog bazena (Akin i sur. 2010). Južni Mediteranski poluotoci (Iberijski, Apeninski i Balkanski) su također bili bitna pribježišta tokom glacijalnih perioda (Hewitt 2000, Taberlet i sur. 1998), iako su nedavno opisani i dodatna pribježišta u središnjoj Europi (Stewart i Lister 2001). Veća genetska raznolikost je primijećena kod populacija južnih pribježišta, a objašnjena je dužim periodima demografske stabilnosti ovih populacija u odnosu na sjeverne koje su bile podložene „učinku uskog grla“ (eng. *bottleneck*) (Hewitt 1996).

1.1.4.2. *Pelophylax* kl. *esculentus* kompleks

Hibridogenetska forma *P. kl. esculentus* potječe od interspecijskog križanja između dvije vrste zelenih žaba: *P. ridibundus* i *P. lessonae*. Roditeljske linije, kao i diploidni hibrid s genomskim sastavom LR (genom jedinke sastavljen od „*lessonae*“ i „*ridibundus*“ setova kromosoma), su široko rasprostranjeni u Europi (Christiansen 2009). Stoga ove tri vrste zelenih žaba tvore jednu od najkompleksnijih skupina vodozemaca i gmazova u Europi, a njihovi međusobni odnosi nisu još u potpunosti poznati. U centralnoj Europi postoje dva odvojena taksona: *P. ridibundus*, *P. lessonae* i hibridogenetska forma *P. kl. esculentus*. *P. ridibundus* i *P. lessonae* se mogu međusobno križati i stvarati hibridne potomke, *Pelophylax* kl. *esculentus*. No, za razliku od većine hibridnih životinja, *P. kl. esculentus* ima mogućnost parenja s jednom od roditeljskih vrsta i stvaranje vijabilnog potomstva (Arnold i Ovenden 2004).

Ovaj neobičan događaj u kojem se hibrid može razmnožavati s jedinkom koja pripada jednoj roditeljskoj vrsti još uvijek je uvelike neistražen. Kao i većina životinja, *P. kl. esculentus* u prvoj generaciji potomaka ima oba seta kromosoma naslijeđena od roditelja. Kod gotovo svih životinja ta dva seta kromosoma bi se izmiješala prilikom gametogeneze, tako da bi svaka gameta sadržavala miješane gene obje roditeljske vrste. No, kod *P. kl. esculentus*, prilikom stvaranja spolnih stanica, jedan set kromosoma se odbaci, tako da spermij ili jajna stanica sadrži set kromosoma samo jedne roditeljske vrste. Na primjer, jajne stanice i spermiji

P. kl. esculentus koja se pari s *P. ridibundus*, sadrže samo kromosome *P. lessonae*. Suprotno tome jajne stanice i spermiji *P. kl. esculentus*, koja se pari s *P. lessonae*, sadrže samo *P. lessonae* kromosome.

Situacija je još složenija jer se neke populacije *P. kl. esculentus* mogu samostalno održavati, pareći se međusobno i stvarajući vijabilno potomstvo, bez prisutnosti ijedne od roditeljskih vrsta. U takvim populacijama, uz normalne, diploidne jedinke *P. kl. esculentus*, mogu nastati triploidne jedinke s tri seta kromosoma. Hibridogenetske forme trebaju određeni službeni naziv pa se stoga koristi uobičajeno, dvoimeno nazivlje. No to nisu prave vrste, budući da nisu neovisne o roditeljskim vrstama, stoga im se ne može davati normalno dvoimeno nazivlje. Umjesto toga, između naziva roda i vrste se ubacuje nastavak „kl.“: *Pelophylax kl. esculentus*. Dodatak „kl.“ označava klepton, riječ izvedenu iz starogrčkog jezika što znači „lopov“. Time se želi opisati kako, hibridogenetske žabe „kradu“ kromosome od drugih vrsta (Arnold i Ovenden 2004). Klepton (Barnard 1984), se smatra taksonomskom kategorijom na razini vrste (Dubois 2010).

Zbog teškoća u određivanju statusa populacija zelenih žaba *P. kl. esculentus* kompleksa pomoću upotrebe klasičnih morfoloških i morfometrijskih metoda, u recentnim istraživanjima koriste se nove tehnologije poput sekvenciranja DNA i analize mikrosatelitne DNA. Istraživanja na brojnim hibridogenetskim populacijama ukazala su na veliku genetsku varijabilnost samog kompleksa, a svaka populacija tvori zasebnu odvojenu evolucijsku jedinicu. Trenutačno se najviše istražuju posljedice prijelaza gena između vrsta (introgresije) i moguće rekombinacije ili razmjene genskog materijala, poput nedavnog prijenosa mitohondrijske DNA iz *P. lessonae* u *P. ridibundus* jedinke preko *P. kl. esculentus* intermedijera, za kojeg se smatra da je prouzročio ekspanziju *P. ridibundus* jedinki u središnjoj Europi (Plötner i sur. 2008).

1.1.5. HIBRIDOGENEZA

1.1.5.1. Općenite značajke hibridizacije i hibridogeneze

Hibridizacija može imati različite evolucijske posljedice (Arnold 1992). Ako su hibridi neprilagođeni uvjetima u staništu, pojačat će se reproduktivne izolacije između hibridizirajućih vrsta poboljšavanjem sposobnosti prepoznavanja i izbjegavanja nepodobnog seksualnog partnera. Zatim, geni se mogu prenositi s jedne roditeljske vrste na drugu putem introgresije. I treće, ukoliko se hibridi mogu prilagoditi nekom okolišu i stvarati potomstvo izolirani od roditeljske vrste, tada dolazi do stvaranja nove vrste hibridnog podrijetla (Christiansen 2009). Važnost hibridizacije pri stvaranju novih vrsta je i dalje temelj rasprava koje su fokusirane na učestalost hibridizacije i fitnes hibridnog potomstva (Bullini 1994, Arnold 1997, Mallet 2005). Ranije se smatralo da je hibridizacija rijetka, da su hibridi lošijeg fitnesa nego roditeljske vrste i da hibridizacija nema evolucijskog značaja (Burke i Arnold 2001). No, iako je većina hibrida neprilagodljiva, njihov fitnes se jako razlikuje, tako da jedan dio hibrida može biti „fit“.

Nove hibridne vrste mogu biti homoploidne ili poliploidne specijacije (Coyne i Orr 2004, Mallet 2007). Do razvoja poliploidne specijacije najvjerojatnije je došlo iz razloga što poliploidija uglavnom daje bolji fitnes jedinkama. Kod homoploidne (diploidne) specijacije, koja je u prirodi najčešća, dolazi do kromosomskih preslagivanja, tako da hibridi mogu stvarati vijabilno potomstvo s roditeljskim vrstama. Kod poliploidije (tetraploidije), broj kromosoma je udvostručen tako da je svaki uparen sa svojom kopijom. Povratno križanje tetraploida s triploidima stvara triploidno potomstvo, koje je obično sterilno ili nevijabilno. Kod hibrida su zabilježena tri načina razmnožavanja: partenogeneza, ginogeneza i hibridogeneza. Kod partenogeneze sve ženke polažu nereducirana jaja iz kojih se razvijaju ženke koje su genetski identične majci. Ginogeneza je sličan princip, ali je potreban spermij da bi se aktivirala dioba i embrionalni razvoj, ali ne i oplodilo jaje. Kod hibridogeneze dolazi do odbacivanja seta kromosoma jedne roditeljske vrste i proizvodnje kloniranih, reduciranih gameta druge roditeljske vrste. Za stvaranje nove generacije hibrida, hibridne jedinke se trebaju pariti s roditeljskom vrstom čiji su set kromosoma odbacile pri stvaranju gameta (Christiansen 2009).

Raznolikost reproduktivnih modela čini hibride interesantnim za proučavanje. Cilj biologa je razumijevanje procesa u evoluciji i specijaciji. Zelena žaba, *Pelophylax* kl.

esculentus, je zanimljiva jer stvara niz različitih reproduktivnih sustava i čak ima dvije hibridogenetske sestrinske vrste (Christiansen 2009).

1.1.5.2. Hibridogeneza roda *Pelophylax*

Kompleks *P. kl. esculentus* se sastoji od dvije roditeljske linije: *P. ridibundus* (genotip RR) i *P. lessonae* (genotip LL) i hibridne vrste *P. kl. esculentus* (genotip RL, Berger 1988, Graf i Polls Pelaz 1989). Nekoliko eksperimenata oplodnje zelenih žaba je proveo Berger (1967) i otkrio neobičnu strategiju razmnožavanja kod *P. kl. esculentus*.

Gametogeneza hibrida *P. kl. esculentus* kompleksa pokazuje geografske varijacije. Stoga ovaj hibridogenetski sustav se može podijeliti na tri velike strategije razmnožavanja (Hoolsbek i Jooris 2009):

L – E sustav: *P. lessonae* – *P. kl. esculentus*

R – E sustav: *P. ridibundus* – *P. kl. esculentus*

E sustav: *P. kl. esculentus* (čiste hibridne populacije)

L – E sustav, koji naseljava Zapadnu Europu, je najčešći i najproučavaniji sustav razmnožavanja. U ovom sustavu razmnožavanja, hibrid, koji je nastao parenjem *P. lessonae* i *P. ridibundus*, naseljava isto područje kao i roditeljska linija *P. lessonae*. Tijekom reprodukcije *P. kl. esculentus*, genom *P. lessonae* se odbacuje i proizvode se gamete koje sadrže samo genom *P. ridibundus* (Slika 1.). Ekskluzija genoma *lessonae* se događa prije same mejoze tijekom produžene faze proliferacije gamete. Isključivanje samog seta kromosoma se događa postepeno, sukcesivnim mitotičkim diobama (Ogielska 1994a). Preostali „*ridibundus*“ genom se potom replicira da bi se uspostavio ponovni diploidni set kromosoma, kako bi se omogućila normalna mejoza u kojoj nastaju haploidne nerekombinirane gamete (Tunner i Heppich – Tunner 1991). Hibridi nastaju u svakoj sljedećoj generaciji povratnim križanjem *P. kl. esculentus* s roditeljskom vrstom *P. lessonae* pri čemu uvijek dolazi do ekskluzije „*lessonae*“ kromosomskog seta kod hibrida. Parenjem tih (RL) hibrida, gotovo uvijek (97% slučajeva), dolazi do nastanka RR punoglavaca koji imaju poteškoće u razvoju te umiru prije nego dosegnu spolnu zrelost. Ovo se događa zbog nakupljanja homozigotnih recesivnih delecijских mutacija na nerekombiniranom *ridibundus* genomu. Eksperimentalno je dokazano da manji broj jedinki (3%) ipak preživi. Preživljavaju

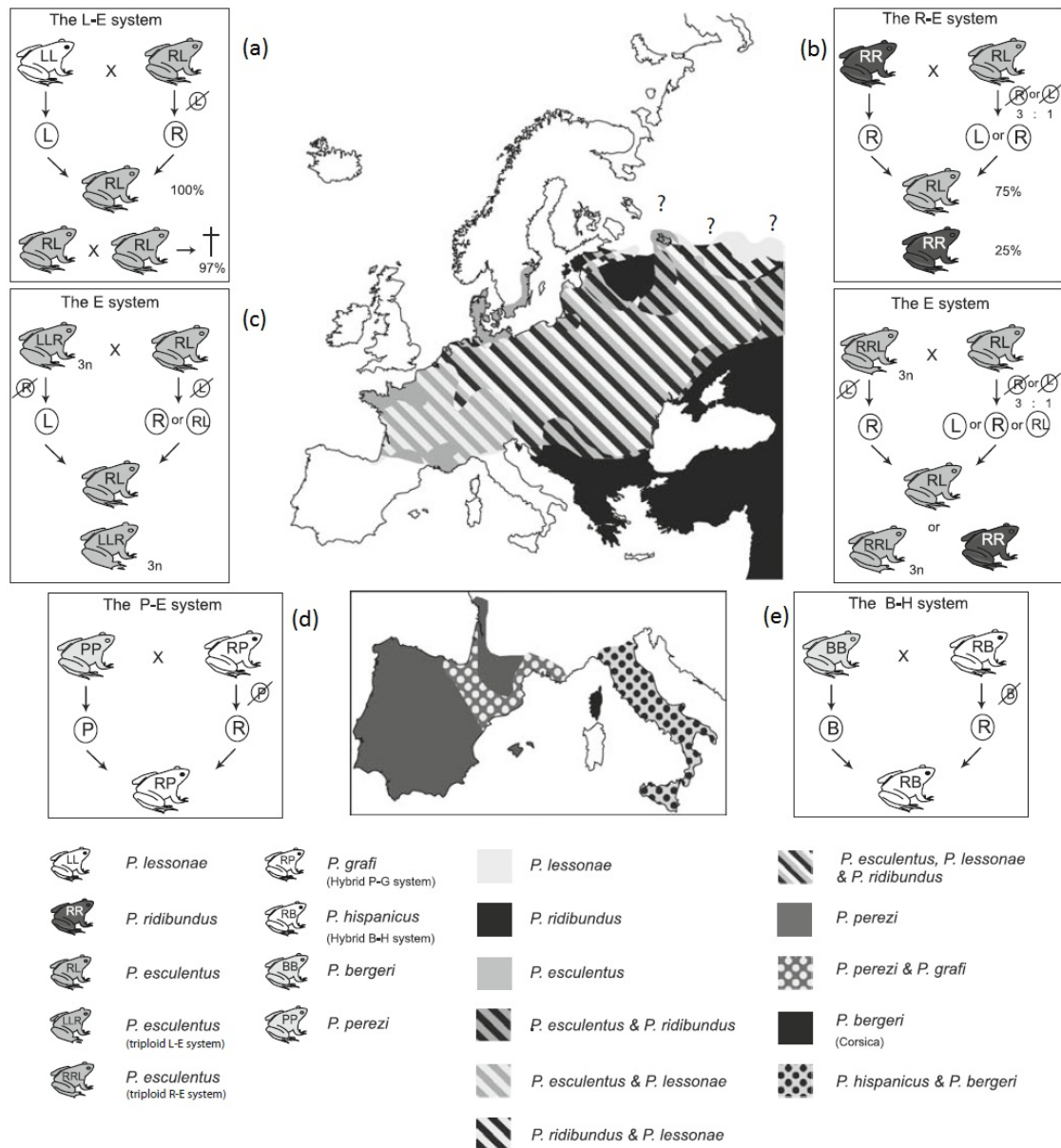
samo ženke za što se pretpostavlja da se događa zbog heterozigotnosti koja smanjuje broj smrtonosnih delecijских mutacija. Naime, rekombinacijom između XX kromosoma kod ženki će smanjiti šanse da dođe do mutacija (Holsbeek i Jooris 2010). Te se *P. ridibundus* ženke zatim mogu pariti s *P. lessonae* mužjacima čime se dobivaju nove hibridne linije. Budući da se križanjem hibridnih jedinki s različitim *P. ridibundus* genomima dobiva vijabilno potomstvo, preživljavanje takvih malih frakcija RR punoglavaca može biti način uvođenja rekombinacije u sustav, te u konačnici povećanja vijabilnosti i fitnesa hibrida (Holsbeek i Jooris 2010). Mitohondrijska DNA (mtDNA) se uvijek nasljeđuje od majke i pokazuje potpunu odvojenost između *P. lessonae* i *P. ridibundus*. Ove vrste imaju strogo odvojene i različite tipove mtDNA: tip A (*P. ridibundus*) i tip B (*P. lessonae*). Stoga, introgresija mitohondrijske DNA je povezana s interspecijskom hibridizacijom čiji su posrednici djelomično fertilni hibridi (Plötner i sur. 2009).

R – E sustav je u principu obrnuti L – E sustav, iako ne u potpunosti. *P. kl. esculentus* odbacuje genom *P. ridibundus* u omjeru 3:1, što dovodi do stvaranja većine gameta *lessonae*, no stvara se i mali dio *ridibundus* gameta. Kada dođe do razmnožavanja hibrida s *ridibundus* gametama, doći će do stvaranja *ridibundus* potomaka, od kojih će sve biti ženke (Slika 1.). Kada dođe do razmnožavanja hibrida s *lessonae* gametama, nastati će *P. kl. esculentus* potomci, koji će svi biti mužjaci (Vinogradov i sur. 1991).

U **E sustavu** pare se samo hibridne populacije. Takve populacije se nalaze u svim L – E i R – E populacijama, ali najistraživanija je ona u Zapadnoj Europi (L – E sustav) (Holsbeek i Jooris 2010). U populacijama s E sustavom, uz LR diploidne jedinke, također postoje triploidne LLR jedinke, koje su preuzele ulogu *P. lessonae* i služe kao izvor njihovih L gameta i RRL koje služe kao izvor R gameta (*ridibundus*) (Christiansen i sur. 2005, Holsbeek i Jooris 2010) (Slika 1.). Nastanak nereduciranih gameta kod diploidnih *P. kl. esculentus*, može se smatrati strategijom kako bi se izbjegla ekstinkcija u nedostatku *P. lessonae* jedinki. Pri stvaranju gameta, kod triploida, dolazi do odbacivanja genoma koji je prisutan samo u jednoj kopiji (kod LLR će se odbaciti R). To rezultira stvaranjem diploidnih tj. nereduciranih gameta. U većini slučajeva, čiste hibridne populacije se sastoje od diploidnih ženki i triploidnih mužjaka (Christiansen i sur. 2005).

Osim *P. kl. esculentus* kompleksa, postoje još najmanje dva u Europi, a to su: *P. kl. hispanicus* (Italija) i *P. kl. grafi* (Španjolska). Talijanski hibrid (*P. kl. hispanicus*) je nastao ancestralnim križanjem *P. ridibundus* i *P. bergeri* (B – H sustav) i razmnožava se povratnim

križanjem s *P. bergeri* (Uzzel i Hotz 1979). Podrijetlo *P. kl. grafi* ostaje nejasno jer se ne zna je li primarno križanje se dogodilo između *P. perezi* i *P. ridibundus* ili *P. perezi* i *P. kl. esculentus* koji je prenio *ridibundus* genom (P – G sustav). U ovom sustavu hibrid *P. kl. grafi* se pari s *P. perezi* pri čemu nastaje *P. kl. grafi* potomak (Slika 1.).



Slika 1. Pregled različitih sustava križanja zelenih žaba (rod *Pelophylax*) u Europi te njihova geografska distribucija. L – E sustav hibridi stvaraju isključivo R gamete, (b) R – E sustav kod kojeg hibridi stvaraju L i R gamete u omjeru 3:1, (c) E sustav čistih hibridnih linija kod kojih se javljaju i triploidi (RRL i LLR), a diploidi mogu proizvoditi nereducirane RL gamete, (d) P – G sustav razmnožavanja hibrida *P. kl. grafi*, (e) B – H sustav razmnožavanja hibrida *P. kl. hispanicus*. Preuzeto i prilagođeno iz Holsbeek i Jooris 2009.

Pravi uzrok i mehanizam ekskluzije kromosoma kod hibridogeneze zelenih žaba, i dalje ostaje nepoznat i temelj rasprava (Holsbeek i Jooris 2010). Neka istraživanja predlažu da su aleli prisutni u *ridibundus* genomu odgovorni za eliminaciju drugog roditeljskog genoma: (1) genom *lessonae* se u većini slučajeva briše, a prenosi se genom *ridibundus* (Vinogradov i sur. 1991), (2) *ridibundus* genom je prisutan u svim hibridogenetskim sustavima i (3) nijedan od interspecijskih hibrida koji su stvoreni bez *ridibundus* kao roditelja, se ne razmnožava hibridogenetski. Ipak postoje slučajevi gdje se *ridibundus* genom briše, a ostaje *lessonae* (Hotz i sur. 1985; Hotz i Uzzel 1983; Uzzel i sur. 1980; Vinogradov i sur. 1991) ili se eliminira bilo koji od dva roditeljska genoma (Vinogradov i sur. 1991). Trenutno postoje dvije hipoteze koje objašnjavaju mogući mehanizam eliminacije genoma: (1) eliminacija kromosoma se zbiva tijekom mitoze, a poduprta je proučavanjem meta-, ana- i telofaza tokom diobe stanice (Ogielska 1994a). (2) eliminacija kromosoma može uključivati enzimatsku degradaciju odbačenog genoma tijekom interfaze. Degradirani kromatin se potom izbacuje iz jezgre u obliku „jezgri sličnih tjelešaca“ (eng. *nucleus – like bodies – NLB*) koji potom izlazi iz jezgre. Ova hipoteza je poduprta pojavom NLBa tijekom apoptoze i smatra se vjerojatnim mehanizmom ekskluzije genoma (Ogielska 1994a, Vinogradov i Chubinishvili 1999).

Pod pretpostavkom da genom *P. ridibundus* nosi alele koji uzrokuju ekskluziju, može se pretpostaviti da postoje dvije grupe jedinki unutar vrste *P. ridibundus*: grupa sa sposobnošću hibridogeneze i nehibridogenetska grupa. Ali, osim sestrinskih vrsta *P. ridibundus* i *P. kurtmulleri* koje čine sestrinsku grupu s vrstama *P. bedrigae* i *P. cerigensis* (Lymberakis i sur. 2007), filogenetska povezanost između *P. ridibundus* jedinki iz srednjoeuropskih, istočnoeuropskih i južnoeuropskih populacija i dalje ostaje nerazjašnjena (Lymberakis i sur. 2007, Plötner 2005).

1.1.6. Pregled očekivanih vrsta i hibrida na području istraživanja

Prema literaturnim podacima (Polović i Čađenović 2014, <http://www.iucnredlist.org/details/58637/0>), na području Crne Gore moguća je prisutnost 4 vrste zelenih žaba: *P. ridibundus*, *P. lessonae*, *P. shqipericus* i *P. kurtmuelleri*. Također u slučaju preklapanja područja distribucije *P. ridibundus* i *P. lessonae* moguć je nastanak hibrida *P. kl. esculentus*. Razlikovna obilježja među navedenim vrstama i područje rasprostranjenosti pojedinih vrsta izloženi su u narednim odlomcima.

1.1.6.1. *Pelophylax ridibundus*

Velika zelena žaba (*P. ridibundus*) (Slika 2.) je najveća autohtona europska žaba koja može doseći veličinu od 15 do 18 cm. Robusne je i zdepaste građe, lagano bradavičava sa šiljatom njuškom. Leđa su joj često zelene ili blago maslinasto zelene boje s crnim pjegama. Zvučni mjehuri mužjaka su najčešće sivo obojeni, a stražnji dio bedra je siv, bijeli ili blijedo maslinast. Stražnje noge su vrlo dugačke što ih čini izrazito dobrim skakačima, a metatarzalna kvržica na stopalu je izrazito mala, veličine do $\frac{1}{4}$ dužine palca stražnje noge, mekana i nakošena (Slika 5.). Jedinke iz središnje i istočne Europe su tamnije s većim udjelom tamnih pjega, dok jedinke s juga više variraju u samom izgledu i nešto su svjetlije boje. Glasaju se naročito u vrijeme parenja u kasno proljeće, a mogu se čuti i ljeti (Arnold i Ovenden 2004).



Slika 2. *Pelophylax ridibundus* (velika zelena žaba). Preuzeto s AmphibiaWeb. (http://calphotos.berkeley.edu/cgi/img_query?enlarge=0000+0000+0708+2163)

P. ridibundus je najrasprostranjenija vrsta zelenih žaba u Europi. Nalazimo je u zapadnoj, središnjoj i istočnoj Europi i rasprostire se istočno sve do Kazahstana. Alohodne populacije mogu se naći u Velikoj Britaniji, Švicarskog, Belgiji, Španjolskoj i u Rusiji (IUCN Red List of Threatened Species, <http://www.iucnredlist.org/details/58705/0>). Jedinke se obično nalaze u većim skupinama. Dnevne su životinje i trajno žive u vodi, plutajući na površini te sunčajući se na obali ili nasipu, iako se jedinke koje žive na jugu mogu naći na određenoj udaljenosti od vode. Mogu se naći u gotovo svim slatkovodnim stajaćicama i sporim tokovima, od malih bara i jaraka pa sve do većih potoka. U slučaju da im se stanište

preklapa sa staništima *P. lessonae* i *P. kl. esculentus* pokazuju tendenciju nastanjivanja većih vodenih površina poput rijeka i jezera. Ova vrsta većinom hibernira u vodi (Arnold i Ovenden 2004).

P. ridibundus se ne smatra ugroženom vrstom. Jedinke pokazuju izrazito veliku otpornost na različita onečišćenja okoliša, posebice vode. Lokalizirano opadanje broja jedinki u populaciji može nastati uslijed dugotrajnih suša ili potpunim gubitkom staništa zbog urbanizacije. Intenzivnim lovom za gastronomske potrebe primijećeno je također značajno smanjenje broja jedinki u populacijama na prostoru Hrvatske (AmphibiaWeb 2012).

1.1.6.2. *Pelophylax lessonae*

P. lessonae (mala zelena žaba) (Slika 3.) također je široko rasprostranjena vrsta čiji se areal djelomično poklapa s arealom simpatrijske vrste *P. ridibundus*. Nalazimo je od Francuske kroz središnju Europu do Rusije (Ural), sjeverno do juga Švedske i južno do Italije i sjevernog Balkana. U Englesku je ponovno naseljena nakon uništavanja prirodnih populacija iste vrste (Arnold i Ovenden 2004).



Slika 3. *Pelophylax lessonae* (mala zelena žaba). Preuzeto s AmphibiaWeb. (http://calphotos.berkeley.edu/cgi/img_query?enlarge=1111+1111+1111+0184)

Odrasli mogu narasti maksimalno do 9 cm dužine. U usporedbi sa velikom zelenom žabom, razlikuju se po veličini, kao što sam naziv kaže. Zvučni mjehuri mužjaka su bjelkasti, dok je stražnji dio bedra žućkasto – narančasto, smeđe boje ili crn. Stražnje noge su nešto

kraće i ne dosežu vrh njuške, a metatarzalna kvržica je velika, tvrdih i oštih rubova, otprilike 2/3 dužine palca stražnje noge (Slika 5.). Njuška je dosta šiljata. Boja je vrlo varijabilna, od pretežito zelenih do gotovo smeđih jedinki. Često je prisutna svjetla pruga na leđima, a dorzolateralni nabori su svijetle boje. Mužjaci za vrijeme parenja mogu poprimiti žućkaste nijanse na glavi i leđima. Općenito, varijacije u samom obojenju i veličini metatarzalne kvržice su izrazito velike. Glasaju se slično kao *P. ridibundus*, ali jasnije i s manje rezonancije (Arnold i Ovenden 2004).

Jedinke nalazimo pokraj plitkih vodenih površina koje se periodički isušuju kao što su plavljena staništa, barice na livadama i na rubnim močvarnim dijelovima miješanih i listopadnih šuma. Povremeno nastanjuje veće lokve i jezera, naročito ako stanište dijeli s vrstom *P. kl. esculentus*. Kao i *P. ridibundus* riječ je o dnevnoj životinji koja voli sunce, ali može biti aktivna po noći. Prezimljava na kopnu (Arnold i Ovenden 2004).

Ne adaptira se dobro na nagle promjene u okolišu, stoga ju ugrožava gubitak staništa uslijed poljoprivrede i urbanizacije, preusmjeravanja vodenih tokova, isušivanja močvarnih područja te unosa predatorskih riba u njena staništa. Dodatno ju ugrožava kompeticija s *P. ridibundus* populacijama na istim staništima. Na području bivše Jugoslavije, i kod ove je vrste primijećeno smanjenje broja jedinki kao posljedice lova (Amphibia Web 2012).

1.1.6.3. *Pelophylax kl. esculentus*

P. kl. esculentus (zelena žaba) (Slika 4.) prethodno se smatrala zasebnom vrstom ili podvrstom. Kasnije je otkriveno kako je riječ o hibridu vrsta *P. lessonae* (genotip LL) i *P. ridibundus* (genotip RR), a pojavljuje se u diploidnom (RL) i dva triploidna oblika (RRL, LLR) (Holsbeek i Jooris 2010). Hibridne populacije se najčešće nalaze na mjestima preklapanja staništa roditeljskih vrsta, odnosno na području zapadne, centralne i istočne Europe, među ostalima i u kontinentalnoj Hrvatskoj, ali zabilježene su i „čiste“ populacije hibrida na Korzici, u Danskoj i na jugu Švedske. U Engleskoj postoje manje kolonije koje su vjerojatno unesene (Arnold i Ovenden 2004).

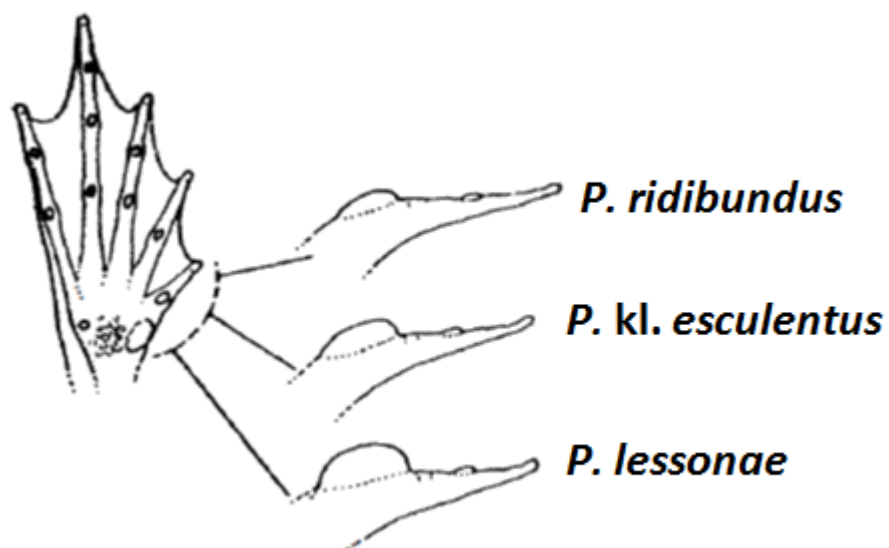


Slika 4. *Pelophylax* kl. *esculentus* (zelena žaba). Preuzeto s AmphibiaWeb. (http://calphotos.berkeley.edu/cgi/img_query?enlarge=1111+1111+1111+0184)

Ženke mogu doseći veličinu do 12 cm dužine, ali su češće manje od toga. Obojenje tijela podsjeća na *P. lessonae*, s bjelkastim zvučnim mjehurima i žućkasta – narančastim ili crnim stražnjim dijelom bedra. Za razliku od *P. lessonae*, *P. kl. esculentus* ima duže stražnje noge koje dosežu vrh njuške, a metatarzalna kvrčica je nešto manja 1/3 do 1/2 dužine palca stražnje noge (Slika 5.). Boja tijela je zelenkasta ili smeđa s tamnijim mrljama. Mužjaci za vrijeme parenja često poprimaju žuto obojenje glave i leđa. Jedinke znaju biti ekstremno varijabilne morfološki, naročito ih je teško razlikovati od *P. lessonae* ako ne postoji veća grupa jedinki za usporedbu. Glasanje je prijelazni zvuk između dviju roditeljskih vrsta (Arnold i Ovenden 2004).

P. kl. esculentus prvenstveno je vezana uz vodena staništa. Kao i roditeljske vrste, dnevne su životinje koje se danju vole sunčati. Prezimljavaju češće na kopnu, ali i u vodi. Unatoč svom engleskom imenu „jestiva žaba“ (eng. *edible frog*), ne koristi se često u prehrani. Druge vrste zelenih i smeđih žaba se češće jedu, ovisno o regiji (Arnold i Ovenden 2004).

Vrsta je osjetljiva na onečišćenja vode agrokemikalijama te na isušivanje močvarnih staništa. Zbog izlova roditeljske vrste *P. lessonae*, kao i samog hibrida, postoji značajno smanjenje njihova broja jedinki u populacijama na području bivše Jugoslavije (AmphibiaWeb 2012).



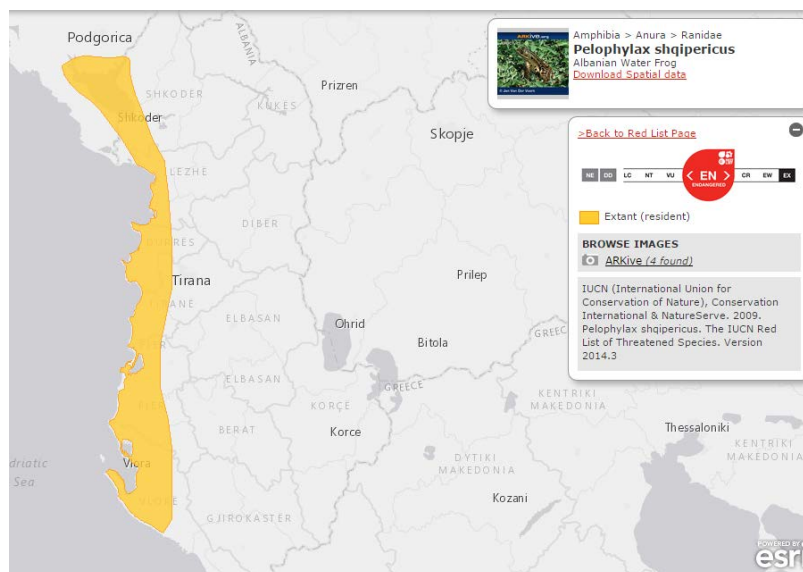
Slika 5. Shematski prikaz metatarzalne kvržice stražnjih nogu kod *P. ridibundus*, *P. kl. esculentus*, *P. lessonae*. Preuzeto iz Arnold i Ovenden 2004.

1.1.6.4. *Pelophylax shqipericus*



Slika 6. *Pelophylax shqipericus* (preuzeto i prilagođeno iz Domeneghetti i sur. 2013)

P. shqipericus (Slika 6.) je endemična vrsta na Balkanu. Nastanjuje močvarna staništa s gustom vegetacijom ispod 500 m nadmorske visine, a može se naći i u sporim rijekama. Glavni uzrok ugroženosti ove vrste je drenaža i zagađivanje vodenih i močvarnih staništa, dok u sjevernim dijelovima areala, što podrazumijeva područje samog Skadarskog jezera, veliku prijetnju uzrokuje prekomjerno izlovljavanje u komercijalne svrhe (Uzzell i Crnobrnja Isailović 2009, Frost 2013). Prema IUCN-ovoj listi *P. shqipericus* ima status ugrožene vrste (EN - Endangered), nalazi se i na Dodatku III Bernske konvencije. Ugroženom se smatra jer je rasprostranjena na području manjem od 5000 km² (Slika 7..). Ne postoje podaci o brojnosti populacije ove vrste, ali smatra se da je u opadanju (Uzzell i Crnobrnja Isailović 2009, Jablonski 2011, Frost 2013). Vrsta *P. shqipericus* je na temelju glasanja, analize alozima i mitohondrijskih DNA sekvenci, morfologije i imunologije, odvojena od vrste *P. lessonae*, iako se smatra da su ove dvije vrste blisko povezane (Uzzell i Crnobrnja Isailović 2009, Frost 2013). Sinsch i Schneider (1996) smatraju da glasanje ove dvije vrste nije drugačije u dovoljnoj mjeri kako bi se na temelju bioakustičnih karakteristika vrsta *P. shqipericus* smatrala zasebnom vrstom. Nedavna istraživanja su pokazala da su vrste *P. lessonae* i *P. shqipericus* jasno odvojene (Pyron i Wiens 2011).



Slika 7. Područje rasprostranjenosti vrste *P. shqipericus*. Preuzeto s IUCN Red List (<http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=587155>)

1.1.6.5. *Pelophylax kurtmuelleri*

P. kurtmuelleri je na IUCN-ovoj listi vrsta čiji je status najmanje zabrinjavajući (eng. *Least Concern* – LC). Takav status je dobila zbog široke rasprostranjenosti i prisutnosti na

različitim staništima. Rasprostranjena je od juga Grčke pa sve do Albanije (Slika 8.). Brojnost populacije joj je trenutno velika i stabilna, ali može doći do ugroženosti prekomjernim izlovljavanjem u komercijalne svrhe (što je slučaj na području Skadarskog jezera) kao i zagađivanjem močvarnih staništa (Uzzell i sur. 2009). Vrsta *P. kurtmuelleri* je od vrste *P. ridibundus* odvojena na temelju akustičnih razlika tijekom razdoblja parenja (Džukić i sur. 2003). Također su utvrđene razlike između te dvije vrste na temelju multivarijantnih morfometrijskih istraživanja (Džukić i sur. 2003). Međutim, status *P. kurtmuelleri* je još uvijek predmet rasprava. Smatra se da ne postoji genetska razlika između *P. ridibundus* i *P. kurtmuelleri* i da je stoga status ove vrste upitan (Crochet i Dubois 2004). Stoga je i dalje mnogi autori često svrstavaju pod *P. ridibundus* kao npr. Jablonski (2011).



Slika 8. Područje rasprostranjenosti *P. kurtmuelleri*. Preuzeto s IUCN Red List (<http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=58637>)

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Odrediti koje su vrste zelenih žaba roda *Pelophylax* prisutne na području Skadarskog jezera (Crna Gora), koristeći mitohondrijske (gen za NADH podjedinicu 3 - ND3) i jezgrine biljege (serum albumin gen intronska 1 regija).

Utvrđiti dolazi li do hibridizacije među vrstama zelenih žaba roda *Pelophylax* prisutnih na Skadarskom jezeru (Crna Gora) i u slučaju postojanja hibrida, utvrđiti jesu li ti hibridi fertilni ili sterilni.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. PODRUČJE ISTRAŽIVANJA

Uzorkovanje je izvršeno na području Nacionalnog parka Skadarsko jezero u Crnoj Gori (Slika 9.). Ono predstavlja jedinstven primjer dobro očuvanih slatkovodnih ekosustava u jugoistočnoj Europi kao i velike bioraznolikosti, a uključuje brojne endemične i reliktnne vrste flore i faune (Radović i sur. 2007, Radović i sur. 2008).

Skadarsko jezero smješteno je u Zetsko – Skadarskoj kotlini, a rijekom Bojanom je povezano s Jadranskim morem. Zauzima površinu od 354 km² do maksimalno 530 km² što ga čini najvećim jezerom na Balkanu. Crnoj Gori pripada 110,5 km obale, a Albaniji 57,5 km. Crnogorski dio Jezera s priobaljem, površine 40 000 ha, proglašen je Nacionalnim parkom 1983. godine, a albanski dio 2005. godine (Radović i sur. 2007, Radović i sur. 2008, Gregović i Mrdak 2011–2015).



Slika 9. Skadarsko jezero i područja uzorkovanja zelenih žaba (žute točke). Preuzeto iz Vološen 2014.

Kao značajno stanište vodenih ptica, 812 ha površine Nacionalnog parka ima status trajno zaštićenog ornitološkog rezervata. Skadarsko jezero je 1995. godine upisano na Popis močvarnih područja od međunarodnog značaja za stanište vodenih ptica (Ramsarska konvencija) i zaštićen je kao Ramsarsko područje. Udruga europskih herpetologa (SHE) je uvrstila jezero u „Jadranski trokut“ što predstavlja područje koje je prioritet za daljnja istraživanja. Jezero je sastavni dio Mediteranskog bazena koje je predstavljeno kao jedna od 25 vrućih točaka bioraznolikosti (Radović i sur. 2008, Gregović i Mrdak 2011–2015).

Skadarskom jezeru najveću količinu vode daje rijeka Morača sa svojim pritokama (više od 62%). Jezero gubi oko 20% vode isparavanjem koje je osobito veliko u ljetnim mjesecima, dok preostalih 80% otječe rijekom Bojanom. Skadarsko jezero je kriptodepresija, što znači da se neki dijelovi njegovog dna nalaze ispod nivoa mora. Takva mjesta nazvana su sublakuistrijski izvori ili oka i mogu biti do 60 m dubine dok je prosječna dubina jezera oko 5 m (Gregović i Mrdak 2011–2015). Sublakuistrijski izvori ili oka predstavljaju trajne podvodne izvore, čija je temperatura vode u svako godišnje doba gotovo jednaka (Đurović i sur. 1969). Skadarsko jezero se nalazi na prijelaznom prostoru između subtropsko – sredozemne i umjereno – kontinentalne klime. Slivno područje Skadarskog jezera ima Jadransko – sredozemno – subtropsku klimu, s određenim promjenama u temperaturi i padalinama koje su uvjetovane razvijenim reljefom. Područje Skadarskog jezera odlikuje se dugim sušnim i vrućim ljetima. Zime su kišovite i nešto hladnije u odnosu na primorje. Srednja godišnja količina padalina je oko 2230 mm po četvornom metru. U jugozapadnim dijelovima jezera i više, oko 3200 mm po četvornom metru, dok je u sjevernim dijelovima količina padalina oko 1750 mm po četvornom metru. Srednja godišnja temperatura zraka kreće se od 14°C do 15°C, s temperaturnim maksimumom u srpnju (25,7°C) i minimumom u siječnju (4,2°C). Jesenski dani počinju od kraja studenog, a proljetni traju sve do svibnja. Vjetrovi koji pušu na ovom području su bura, sjevernjak, jugo, danik i noćnik, a ima ih prosječno 30 do 40 dana u godini (Radović i sur. 2007, Gregović i Mrdak 2011–2015).

3.2. MATERIJALI

3.2.6. Životinjski materijal

Uzorci tkiva zelenih žaba je sakupila Bjanka Prkljačić u suradnji s Hrvatskim herpetološkim društvom „Hyla“ u sklopu izrade magistarskog rada u razdoblju od 1.6.2011. do 1.10.2012. godine na području Skadarskog jezera, Crna Gora. Pri uzimanju uzoraka, jedinke su na terenu bile morfološki determinirane korištenjem dostupne literature (Uzzel i

Crnobrnja Isailović 2009, Jablonski 2011). Svakom uzorku je dodijeljena pripadajuća oznaka s kodom uzorka, datumom i mjestom kada je uzorkovanje te imenom determinirane vrste. Svi ti podaci su bili upisani u Microsoft Excel tablicu. Uzorci su konzervirani u 70% – tnom etilnom alkoholu. Mikroeprevete sa 101 uzorkom su poslone iz Crne Gore i spremljene u hladnjak na +4 °C na Biološkom odsjeku Prirodoslovno – matematičkog fakulteta u Zagrebu.

3.2.7. Kemikalije i pribor

U nastavku teksta navedene su kemikalije, osnovni i tehnički pribor korišteni u laboratoriju za izvođenje ovog istraživanja.

Izolacijski kitovi:

Quiagen QIAamp DNA Mini kit (50)

Sigma Aldrich GenElute MAMMALIAN GENOMIC DNA PREP (70)

PCR kit:

QIAGEN TopTaq Master Mix (250)

Elektroforetski standardi:

Quick–Load 1kb DNA ladder (New England BioLabs Inc., UK)

Quick–Load 100bp DNA ladder (New England BioLabs Inc., UK)

Oligonukleotidne početnice:

Pel–SA–F1

Pel–SA–F2

ND3L

ND3H

Etanol

Etidij – bromid

Agaroz

TE pH 8.0

10 mM Tris

1 mM EDTA

TAE pH 8.0

40 mM Tris – acetat (TE)

1 mM EDTA

Tris – acetat (TE)

Etilendiamintetraoctena kiselina – EDTA

Osnovni materijal:

Mikropravete 1.5 mL, mikropravete 2 mL

PCR mikropravete 0.2 mL

Poklopci za PCR 0.2 mL mikropravete

Nastavci za mikropipete 10 μ L, 200 μ L, 1000 μ L

Zaštitne rukavice

Tehnički pribor:

Centrifuga

Digitalni fotoaparati

Kadice za elektroforezu

Kadice za pripremu agaroznih gelova

Mikrovalna pećnica

Mikropipete

Nanodrop spektrofotometar

PCR uređaj

Transiluminator

Vodene kupelji

Vorteks mješalica

Zamrzivač i hladnjak

3.3. METODE

3.3.6. Izolacija DNA

Izolaciju DNA iz prikupljenih uzoraka tkiva napravljena sam u laboratoriju na Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka PMF-a. Ukupnu genomska DNA sam izolirao pomoću dva kita: Quiagen QIAamp DNA Mini kit (50) i Sigma Aldrich GenElute Mammalian Genomic DNA Prep (70) prema uputama proizvođača svakog kita, uz prekonoćnu inkubaciju u vodenoj kupelji s dodanom proteinazom K u svakom uzorku. Konačna količina produkta je bila 200 μ L. Koncentraciju DNA u izolatu sam provjerio pomoću Nanodrop spektrofotometra na Zavodu za botaniku Biološkog odsjeka PMF-a u laboratoriju prof. dr. sc. Zlatka Libera. Potom su uzorci spremljeni u zamrzivač na -20°C do daljnje upotrebe.

3.3.7. Lančana reakcija polimerazom

Lančana reakcija polimerazom (eng. *Polymerase Chain Reaction* – PCR) je metoda u molekularnoj biologiji koja se koristi kako bi se iz jedne ili nekoliko molekula DNA umnožio velik broj kopija (nekoliko redova veličine više od početnog broja). Ova metodu sam koristio za umnožavanje DNA fragmenata mitohondrijskog gena (ND3), veličine 340 parova baza (pb), i jezgrinog biljega (serum albumin gen intron-1), čija veličina varira od vrste do vrste unutar roda *Pelophylax* (od 298 pb kod *P. lessonae* do 843 pb kod *P. ridibundus*) (Tablica 1.). Za umnožavanje ND3 biljega koristio sam početnice ND3L (5'-TTGAGCCGAAATCAACTGTC-3') i ND3H (5'-AGTACACGTGACTTCCAATC-3') (Akin, Bilgin i Beerli 2010) dok sam za umnažanje serum albumin gen intronske 1 regije koristio početnice Pel-SA-F1 (5'-TCCATACAAATGTGCTAAGTAGGTT-3') i Pel-SA-R2 (5'-GACGGTAAGGGGACATAATTCA-3') (Hauswaldt i sur. 2012).

Tablica 1. Očekivane veličine PCR produkta serum albumin gen intronske 1 regije različitih vrsta roda *Pelophylax* dobivenih korištenjem početnica Pel-SA-F1 i Pel-SA-R2 (preuzeto i prilagođeno iz Hauswaldt i sur. 2012)

Vrsta	GenBank broj	Veličina PCR produkta (pb)
<i>P. ridibundus</i>	FN432363–5, FN432371	839–843
<i>P. kurtmuelleri</i>	FN432366–67	717
<i>P. bedrigae</i>	FN432368	841

Tablica 1. Nastavak sa stranice 28.

<i>P. cf. bedrigae</i>	FN432372–73	839–840
<i>P. epeiroticus</i>	FN432369–70	838
<i>P. cretensis</i>	FN432376	847
<i>P. cretensis</i>	FN432374–75	828
<i>P. perezi</i>	FN432377	853
<i>P. saharicus</i>	FN432379–80	845–849
<i>P. nigromaculatus</i>	FN432386	379
<i>P. lessonae</i>	FN432383–85	306
<i>P. lessonae (bergeri)</i>	FN432368	298

Početnice su morale biti pripremljene za korištenje u lančanoj reakciji polimerazom. Izvorne (eng. *stock*) otopine koje smo naručili od proizvođača, bile su u mikroepruvetama kao 100 mmol otopine. Za reakcije su bile potrebne 10 mmol otopine početnica koje smo pripremili razrjeđivanjem izvorne otopine 10 puta s Milli-Q H₂O. Nakon vorteksiranja, otopina početnica je spremljena u hladnjak na –20°C do pripreme lančane reakcije polimerazom.

Za lančanu reakciju polimerazom, koristili smo QIAGEN TopTaq Master Mix (250) kit (Hilden, Njemačka). Komplet sadrži sve potrebne kemikalije za izvođenje lančane reakcije polimerazom.

QIAGEN TopTaq Master Mix Kit:

TopTaq Master Mix, 2x

CoralLoad concetrate, 10x

RNase–Free water

Umnožavanje fragmenata lančanom reakcijom polimerazom je izvršeno u reakcijskoj smjesi volumena 10 µL za oba biljega. U pojedinoj reakcijskoj smjesi koristili smo sljedeće volumeni kemikalija: 5 µL TopTaq Master Mix 2x, 1 µL CoralLoad 10x, 2.52 µL vode (eng. *RNase free water*), 0.24 µL svake početnice (10 mM) iz para početnica za pojedini biljeg, te po 1 µL izolirane ukupne genomske DNA. Reakcijska smjesa negativne kontrole je pripremljena na jednak način i s jednakim volumenima kemikalija, no nije sadržavala DNA

uzorak. Negativna kontrola služi kao provjera čistoće reakcijske smjese i upućuje na eventualne nečistoće početnica ili kontaminaciju kemikalija ili pribora kojim se pripremala lančana reakcija polimerazom.

Uvjeti umnožavanja fragmenata DNA lančanom reakcijom polimerazom, koji se odnose na trajanje i temperature pojedinih ciklusa, razlikuje se za mitohondrijski ND3 biljeg i za serum albumin intron-1 (Tablica 2.).

Tablica 2. Prikaz vremena trajanja i temperature pojedinog ciklusa lančane reakcije polimerazom pri umnožavanju mitohondrijskog gena za NADH podjedinicu 3 (ND3) i serum albumin gen intronske 1 regije (PD – preddenaturacija, D – denaturacija, A – sljepljivanje početnica, S – sinteza, FS – završna sinteza, H – „hold“, održavanje smjese na završnoj temperaturi)

PCR korak	ND3		Serum albumin gen intron-1	
PD	94°C	1 min	94°C	90 sek.
D	94°C	30 sek.	94°C	30 sek.
A	62°C	20 sek.	59°C	40 sek.
S	72°C	60 sek.	72°C	100 sek.
	35 ciklusa		35 ciklusa	
FS	72°C	7 min.	72°C	10 min.
H	10°C	∞	10°C	∞

Na kraju programa, na uređaju je odabrana opcija „hold“ koja je hladila uzorke na 10°C nakon završene lančane reakcije polimerazom. Hlađenje uzoraka sprječava degradaciju novosintetiziranih molekula DNA egzonukleaznom aktivnošću polimeraze.

3.3.8. Kloniranje

U svrhu dobivanja pojedinih alela i dobivanja čistih sekvenci, provedeno je molekularno kloniranje pomoću komercijalnog kompleta pGEM[®]-T Easy Vector System (Promega). pGEM[®]-T je plazmid koji sadrži gen za rezistenciju na ampicilin i laktozni operon, te u kompletu dolazi već pocijepan na mjestu unutar *lacZ* gena gdje bi se trebao ugraditi odsječak DNA koji se želi klonirati (insert). Ove osobine su korištene za kontrolu ulaska plazmida u bakterijske stanice, odnosno za kontrolu ugradnje inserta u plazmid. Ako su bakterijske stanice primile plazmid onda su mogle rasti na LB podlozi s ampicilinom. Nadalje, ako se u plazmide ugradio insert, *lacZ* gen je bio inaktiviran, dok ako se plazmid zatvorio bez ugradnje inserta, *lacZ* gen je postao aktivan. Dodavanjem X-Gal-a kao supstrata β-

galaktozidaze, te IPTG-a kao induktora laktoznog operona u podlogu, kolonije bakterija koje sadrže insert su bile bijele boje, dok su kolonije koje sadrže plazmid bez inserta bile plave boje. Za potrebe izrade ovog diplomskog rada klonirano je ukupno 12 različitih uzoraka na lokusu DQA i 14 različitih uzoraka na lokusu DQB.

Prije samog postupka molekularnog kloniranja provedeno je pročišćavanje PCR proizvoda pomoću komercijalnog kompleta Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System. Nakon PCR reakcije u epruvete sa umnoženom DNA odpipetiran je jednaki volumen otopine za vezanje na membranu (Membrane Binding Solution). Pripremljene su čiste epruvete za sakupljanje od 2 mL i u njih su stavljene kolone za pročišćavanje (Spin Column). U kolone je odpipetirana otopina sa umnoženom DNA, pa je sve inkubirano 1 min na sobnoj temperaturi, a potom centrifugirano 1 min na 14.000 rpm. Nakon centrifugiranja tekućina je odlivena, u kolone je dodano 750 µl otopine za ispiranje (Wash Solution), te je sve centrifugirano 1 min na 14.000 rpm. Tekućina je ponovno odlivena, u kolone je dodano 500 µl otopine za ispiranje, pa je sve centrifugirano 5 min na 14.000 rpm. Zatim je ponovno izbačena tekućina, pa su epruvete sa kolonama centrifugirane 1 min na 14.000 rpm sa otklopljenom centrifugom da ispari zaostale tekućina. Kolone su tada prebačene u čiste epruvete od 1,5 ml, u njih je dodano 20 µl vode bez nukleaza (Nuclease-Free Water) i sve je centrifugirano 1 min na 14.000 rpm. Elektroforezom je provjerena prisutnost DNA u završnoj otopini.

Prvi dan postupka molekularnog kloniranja je rađena ligacijska reakcija. Prvo je insert (egzon 2 DQA ili DQB lokusa MHC) umnožen pomoću PCR-a. Zatim je elektroforezom provjereno je li dobiven PCR proizvod, a nakon toga je rađeno pročišćavanje PCR proizvoda (poglavlje 2.6.1.). Da bi ligacijska reakcija uspjela potrebno je utvrditi koliko se PCR proizvoda dodaje u reakcijsku smjesu. Dozvoljeni omjeri inserta i vektora su od 8/1 do 1/8. Zbog toga, nakon pročišćavanja, elektroforezom PCR proizvoda i otopine DNA poznatih koncentracija, te njihovom usporedbom jačine osvjetljenja pod UV svjetlom određena je približna koncentracija DNA u PCR proizvodu. Da bi se odredilo koliko se PCR proizvoda dodaje u ligacijsku smjesu korištena je jednadžba:

$$\frac{\text{masa vektora (ng)} * \text{duljina odsječka (kb)}}{\text{duljina vektora (kb)}} * \frac{\text{insert}}{\text{vektor}} \text{ molarni omjer} = \text{masa inserta (ng)}$$

Prema protokolu preporučeni molarni omjer iznosi 3/1. Nakon određivanja potrebnog volumena PCR proizvoda za ligacijsku reakciju, pripremljena je ligacijska smjesa. U epruvetu

od 0,2 mL odpipetirano je 5 μ l pufera za brzu ligaciju (Rapid Ligation Buffer), 1 μ l pGEM[®]-T plazmida, 1 μ l T4 DNA ligaze, pročišćeni PCR proizvod i vode do ukupnog volumena smjese od 10 μ l. Za negativnu kontrolu je u zasebnoj epruveti pripremljena ista smjesa, ali bez PCR proizvoda, a za pozitivnu kontrolu se u smjesu umjesto PCR proizvoda dodaje 2 μ l kontrolnog inserta. Tako pripremljene ligacijske smjese ostavljene su preko noći na 4 °C.

Drugog dana rađena je transformacija bakterija ligacijskom smjesom. U tu svrhu korištene su JM109 visoko kompetentne bakterije *Escherichia coli*. Za svaku ligacijsku reakciju pripremljene su po dvije petrijeve zdjelice sa 30 mL krute hranjive podloge za rast bakterija. Za hranjivu podlogu korišten je LB medij sljedećeg sastava: 1 L vode, 10 g Bacto[®]-trypton-a, 5 g Bacto[®]-yeast extract-a, 5 g NaCl, 15 g agara i NaOH do konačne pH vrijednosti od 7,0. Prije izlijevanja u petrijeve zdjelice medij je autoklaviran, te je u njega dodan ampicilin do konačne koncentracije 100 μ l/ml. U svaku tako pripremljenu petrijevu zdjelicu, povrhu hranjivog medija dodana je smjesa 100 μ l 100 mM IPTG-a i 20 μ l X-Gal-a koncentracije 50 mg/ml, te su zdjelice ostavljene 30 minuta na 37°C da se smjesa upije u podlogu. Epruvete s ligacijskom smjesom od prethodnog dana su kratko centrifugirane, te je po 2 μ l ligacijske smjese prebačeno u nove sterilne 1,5 ml eppendorf epruvete. Epruvete sa bakterijskim stanicama, koje su prethodno skladištene u ledištu na -20°C, su stavljene 5 min u ledenu kupelj da se otope. Nakon laganog miješanja bakterija, otpipetirano je po 50 μ l u epruvete s ligacijskom smjesom. Da bi bakterije primile plazmide, epruvete sa smjesom su lagano promiješane, stavljene 20 min na led, zatim 45 sekundi u vodenu kupelj na 42°C, te ponovno na led 2 min. Zatim je u epruvete dodano 800 μ l tekućeg LB medija, pa su inkubirane 1,5 sati na 37°C uz miješanje od 300 rpm. Tekući LB medij je pripremljen na isti način kao i prethodno opisani kruti, samo bez agara. Nakon inkubacije iz svake reakcije je otpipetirano 100 μ l na po dvije prethodno pripremljene LB/ampicilin/IPTG/X-Gal petrijeve zdjelice, pa su sve zdjelice inkubirane 24 sata na 37°C.

Sljedeći dan za svaki je uzorak označeno po 10 epruveta od 15 ml, te je u njih odpipetirano 5 ml tekućeg LB medija. Petrijeve zdjelice su izvađene iz inkubatora, te su u epruvete sa svježim medijem prenešene bijele kolonije bakterija, jedna kolonija po epruveti. Epruvete su zatim inkubirane preko noći na 37°C uz lagano miješanje. Na ovaj način je višestruko umnožen broj bakterija koje sadrže plazmide sa specifičnim insertima. Sutradan je provedena izolacija plazmida iz bakterija i njihovo pročišćavanje.

Izolacija plazmida iz bakterija i njihovo pročišćavanje je rađeno pomoću komercijalnog kompleta Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System. U prvom

koraku epruvete koje sadrže bakterije su centrifugirane 5 min na 2.000 rpm. Supernatant je odličen, a talog je resuspendiran u 250 µl otopine za resuspendiranje stanica (Cell Resuspension Solution). Nakon toga suspenzija stanica je pipetom prebačena iz velikih epruveta u male epruvete od 1,5 ml. Potom je u svaku epruvetu dodano 250 µl otopine za lizu stanica (Cell Lysis Solution), te je sadržaj epruveta promiješan preokretanjem četiri puta. Zatim je u epruvete dodano 10 µl otopine alkalne proteaze (Alkaline Protease Solution), ponovno su preokrenute četiri puta i ostavljene 5 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga im je dodano 350 µl otopine za neutralizaciju (Neutralization Solution), pa su preokrenute četiri puta i centrifugirane 10 minuta na 14.000 rpm. Za vrijeme centrifugiranja pripremljene su čiste epruvete za sakupljanje od 2 mL i u njih su stavljene kolone za pročišćavanje (Spin Column). Nakon centrifugiranja supernatant je preličen u kolone za pročišćavanje, a talog odbačen. Epruvete s kolonama su tada ponovo centrifugirane 1 min na 14.000 rpm. Tekućina iz epruveta je odličena, kolone vraćene, pa je u njih dodano 750 µl otopine za ispiranje (Wash Solution). Sve je centrifugirano 1 min na 14.000 rpm. Opet je izbačena tekućina iz epruveta, kolone vraćene i u njih dodano 250 µl otopine za ispiranje, te je sve ponovno centrifugirano 2 min na 14.000 rpm. Nakon toga su epruvete s tekućinom bačene, a kolone prebačene u čiste epruvete od 1,5 ml. U kolone je dodano 50 µl vode bez nukleaza (Nuclease-Free Water), pa je sve centrifugirano 1 min na 14.000 rpm. Kolone su potom bačene, a otopina pročišćene DNA spremljena u hladnjak na 4 °C. Nakon pročišćavanja, prisutnost DNA molekula u konačnoj otopini provjerena je elektroforezom.

3.3.9. Elektroforeza

Gel elektroforeza je metoda razdvajanja molekula na temelju naboja ili molekulske mase. U ovom slučaju DNA fragmenti su razdvajani prema njihovoj duljini. DNA fragmenti negativnog naboja se nakon uključivanja električnog polja kreću prema elektrodi pozitivnog naboja. Pokretljivost DNA molekule kroz agarozni matriks obrnuto je proporcionalna logaritmu njene mase, što znači da manje molekule putuju brže.

Provjera uspješnosti lančane reakcije polimerazom smo provjerili na 1,5%–tnom agaroznom gelu, pripremljenom otapanjem agaroze u 1xTAE puferu. Za određivanje veličine fragmenata koristili smo elektroforetske standarde Quick-Load 100kb i 1kb DNA ladder kojih je dodano 5 µL u početnu jažicu gela. Potom sam u svaku jažicu na gelu dodao 3 – 5 µL uzorka, koji nisu miješani s elektroforetskom bojom, jer je u PCR smjesu dodan CoralLoad 10x. Elektroforeza je provedena u TAE puferu na 100 V, u trajanju 50 minuta. Nakon elektroforeze, gel sam stavio u vodenu otopinu etidij – bromida, u kojem je stajao 15 – 20

minuta. Etidij – bromid je interkalirajući spoj, koji se koristi za fluorescentno obilježavanje molekula DNA. Izložen UV svjetlu, fluorescira, svijetleći narančasto, a intezitet mu se povećava čak i do 20 puta kada se veže na molekulu DNA. Nakon bojanja u etidij – bromidu, gel je stavljen u UV transiluminator i fotografiran. Nakon fotografiranja, gel je pažljivo odložen u poseban otpad onečišćen etidij – bromidom, sve kontaminirane površine očišćene, a slike spremljene za daljnju analizu. Uzorci su spremljeni u hladnjak na -20°C do daljnjeg korištenja.

3.3.10. Sekvenciranje

Nakon što je pomoću gel elektroforeze provjerene uspješnost lančane reakcije polimerazom, uzorke smo poslali u tvrtku Macrogen Corporation (Amsterdam, Nizozemska) radi sekvenciranja pomoću servisa „EZ–Bag“. Uzorci PCR reakcija pripremili smo tako da se 5 μL uzorka pomiješalo s 5 μL 10 mmol odgovarajuće početnice. Fragmenti DNA su sekvencirani u oba smjeru upotrebom početnica korištenih u PCR reakciji. Kromatogrami nukleotidnih sljedova zatim su analizirani u programu BioEdit verzija 7.0.9.0 (Hall 1999) da se provjerila njihova kvaliteta i da se ispravila moguća kriva očitavanja automatskog uređaja za sekvenciranje. Pregledane sekvence su zatim izvezene u fasta format.

3.3.11. Analiza sekvenci

Dobivene sekvence smo međusobno usporedili kako bi se izdvojili jedinstveni haplotipovi tj. sekvence koje se u potpunosti poklapaju u redoslijedu nukleotida te smo naznačili koji uzorci pripadaju određenom jedinstvenom haplotipu.

Sekvence jedinstvenih haplotipova u fasta formatu smo učitali u programski paket MEGA 6.06 (Tamura i sur. 2013) kako bi se BLAST (eng. *Basic Local Alignment Search Tool*) pretragom pronašli njima najbližije ili čak istovjetne sekvence u GenBank bazi (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>). U slučaju pojave istovjetne sekvence u novo analiziranom uzorku i u GenBank-u, moguće je napraviti molekularno „određivanje“ vrste u novom uzorku prema određivanju vrste u originalnom radu autora koji su prijavili GenBank sekvencu.

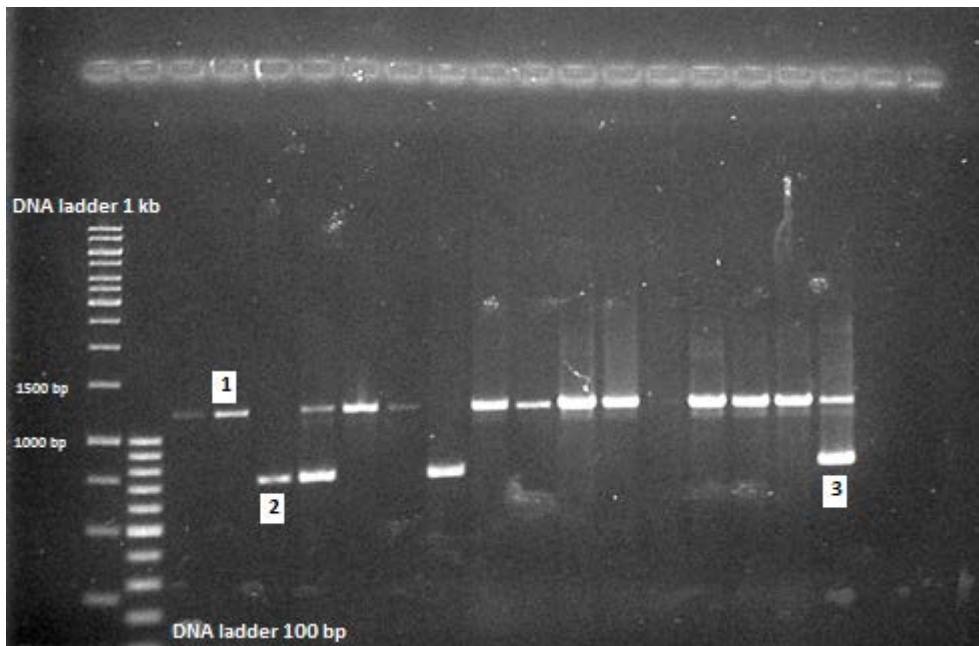
Sve sekvence jedinstvenih haplotipova smo zatim odjednom učitali u MEGA-u, posebno za svaki molekularni biljeg. Sekvence smo zatim sravnili upotrebom MUSCLE (Edgar 2004) programa u MEGA-i kako bi se mogla napraviti analiza filogenetske rekonstrukcije. Koristeći MEGA-u, izradili smo pojedinačna filogenetska drvca za oba

molekularna biljega. U analizu filogenetske rekonstrukcije smo uključili sve dostupne haplotipove iz GenBank-a koji se odnose na zelene žabe. Prije pokretanja filogenetske rekonstrukcije, odredili smo evolucijski model za date setove sekvenci. Filogenetska rekonstrukciju smo napravili pomoću statističke metode najveće vjerojatnosti (eng. *Maximum Likelihood*). Procjena statističke vjerodostojnosti filogenetskih odnosa na dobivenom drvcu smo provjerili pomoću metode samoučitanja (eng. *bootstrap*) sa 100 replikata.

4. REZULTATI

4.1. Analiza PCR produkata serum albumin gen intronske 1 regije na agaroznom gelu

U analizi duljine serum albumin gen intronske 1 regije na agaroznom gelu zabilježene su dvije duljine fragmenata s veličinama oko 720 pb i preko 1200 pb. Također, za nekoliko uzoraka se potvrdilo da pripadaju hibridnim jedinkama budući da se kod takvih uzoraka zabilježilo pojavljivanje kombinacije fragmenata obje duljine (Slika 10.). Prema dobivenim duljinama fragmenata, u uzorku nisu utvrđene vrste *P. ridibundus* (839 – 843 pb), *P. lessonae* (306 pb), *P. kl. esculentus* (kombinacija *P. ridibundus* i *P. lessonae* fragmenata) i *P. epeiroticus* (838 pb). Utvrđeno je da duljina kraćeg fragmenta odgovara vrsti *P. kurtmuelleri* (717 pb, Tablica 1.), dok vrsta s duljim fragmentom (preko 1200 pb) nije mogla biti determinirana ovom metodom zbog duljine koja fragmenta koja nije zabilježena u radu gdje je metoda opisana (Hauswaldt i sur. 2012, Tablica 1.). Prema ovoj metodi, utvrđeno je da od ukupno 101 uzorka, 43 jedinke pripadaju vrsti *P. kurtmuelleri*, 39 nepoznatoj vrsti te da 5 uzoraka čine hibridne jedinke. Produkta nije bilo u 14 uzoraka (Tablica 3.).



Slika 10. Prikaz PCR produkata serum albumin gen intronske 1 regije na agaroznom gelu nakon elektroforeze. Kraći fragment pripada vrsti *P. kurtmuelleri* (2), duži fragment pripada nepoznatoj vrsti (1). Kombinacija različitih duljina fragmenata ukazuje na hibrid između tih dviju vrsta (3).

4.2. Analiza sekvenci serum albumin gen intronske 1 regije

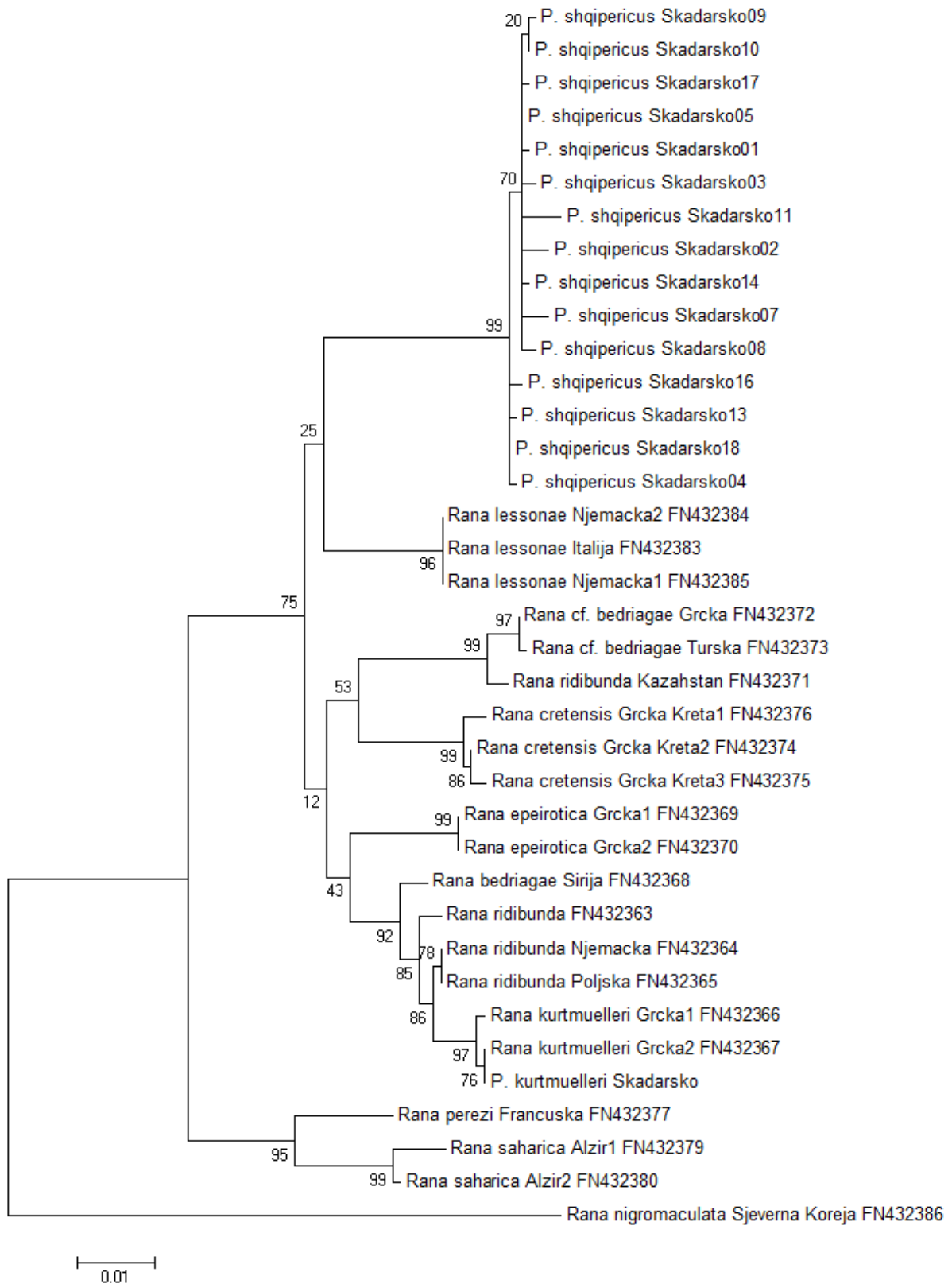
Zbog nemogućnosti determinacije jedne od vrsta u uzorku prema prethodnoj analizi na agaroznom gelu, pristupilo se analizama tih sekvenci serum albumin gen intronske 1 regije. Odabrano su 2 uzorka kojima u analizi na agaroznom gelu nije utvrđena pripadnost određenoj vrsti (uzorci sa šiframa 761 i 763) te 8 uzoraka vrste *P. kurtmuelleri* (uzorci sa šiframa 738, 739, 743, 758, 802, 804, 805, 809).

Sekvence uzoraka vrste *P. kurtmuelleri* su uspješno dobivene i utvrđeno je da sve pripadaju istom jedinstvenom haplotipu. Dobiveni jedinstveni haplotip je zatim analiziran BLAST pretragom te je utvrđeno njegovo potpuno preklapanje sa sekvencom iz GenBank baze koja je opisana pod vrstom *P. kurtmuelleri* (GenBank pristupni kod FN432367; Ploetner i sur. 2009; lokalitet Nea Manolada, Grčka).

Sekvence uzoraka nepoznate vrste (761, 763) nije bilo moguće očitati iz dobivenih kromatograma budući da je došlo do preklapanja signala različitih nukleotida na istim mjestima u sekvenci. Ovakva poklapanja ukazuju na postojanje više različitih DNA kalupa u uzorku. Zbog toga je provedeno kloniranje kako bi se razdvojile i očitale sve sekvence iz analiziranih uzoraka. Postupak kloniranja je proveden u laboratoriju pri Zavodu za animalnu fiziologiju. Nakon uspješnog kloniranja, odabrano je 9 bakterijskih kolonija za svaki uzorak. Iz kolonija je izolirana DNA te je sekvencirano u MacroGen, Nizozemska. Svih 18 izolata DNA je uspješno sekvencirano. U njima je utvrđeno postojanje ukupno čak 15 različitih jedinstvenih haplotipova. Korištenjem BLAST pretrage utvrđeno je da svaki jedinstveni haplotip pokazuje značajno preklapanje (najviše 97% podudarnosti slijeda nukleotida) s postojećim sekvencama u NCBI (GenBank) bazi koje se odnose na serum albumin gen intronske 1 regije kod zelenih žaba. Ipak zbog značajne razlike (minimalno 3%) između novih sekvenci i postojećih u GenBank bazi, zaključeno je da se radi o nepoznatoj vrsti koja još nije analizirana upotrebom jezgrinog biljega serum albumin gen intronske 1 regije. Iz navedenog razloga pristupilo se analizi filogenetske rekonstrukcije kako bi se utvrdili filogenetski odnosi nepoznate vrste prema ostalim vrstama čije su sekvence dostupne u GenBank bazi. Statistički podržanim grananjima na filogenetskom drvcu smatraju se vrijednosti samoučitanja ≥ 70 (brojčane vrijednosti prikazane uz svako grananje). Prikazano je drveće s najvećom vrijednosti log vjerojatnosti (-3652.69). Korišten je evolucijski model Tamura-3 parametar (Tamura 1992). Diskretna gama distribucija je upotrijebljena da bi se modelirale razlike u evolucijskim stopama između nukleotidnih mjesta (5 kategorija (+G, parametar = 0.3123)). Drveće je

prikazano s odnosima duljina prema skali u donjem lijevom kutu, s duljinama grananja izmjerenim kao broj supstitucija po nukleotidnom mjestu. Set podataka uključivao je 1474 nukleotidne pozicije (uključujući prazna mjesta u sravnjenju). Sekvence jedinstvenih haplotipova izdvojile su se kao jasno podržana monofiletska grupa (vrijednost samoučitanja 99) na filogenetskom drvcu (Slika 11.). Duljina grananja koja vodi prema toj haplogrupi (vrsti) je velika što ukazuje na njenu duboku evolucijsku divergenciju u odnosu na ostale vrste.

Sveukupni rezultati analize serum albumin gen intronske 1 regije ukazuju na postojanje dvije vrste zelenih žaba u uzorku sa Skadarskog jezera (*P. kurtmuelleri* i nepoznate vrste), te njihovog hibrida. U slučaju nepoznate vrste, duljina serum albumin gen intronske 1 regije kao i njene sekvence ne odgovaraju postojećim podacima u literaturi. Budući da je prema dobivenim rezultatima isključena prisutnost vrsta *P. ridibundus*, *P. lessonae*, *P. kl. esculentus* i *P. epeiroticus*, pretpostavljeno je da je nepoznata vrsta *P. shqipericus*. Prema literaturnim podacima vrsta *P. shqipericus* nikada nije analizirana upotrebom serum albumin gen intronske 1 regije te se stoga, za usporedbu s literaturnim podacima i konačno utvrđivanje taksonomskog statusa nepoznate vrste, napravila analiza na mitohondrijskom genu za podjedinicu 3 NADH dehidrogenaze (ND3) (Plötner i sur. 2010, Akin i sur. 2010, Hotz i sur. 2013, Domeneghetti i sur. 2013, Dubey i sur. 2014).



Slika 11. Filogenetsko stablo za serum albumin gen intronsku 1 regiju dobiveno pomoću statističke metode najveće vjerovatnosti.

4.3. Analiza sekvenci ND3 mitohondrijskog biljega

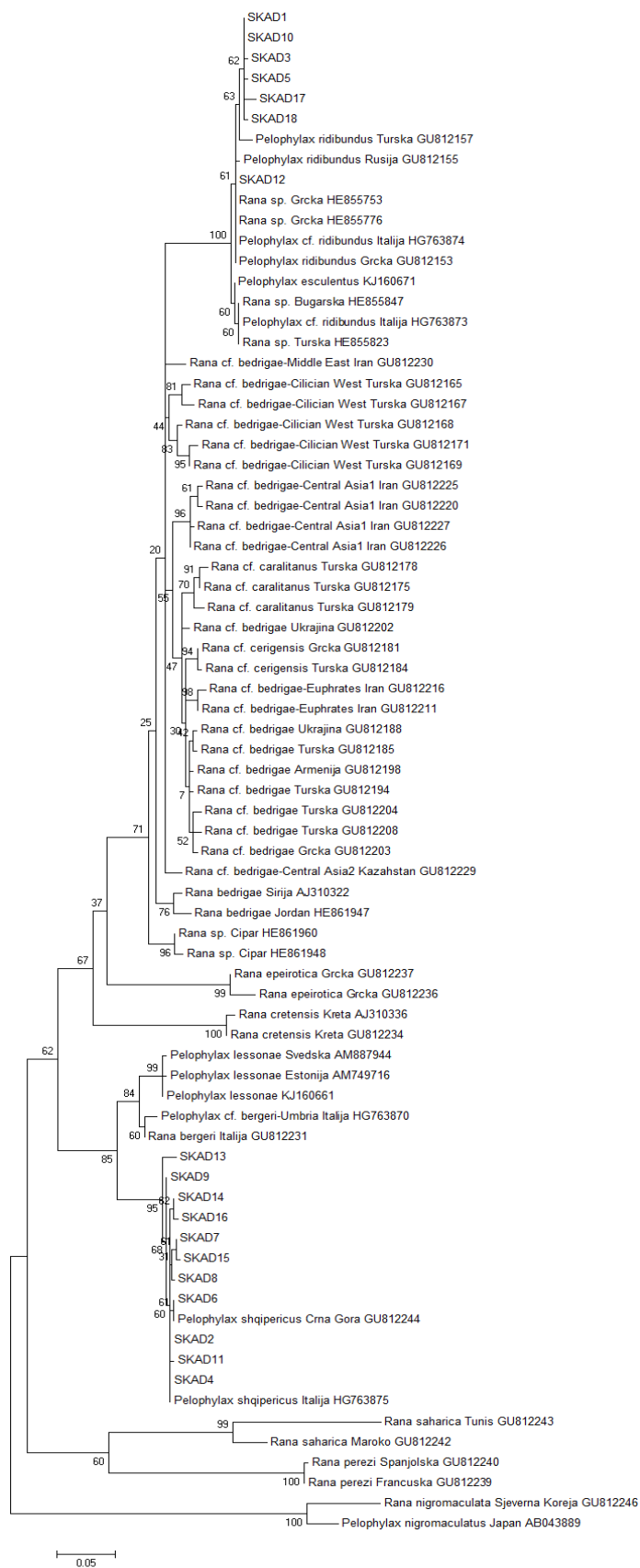
Lančana reakcija polimerazom za mitohondrijski biljeg napravljena je na svim uzorcima. Sekvence su BLAST pretragom uspoređene s postojećim podacima u NCBI bazi te su vrste determinirane po mitohondrijskoj DNA (Tablica 3). Rezultati su pokazali da se radi o vrstama *P. kurtmuelleri* i *P. shqipericus*. Od 101 uzorka, 49 je po mitohondrijskoj DNA pripadalo vrsti *P. kurtmuelleri*, 38 *P. shqipericus*, a sekvence dobivene na 14 uzoraka nisu bile dovoljno kvalitetne za daljnje analize (Tablica 3.). Dodatno je napravljena filogenetska rekonstrukcija na ND3 mitohondrijskom biljegu (Slika 12.) kako bi se napravila usporedba s filogenetskim drvcem dobivenim analizom jezgrinog biljega (Slika 11.). Statistički podržanim grananjima na filogenetskom drvcu smatraju se vrijednosti samoučitanja ≥ 70 (brojčane vrijednosti prikazane uz svako grananje). Prikazano je drvece s najvećom vrijednosti log vjerojatnosti (-2153.98). Korišten je evolucijski model Tamura-Nei (Tamura i Nei 1993). Diskretna gama distribucija je upotrijebljena da bi se modelirale razlike u evolucijskim stopama između nukleotidnih mjesta (5 kategorija (+G, parametar = 0.3008)). Drvece je prikazano s odnosima duljina prema skali u donjem lijevom kutu, s duljinama grananja izmjerenim kao broj supstitucija po nukleotidnom mjestu. Set podataka uključivao je 279 nukleotidnih pozicija (uključujući prazna mjesta u sravnjenju) (Slika 12.).

Tablica 3. Prikaz rezultata dobivenih na mitohondrijskoj (gen podjedinice 3 NADH dehidrogenaze, ND3) i jezgrinoj (serum albumin gen intron 1 - SA intron 1) regiji za sve uzorke zelenih žaba sa Skadarskog jezera. Slovom K je označena vrsta *P. kurtmuelleri*, slovom S vrsta *P. shqipericus*, a kombinacijom slova (KS) njihov hibrid. Neuspjele reakcije su označene oznakom n/a.

Šifra uzorka	ND3 vrsta	ND3 haplotip	SA intron 1 vrsta	Broj uzorka	ND3 vrsta	ND3 haplotip	SA intron 1 vrsta
736	K	SKAD10	n/a	787	S	SKAD2	S
737	n/a	n/a	n/a	788	n/a	n/a	S
738	K	SKAD1	K	789	S	SKAD2	S
739	K	SKAD1	K	790	S	SKAD4	S
740	K	SKAD1	K	791	S	SKAD14	S
741	K	SKAD1	K	792	S	SKAD15	S
742	K	SKAD1	K	793	S	SKAD2	S
743	K	SKAD1	K	794	S	SKAD6	S
744	n/a	n/a	n/a	795	S	SKAD4	S
745	K	SKAD1	KS	796	S	SKAD2	S
746	K	SKAD1	K	797	S	SKAD2	S
747	S	SKAD6	S	798	S	SKAD16	S
748	K	SKAD1	K	799	S	SKAD2	S
749	S	SKAD2	S	800	K	SKAD1	K
750	K	SKAD1	K	801	S	SKAD9	KS

Tablica 3. Nastavak sa stranice 40.

751	n/a	n/a	n/a	802	K	SKAD1	K
752	S	SKAD2	S	803	K	SKAD5	K
753	n/a	n/a	S	804	K	SKAD1	K
754	n/a	n/a	K	805	K	SKAD1	K
755	K	SKAD1	KS	806	K	SKAD1	K
756	S	SKAD7	S	807	K	SKAD1	n/a
757	S	SKAD2	S	808	K	SKAD1	K
758	K	SKAD1	K	809	K	SKAD1	K
759	S	SKAD2	S	810	K	SKAD5	K
760	S	SKAD11	S	811	K	SKAD17	n/a
761	S	SKAD2	S	812	K	SKAD3	K
762	S	SKAD2	S	813	K	SKAD1	n/a
763	S	SKAD2	n/a	814	S	SKAD4	S
764	S	SKAD2	S	815	n/a	n/a	S
765	S	SKAD2	S	816	K	SKAD1	K
766	S	SKAD2	S	817	S	SKAD2	S
767	K	SKAD3	KS	818	K	SKAD1	K
768	S	SKAD8	S	819	K	SKAD1	K
769	K	SKAD3	K	820	n/a	n/a	n/a
770	n/a	n/a	n/a	821	K	SKAD1	K
771	K	SKAD1	K	822	K	SKAD5	K
772	n/a	n/a	n/a	823	K	SKAD1	K
773	K	SKAD1	K	824	K	SKAD1	K
774	K	SKAD1	K	825	K	SKAD1	n/a
775	S	SKAD2	S	826	K	SKAD1	K
776	n/a	n/a	n/a	827	K	SKAD18	K
777	S	SKAD2	S	828	S	SKAD2	S
778	S	SKAD2	S	829	n/a	n/a	K
779	S	SKAD2	S	830	S	SKAD9	KS
780	n/a	n/a	n/a	831	K	SKAD1	K
781	K	SKAD12	K	832	K	SKAD1	K
782	S	SKAD7	S	833	K	SKAD1	K
783	K	SKAD1	K	834	K	SKAD1	K
784	S	SKAD8	S	835	K	SKAD1	K
785	S	SKAD13	S	836	K	SKAD1	K
786	n/a	n/a	S				



Slika 12. Filogenetsko stablo za mitohondrijski gen NADH podjedinicu 3 (ND3) dobiveno pomoću statističke metode najveće vjerojatnosti.

5. RASPRAVA

Skadarsko jezero je od prije poznato kao zanimljiva lokacija za istraživanje raznolikosti zelenih žaba. Ranija istraživanja s tog područja bila su temeljena na analizama kromosomskih setova i elektroforetskih uzoraka alozima žaba, kako bi se istražila pojava hibrida (Hotz i sur. 1985, Guerrini i sur. 1997) te morfološkim i morfometrijskim analizama vrsta iz roda *Pelophylax* u kombinaciji s molekularnim metodama (Spasić – Bošković, Krizmanić i Vujošević 1999). Hotz i suradnici (1985) su na Skadarskom jezeru, utvrdili prisutnost vrste *P. ridibundus* i dvije joj srodne vrste, jednu „neimenovanu balkansku vrstu“ i *P. epeirotica* (Hotz i sur. 1985). U istom istraživanju utvrđeno je postojanje hibrida između *P. ridibundus* i „neimenovane balkanske vrste“, dok se za *P. ridibundus* i *P. epeirotica* smatra da ipak ne mogu hibridizirati (Hotz i sur. 1985). Krajem 90-ih Guerrini i sur. (1997) spominju prisutnost *P. shqipericus* na području Skadarskog jezera (uzorci iz Virpazara). Također, prema morfometrijskim i genetičkim analizama, analizama alozima, kariotipa, citogenetičkim analizama, na području Skadarskog jezera (Virpazar) je potvrđena prisutnost *P. ridibundus* i *P. shqipericus* te pretpostavljena pojava hibrida između ove dvije vrste (Spasić – Bošković, Krizmanić i Vujošević 1999).

Metoda analize duljine fragmenata jezgrine serum albumin gen intronske-1 regije na agaroznom gelu već se ranije pokazala iznimno uspješnom u determinaciji vrsta (Hauswaldt i sur. 2012). Serum albumin intron-1 je regija u jezgrinoj DNA zelenih žaba, nastala 5' skraćivanjem retrotranspozona. Zbog velikog broja insercijskih i delecijских mutacija (retroelement s velikom mobilnošću) što uzrokuje razlike između vrsta unutar roda *Pelophylax*, ova intronska regija je odličan model za utvrđivanje filogenetičkih odnosa između vrsta zelenih žaba (Plötner i sur. 2009).

Analizom serum albumin intron-1 regije, utvrđeno je da u uzorku populacija zelenih žaba sa Skadarskog jezera nisu prisutne vrste *P. ridibundus*, *P. lessonae*, *P. kl. esculentus*, ni *P. epeirotica* kako se tvrdilo na temelju morfološke determinacije. Područje Skadarskog jezera nastanjuju vrste *P. shqipericus*, kako je već i ranije potvrđeno (Spasić – Bošković, Krizmanić i Vujošević 1999), ali umjesto vrste *P. ridibundus* (Spasić – Bošković, Krizmanić i Vujošević 1999) utvrdili smo prisutnost sestrinske vrste *P. kurtmuelleri* (Slika 11.).

Dobiveni rezultati analize serum albumin intron-1 regije potvrđuju da to područje nastanjuje *P. shqipericus* kako se tvrdilo u prijašnjim radovima. Plötner i suradnici su 2010. g na temelju mitohondrijske analize ND3 gena utvrdili da je na području Skadarskog jezera

prisutna vrsta *P. shqipericus*. Uz to su Spasić – Bošković, Krizmanić i Vujošević (1999) godine, kao i Guerrini i suradnici (1997), radili citogenetičke, alozimske i kariotipske analize na uzorcima iz Virpazara (Skadarsko jezero) i također potvrdili nalaz *P. shqipericus*. Iako se do nedavno smatralo da su vrste *P. shqipericus* i *P. lessonae* sestrinske vrste (Lymberakis i sur. 2007), to ipak nije u potpunosti točno. Nedavnom analizom filogenetskih odnosa unutar roda *Pelophylax* (*Rana*) utvrđeno je da *P. shqipericus* i *P. lessonae* jesu srodne, ali filogenetski udaljenije nego što se to do sad smatralo s divergencijom mitohondrijskog genoma od 7% dok je između *P. ridibundus* i *P. kurtmuelleri* samo 1% (Hofman i sur. 2015). Tu tvrdnju potvrdili su naši rezultati. Na filogenetskom stablu za serum albumin gen intronsku-1 regiju dobivenom pomoću statističke metode najveće vjerojatnosti (Slika 11.) se jasno vidi odvajanje *P. shqipericus* i *P. lessonae*. Iako se na filogenetskom stablu odvajaju kao grupa, to nije slučaj, jer je podržanost jako niska (25%) pa je vjerojatnije da je ovdje u pitanju politomija gdje bi *P. lessonae* i *P. shqipericus* mogle biti bazalne grupe, no nisu u potpunosti jasni njihovi hijerarhijski odnosi.

Prisutnost *P. shqipericus*, osim na Skadarskom jezeru, po prvi put je 2013. g potvrđena i u središnjoj Italiji (Domeneghetti i sur. 2013). Provedene su analize serum albumin intron-1 i mitohondrijskog gena ND3 na uzorcima iz doline Resina. Uz autohtonu vrstu *P. lessonae bergeri* pojavile su se unešene vrste *P. ridibundus* i *P. shqipericus* (Domeneghetti i sur. 2013), a potvrđena je analizom sekvenci mitohondrijskog markera ND3. Do sada u otvorenim, on-line bazama DNS sekvenci (GenBank) nije prijavljena niti jedna nukleotidna sekvenca serum albumin intron-1 regije za *P. shqipericus*. Naime, pri stvaranju početnica za serum albumin gen intronsku-1 regiju, Plötner i suradnici 2009., koristili su komplementarnu DNA (cDNA) *P. shqipericus*. Iako su funkcionalne početnice stvorene, sekvenca ove regije za *P. shqipericus* ne postoji u GenBank bazi (Plötner i sur. 2009). U našem radu smo se tako suočili s problemom nepostojanja kvalitetne sekvence navedene regije za vrstu *P. shqipericus*, za što smo pretpostavili da je vjerojatno posljedica postojanja većeg broja različitih alela u pojedinom uzorku. Taj problem je riješen kloniranjem PCR uzoraka nakon čega su dobiveni jasni kromatogrami bez ikakvih pozadinskih smetnji. Ovim su po prvi put dobivene sekvence za serum albumin gen intronsku-1 regiju kod vrste *P. shqipericus* što je važno radi razumjevanja filogenetskih odnosa unutar zelenih žaba. Analiza serum albumin intron-1 regije kod *P. shqipericus* je pokazala inserciju od 352 nukleotida, nađenu u svim kloniranim sekvencama *P. shqipericus*, u odnosu na istu regiju kod ostalih vrsta iz roda *Pelophylax*. Kod vrste *P. shqipericus* primjećen je znatan broj pojedinačnih

polimorfizama nukleotida (engl. *single – nucleotide polymorphism – SNP*), dok kod vrste *P. kurtmuelleri* ovo nije primjećeno te su svi analizirani uzorci imali identičnu sekvencu.

Uz *P. shqipericus*, po rezultatima analize serum albumin intron-1 regije, u uzorku je prisutna i vrsta *P. kurtmuelleri*. Taksonomski status vrste *P. kurtmuelleri* dosta je složen a po nekim autorima to i nije vrsta (Crochet i Dubois 2004) Naši rezultati pokazuju odvajanje vrste *P. kurtmuelleri* od *P. ridibundus* (koja nije prisutna u uzorku sa Skadarskog jezera). Na filogenetskom stablu serum albumin intron-1 regije (Slika 11.), jasno se vidi odvojenost *P. kurtmuelleri* od *P. ridibundus* koje je visoko podržano (97%), stoga se može tvrditi da se radi o zasebnoj vrsti.

Rezultati pokazuju da dolazi do hibridizacije između *P. kurtmuelleri* i *P. shqipericus* (ranije već spomenuto, ali kao hibridizacija između *P. ridibundus* i „neimenovane balkanske vrste“) (Hotz i sur. 1985). Za razliku od *P. kl. esculentus* hibridnog kompleksa, kod stvaranja hibridnih jedinki između *P. ridibundus* i *P. shqipericus* ne dolazi do isključivanja genoma jedne od roditeljskih linija, jer na *P. shqipericus* isključivanje genoma vjerojatno nema nikakvog utjecaja (Hotz i sur. 1985, Guerrini i sur. 1997). Ostaje nerazjašnjen način hibridizacije (vjerojatno se ne radi o hibridogenezi kao kod *P. kl. esculentus* kompleksa) te je za njegovo utvrđivanje potrebno provesti daljnja istraživanja. Već ranije je zabilježeno da vrste *P. shqipericus* i *P. kurtmuelleri* žive sintopički (Plötner i sur. 2010, Guerrini i sur. 1997) te da primarni mehanizmi „antihibridizacije“ nemaju nikakvog utjecaja na ove vrste (Plötner i sur. 2010), stoga ovaj rezultat ide u prilog navedenim tvrdnjama.

Za dodatno utvrđivanje o kojima se vrstama u uzorku radi, korišten je i mitohondrijski biljeg ND3. Analiza mitohondrijske DNA (mtDNA) je vrlo korisna metoda u molekularnoj biologiji. Pošto se mitohondrijska DNA nasljeđuje samo po majčinoj liniji, može se pratiti fertilitet hibrida povratnim križanjem s roditeljskim vrstama (Guerrini i sur. 1997). Za to je potrebno kombinirati rezultate istraživanja mtDNA i jezgrine DNA jer se na taj način u nekim slučajevima može utvrditi introgresija mitohondrijskog genoma (Plötner i sur. 2008). Analiza sekvenci ND3 gena je potvrdila prisutnost *P. shqipericus* u uzorku. Na filogenetskom stablu za mitohondrijski gen ND3 dobiveno pomoću statističke metode najveće vjerojatnosti se može zaključiti da se radi o vrsti *P. shqipericus* koja je jasno odvojena od vrste *P. lessonae* i gdje su još jasnije grupirane nego na filogenetskom stablu serum albumin intron-1 regije. U prilog tomu ide velika podržanost (vrijednost samoučitanja 95%) te potpuno preklapanje

dobivenih sekvenci sa sekvencama *P. shqipericus* iz Italije GU812244 (Domeneghetti i sur. 2013) i Crne Gore HG763875 (Akin i sur. 2010) koje se poklapaju s našim uzorcima.

Filogenetsko stablo ND3 regije za vrstu *P. kurtmuelleri* daje ipak nešto kompleksniji rezultat (Slika 12.). Prema ND3 biljevu, *P. kurtmuelleri* nije jasno odvojena vrsta kao na filogenetskom stablu za serum albumin intron-1 regiju (Slika 11.) gdje je vrijednost samoučitanja 97%, nego je dio kompleksa *ridibundus/kurtmuelleri*. Ranije analize koje su uključivale ND3 i ND2 mitohondrijske biljege, nisu u potpunosti razriješili poziciju *P. kurtmuelleri* i status vrste je bio slabo podržan (Plötner i sur. 2012). No, novija istraživanja na čitavim mitogenomskim sekvencama ipak idu u prilog tomu da je *P. kurtmuelleri* ipak zasebna vrsta (Hofman i sur. 2015). Kompleks *ridibundus/kurtmuelleri* je široko rasprostranjen, od Rusije na sjeveru i Turske na jugu (Akin i sur. 2010) pa do Italije na zapadu (Domeneghetti i sur. 2013). U svom radu Akin i suradnici 2010. ne spominju *P. kurtmuelleri* kao vrstu, nego kao dio *P. ridibundus*, dok Domeneghetti i sur. (2013) *P. kurtmuelleri* navode kao *P. cf. ridibundus*. Jedan od haplotipova naveden kao *P. ridibundus* u radu Domeneghetti i sur. 2013, odgovara haplotipu za koji smo u ovom istraživanju potvrdili da se radi o vrsti *P. kurtmuelleri* dok drugi haplotip odgovara *P. ridibundus* iz središnje Europe. Moguće je da se radi o unešenoj vrsti zajedno s *P. shqipericus*, ali je isto tako moguće da se radi o vrstama koje su ipak autohtone za područje srednje Italije.

Metode primjenjene u ovom istraživanju (analiza serum albumin intron-1 regije i ND3 mitohondrijskog gena) su se pokazale vrlo učinkovitima i uspješnima u određivanju vrsta zelenih žaba Skadarskog jezera i mogu poslužiti u daljnjim istraživanjima roda *Pelophylax*. Brzina kojom se mogu dobiti rezultati značajno će pridonijeti unaprijeđenju znanja o zelenim žabama, ali i konačnom razrješenju odnosa između vrsta unutar ovog roda, a i o samim hibridima i hibridnim kompleksima.

6. ZAKLJUČAK

Na području Skadarskog jezera u Crnoj Gori, prisutne su dvije vrste roda *Pelophylax*: *P. shqipericus* i *P. kurtmuelleri* te hibrid nastao križanjem te dvije vrste.

U uzorcima nisu zabilježena tkiva vrste *P. ridibundus*, *P. lessonae* kao ni kleton *P. kl. esculentus* kako su određene na terenu. Jedinke koje su u prijašnjim istraživanjima određivane kao vrsta *P. ridibundus*, najvjerojatnije su pripadale vrsti *P. kurtmuelleri*, koja je sestrinska vrsta *P. ridibundus*, a hibridni kompleks nije *P. kl. esculentus* nego neopisani hibrid između vrsta *P. kurtmuelleri* i *P. shqipericus*. Fertilitet neopisanog hibridnog kompleksa nije utvrđena i potrebna su daljnja istraživanja.

Metoda analize jezgrinog biljega serum albumin gen intronske 1 regije se pokazala uspješnom metodom za determinaciju vrsta unutar roda *Pelophylax* te za otkrivanje hibridnih jedinki. Mitohondrijski gen za NADH podjedinicu 3 (ND3) se također pokazao vrlo učinkovitim u determinaciji vrsta roda *Pelophylax*.

7. LITERATURA

- Akin C., Bilgin C.C., Beerli P., Westaway R., Ohst T., Litvinchuk S.N., Uzzell T., Bilgin M., Hotz H., Guex G.D., Plötner J. (2010): Phylogeographic patterns of genetic diversity in eastern Mediterranean water frogs were determined by geological processes and climate change in the Late Cenozoic. *Journal of Biogeography*. **37**: 2111–2124.
- Amphibia Web: Information on amphibian biology and conservation. [web application]. 2012. Berkeley, California: AmphibiaWeb. Available: <http://amphibiaweb.org/>. (Jun 21, 2015).
- Arnold M.L. (1992): Natural hybridization as an evolutionary Process. *Annual Review of Ecology and Systematics*. **23**: 237–261.
- Arnold M.L. (1997): *Natural hybridization and evolution*. Oxford University Press, New York. 232 str.
- Arnold N., Ovenden D. (2004): *Reptiles and amphibians of Britain and Europe - Field Guide*. Collins. 76–87.
- Barnard C.J. (1984): *Producers and Scroungers: strategies of exploitation and parasitism*. Chapman & Hall, New York, NY. 303 str.
- Beerli P., Hotz H., Uzzell T. (1996): Geologically dated sea barriers calibrate a protein clock for Aegean water frogs. *Evolution*. **50**: 1676–1687.
- Berger L. (1973): Systematics and hybridization in European green frogs of *Rana esculenta* complex. *Journal of Herpetology*. **7**: 1–10.
- Bilgin R. (2011): Back to the suture: The distribution of intraspecific genetic diversity in and around Anatolia. *International Journal of Molecular Sciences*. **12**: 4080–4103.
- Borkin L.J., Korshunov A.V., Lada G.A., Litvinchuk S.N., Rosanov J.M., Shabanov D. A., Zinenko A.I. (2004): Mass occurrence of polyploid green frogs (*Rana esculenta* complex) in Eastern Ukraine. *Russian Journal of Herpetology*. **11**: 194–213.
- Bullini L. (1994): Origin and evolution of animal hybrid species. *Trends in Ecology & Evolution*. **9**: 422–426.
- Burke J.M., Arnold M.L. (2001): Genetics and the fitness of hybrids. *Annual Review of Genetics*. **35**: 31–52.
- Che J., Pang J., Zhao H., Wu G.F., Zhao E.M., Zhang Y.P. (2007): Phylogeny of *Raninae* (Anura: Ranidae) inferred from mitochondrial and nuclear sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **43**: 1–13.
- Christiansen D.G. (2005): A microsatellite-based method for genotyping diploid and triploid water frogs of the *Rana esculenta* hybrid complex. *Molecular Ecology Notes*. **5**: 190 – 193.

- 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**: 135.
- Christiansen D.G., Jakob C., Arioli M., Roethlisberger S., Reyer H.U. (2010): Coexistence of diploid and triploid hybrid water frogs: population differences persist in the apparent absence of differential survival. *BMC Ecology*. **10**: 14.
- Christiansen D.G., Reyer H.-U. (2009): From clonal to sexual hybrids: Genetic recombination via triploids in all hybrid populations of water. *Evolution*. **63**: 1754–1768.
- Christiansen D.G., Reyer H.-U. (2011): Effects of geographic distance, sea barriers and habitat on the genetic structure and diversity of all-hybrid water frog populations. *Heredity*. **106**: 25–36.
- Coyne J.A., Orr H.A. (2004): *Speciation*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, USA. 545 str.
- Crnobrnja Isailović J., Džukić G. (1997): Raznovrsnost faune vodozemaca i gmizavaca u širem regionu Skadarskog jezera i značaj njenog očuvanja. Prirodne vrijednosti i zaštita Skadarskog jezera. Naučni skupovi. Knjiga. **44**: 237–261.
- 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**: 171–176.
- Dubois A. (2010): Describing new species. *Taprobanica* **2**: 6–24.
- Džukić G., Kalezić M., Ljubisavljević K. (2003): Zaštita i očuvanje zelenih žaba u Srbiji i Crnoj Gori. Savezni sekretarijat za rad, zdravstvo i socijalno staranje, Sektor za životnu sredinu, Beograd, Republika Srbija. 126 str.
- Edgar, R.C. (2004): Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. **32**: 1792-1797
- Frost D.R., Grant T., Faivovich J., Bain R.H., Haas A., Haddad C.F.B., De Sá R.O., Channing A., Wilkinson M., Donnellan S.C., Raxworthy C.J., Campbell J. A., Blotto B.L., Moler P., Drewes R.C., Nussbaum R. A., Lynch J.D., Green D.M., Wheeler W.C. (2006): The Amphibian Tree of Life. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. **297**: 1–291.
- Frost D. R. (2013): *Amphibian Species of the World*. Version 5.6 (9 January 2013). American Museum of Natural History, New York, USA. 732 str.
- Gavrilović V., Cvetković D.D., Djukić G., Petkovski S. (1999): Comparative morphological study of *Rana balcanica* and *Rana ridibunda*. *Contributions to the Zoogeography and Ecology of the Eastern Mediterranean Region*. **1**: 205–210.

- Gregović R.K., Mrdak Z. (2011-2015): Nacionalni park „Skadarsko jezero“ – Plan upravljanja. Javno preduzeće za Nacionalne parkove Crne Gore.
- Guerrini F., Bucci S., Ragghianti 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.
- Hall T.A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. **41**: 95–98.
- Hauswaldt J.S., Höer M., Ogielska M., Christiansen D.G., Dziejulska-Szwajkowska D., Czernicka E., Vences M. (2012): A simplified molecular method for distinguishing among species and ploidy levels in European water frogs (*Pelophylax*). *Molecular Ecology Resources*. **12**: 797–805.
- Hewitt, G.M. (1996): Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* **58**: 247–276.
- Hewitt G.M. (2000): The genetic legacy of the quaternary ice ages. *Nature*. **405**: 907–913.
- Hillman S.S., Withers P.C., Drewes R.C., Hallyard S.D. (2009): *Ecological and Environmental Physiology of Amphibians*. Oxford University Press, Oxford. 482 str.
- 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*. Early online: 1-4.
- Holman J.A. (1998): *Pleistocene amphibians and reptiles in Britain and Europe*. New York Oxford, Oxford University Press. 264 str.
- Holsbeek G., Jooris R. (2009): Potential impact of genome exclusion by alien species in the hybridogenetic water frogs (*Pelophylax esculentus* complex). *Biological Invasions*. **12**: 1–13.
- Holsbeek G., Maes G.E., De Meester L., Volckaert F.A.M. (2009): Conservation of the introgressed European water frog complex using molecular tools. *Molecular Ecology*. **18**: 1071–1087.
- Hotz H., Beerli P., Uzzell T., Guex G.D., Pruvost N.B.M., Schreiber R., Plötner J. (2013): Balancing a cline by influx of migrants: A genetic transition in water frogs of Eastern Greece. *Journal of Heredity*. **104**: 57–71.
- Hotz H., Guex G.D., Beerli P., Semlitsch R.D., Pruvost N.B.M. (2008): Hemiclone diversity in the hybridogenetic frog *Rana esculenta* outside the area of clone formation: The view from protein electrophoresis. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. **46**: 56–62.

- 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. *The Journal of Experimental Zoology*. **236**: 199–210.
- Hotz H., Uzzell T. (1983): Interspecific hybrids of *Rana ridibunda* without germ line exclusion of a parental genome. *Experientia*. **39**: 538–540.
- Jablonski D. (2011): Reptiles and amphibians of Albania with new records and notes on occurrence and distribution. *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae*. **75**: 223–238.
- Krizmanić I.I. (2008): Water frogs (*Rana esculenta* complex) in Serbia - Morphological data. *Archives of Biological Sciences*. **60**: 449–457.
- Krizmanić I.I., Ivanović A.T. (2010): Population systems of the *Pelophylax esculentus* complex in the southern part of its range. *Folia Zoologica*. **59**: 215–222.
- Lymberakis P., Poulakakis N., Manthou 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**: 115–125.
- Mallet J. (2005): Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology & Evolution*. **20**: 229–237.
- Mallet J. (2007): Hybrid speciation. *Nature*. **446**: 279–283.
- Meyer A., Zardoya R. (2003): Recent advances in the (molecular) phylogeny of vertebrates. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **34**: 311–338.
- 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.
- Ogielska M., Kotusz A. (2004): Pattern and Rate of Ovary Differentiation with Reference to Somatic Development in Anuran Amphibians. *Journal of Morphology*. **259**: 41–54.
- Pagano A., Crochet P.A., Graf J.D., Joly P., Lodé T. (2001): Distribution and habitat use of water frog hybrid complexes in France. *Global Ecology and Biogeography*. **10**: 433–441.
- Pagano A., Lodé T., Crochet P.A. (2001): New contact zone and assemblages among water frogs of Southern France. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. **39**: 63–67.
- Patrelle C., Ohst T., Picard D., Pagano A., Sourice S., Dallay M.G., Plötner J. (2011): A new PCR-RFLP-based method for an easier systematic affiliation of European water frogs. *Molecular Ecology Resources*. **11**: 200–205.
- Plötner J., Baier F., Akin C., Mazepa G., Schreiber R., Beerli P., Litvinchuk S.N., Bilgin C.C., Borkin L., Uzzell T. (2012): Genetic data reveal that water frogs of Cyprus

- (genus *Pelophylax*) are an endemic species of Messinian origin. *Zoosystematics and Evolution*. **88**: 261–283.
- Plötner J., Köhler F., Uzzell T., Beerli P., Schreiber R., Guex G.D., 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., Kohler F., Schreiber R., Guex G.-D., Litvinchuk A. N., Westaway R., Reyer H.-U., Hotz H. (2010): Genetic divergence and evolution of reproductive isolation in eastern Mediterranean water frogs. *Evolution in Action: Case studies in Adaptive Radiation, Speciation and the Origin of Biodiversity*. Springer Science & Business Media. 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 Palaeartic water frogs. *Journal of Evolutionary Biology*. **21**: 668–681.
- Polović L., Čadenović N. (2014): The herpetofauna of the Great Ulcinj Beach area including Ada Island (Montenegro). *Turkish Journal of Zoology*. **38**: 104–107.
- Polović L., Ljubisavljević K. (2010): Herpetofaunal richness of the Skadar Lake region, Montenegro: a review and update. *Scripta Scientiarum Naturalium*. **1**: 113–121.
- Pough F.H., Andrews R.D., Cadle J.E., Crump M.L., Savitsky A.H., Wells K.D. (1998): *Herpetology*. Prentice-Hall, New Jersey. 612 str.
- Radović D., Lješević M., Kukrika M., Ninkov T., Džukić G., Radović I. (2007): GIS i prirodni potencijali regiona Skadarskog jezera. Zbornik radova. Urednici: Filipović D., Stanković S., Šećerov, V. - Beograd, Asocijacija prostornih planera Srbije, Zavod za urbanizam Subotica, Geografski fakultet Univerziteta u Beogradu. Str: 527–538.
- Radović I., Radović D., Jakšić P., Džukić G., Steanović V., Bulić Z., Bušković V. (2008): Skadar lake region and “target species” species of European conservation concern. *Natura Montenegrina*. **7**: 31–44.
- Rage J., Rocek Z. (1989): Redescription of *Triadobatrachus masinoti* (Piveteau, 1936) an anuran amphibian from the early Triassic. *Palaeontographica Abteilung A Paleozoologie – Stratographie*. **206**: 1–16.
- San Mauro D., Vences M., Alcobendas M., Zardoya R., Meyer A. (2006): Initial diversification of living amphibians predated the break-up of Pangea. *The American Naturalist* **165**: 590–599.
- Sinsch U., Schneider H. (1996): Bioacoustic assessment of the taxonomic status of pool frog populations (*Rana lessonae*) with reference to a topotypical population. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. **34**: 63–73.

- Spasic-Boskovic O., Krizmanić I.I., Vujošević M. (1999): Population composition and genetic variation of water frogs (Anura : Ranidae) from Yugoslavia. *Caryologia*. **52**: 9–20.
- Schultz R.J. (1969): Hybridization, unisexuality, and polyploidy in the teleost *Poeciliopsis* (Poeciliidae) and other vertebrates. *The American Naturalist* **103**: 605–619.
- Steward, J.R., Lister, A.M. (2001): Cryptic northern refugia and the origin of the modern biota. *Tree*. **16**: 608–613.
- Stuart B.L. (2008): The phylogenetic problem of *Huia* (Amphibia: Ranidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **46**: 49–60.
- Taberlet P., Fumagalli L., Wust-Saucy A.G., Cossons J.F. (1998): Comparative phylogeography and postglacial colonisation routes in Europe. *Molecular Ecology*. **7**: 453–464.
- Tamura K. (1992): Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Molecular Biology and Evolution*. **9**: 678–687.
- Tamura K., Nei M. (1993): Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*. **10**: 512–526.
- 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.
- Tunner H.G., Heppich-Tunner S. (1991): Genome exclusion and two strategies of chromosome duplication in oogenesis of a hybrid frog. *Naturwissenschaften*. **78**: 32–34.
- Uzzell T., Hotz H., Berger L. (1980): Genome exclusion in gametogenesis by an interspecific *Rana* hybrid: Evidence from electrophoresis of individual oocytes. *Journal of Experimental Zoology*. **214**: 251–259.
- Uzzell T., Andreone F., Lymberakis P., Vogrin M., Haxhiu I., Crnobrnja Isailović J., Sindaco R., Romano A. (2009): *Pelophylax kurtmuelleri*. U: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. <www.iucnredlist.org>. (20 January 2014.)
- Uzzell T., Crnobrnja Isailović J. (2009): *Pelophylax shqipericus*. U: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. <www.iucnredlist.org>. (20 January 2014.)
- Vinogradov A.E., Chubinishvili A.T. (1999): Genome reduction in a hemiclinal frog *Rana esculenta* from radioactively contaminated areas. *Genetics*. **151**:1123–1125.

- Vinogradov 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.
- Vološen T. (2014): Procjena starosti zelenih žaba roda *Pelophylax* Fitzinger, 1843 metodom skeletokronologije. Diplomski rad. Zagreb. 49 str.
- Wang S., Zhu W., Gao X., Li X., Yan S., Liu X., Yang J., Gao Z., Li Y. (2014): Population size and time since island isolation determine genetic diversity loss in insular frog populations. *Molecular Ecology* **23**: 637–648.