

Molekularno-filogenetičke i morfološke značajke zelenih žaba (rod *Pelophylax*) u Hrvatskoj

Schmidt, Bruno

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:811997>

Rights / Prava: [In copyright](#)/Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-30**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Bruno Schmidt

Molekularno–filogenetičke i morfološke značajke zelenih žaba
(rod *Pelophylax*) u Hrvatskoj

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad izrađen je na Zoologijskom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Görana Klobučara i pomoćnim voditeljstvom dr. sc. Mišela Jelića. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovnog-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra znanosti o okolišu.

Najljepše zahvaljujem mentoru dr. sc. Göranu Klobučaru na ukazanom povjerenju, stručnom vodstvu te vremenu i trudu kojeg je uložio.

Najveća hvala dr. sc. Mišelu Jeliću koji me vodio kroz ovo istraživanje, rješavao sve probleme i prepreke, značajno unaprijedio moje znanje i pokazao mi kako se pravilno izvodi znanstveno istraživanje.

Velika hvala svim starim i novim prijateljima koje stekao tijekom svog akademskog obrazovanja, koji su mi pružili potporu u studiranju, ali i nezaboravne trenutke. Hvala svim članovima udruge BIUS s kojima dijelim iskustvo nezaboravnih terenskih istraživanja koja su moje studentske dane učinili zanimljivim i dinamičnim.

Beskonačno hvala mojim roditeljima, Davorki i Robertu, što su mi potpora cijeli moj život. Bez vas ovo ništa ne bi uspio!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno – matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Molekularno–filogenetičke i morfološke značajke zelenih žaba (rod *Pelophylax*) u Hrvatskoj

Bruno Schmidt

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Zelene žabe roda *Pelophylax* jedne su od najproučavanijih skupina žaba u Europi, ali su na području Balkanskog poluotoka i Hrvatske relativno slabo istražene. Različite vrste međusobno hibridiziraju i stvaraju plodne potomke, što je rijetka pojava u životinjskom svijetu. Istraživanje je provedeno u svrhu dobivanja boljeg uvida u prisutnost vrsta i hibrida žaba roda *Pelophylax* u Hrvatskoj. U Hrvatskoj su prisutne mala i velika zelena žaba, *Pelophylax lessonae* i *Pelophylax ridibundus* te njihov fertilni hibrid, *Pelophylax* kl. *esculentus*, ali se u recentnim istraživanjima utvrdila i prisutnost vrsti *Pelophylax kurtmulleri* i *Pelophylax shqipericus*. Zelene žabe su izrazito varijabilna skupina po morfološkim i morfometrijskim karakteristikama, stoga se koriste molekularno-filogenetičke metode radi točnosti njihove determinacije. Umnoženi fragmenti SAI-1 regija jezgrine DNA upotrijebljeni su za determinaciju vrste odnosno hibrida, a umnoženi fragmenti COI regije mitohondrijske DNA korišteni su da bi se utvrdila majčinska linija analiziranih jedinki. Prema nuklearnoj i mitohondrijskoj DNA analizirane žabe sa 7 lokaliteta, 4 u kontinentalnoj Hrvatskoj (Zagreb, Međimurje 1, Međimurje2, Crna Mlaka), 2 u Dalmaciji (Otrić i Biskupija) i jednog u Lici (Podlapačko polje) predstavljaju veoma raznoliku skupinu u kojoj je zastupljena visoka razina hibridizacije i introgresije. Većina žaba iz ovog istraživanja posjeduje gene više vrsta žaba. Morfološke karakteristike koje su se pokazale kao najznačajnije u determinaciji su obojenja bokova i nogu, duljina noge te oblik i veličina metatarzalne kvržice.

(78 stranica, 43 slike, 4 tablica, 88 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: rod *Pelophylax*, hibridizacija, introgresija, morfometrija, Hrvatska

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

Neposredni voditelji: dr. sc. Mišel Jelić

Ocjenitelji: 1. Dr. sc. Göran Klobučar, red. Prof.

2. Dr. sc. Nataša Bauer, izv. prof.

3. Dr. sc. Nenad Buzjak, izv. prof.

4. Dr. sc. Alan Moro, izv. prof.

Rad prihvaćen: 14.2.2018

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation thesis

Molecular phylogenetic and morphological characteristics of water frogs (genus *Pelophylax*) in Croatia

Bruno Schmidt

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Water frogs of the genus *Pelophylax* Fitzinger, 1843 are one of the most frequently studied frog species in Europe but are relatively poorly explored in the Balkan Peninsula and Croatia. Different species hybridize and produce fertile offspring, which is a rare phenomenon in the animal world. This study was conducted to gain a better insight into the presence of *Pelophylax* species and hybrids in Croatia. Croatia is a natural habitat of the Pool frog and the Marsh frog, *Pelophylax lessonae* and *Pelophylax ridibundus* and their fertile hybrids, *Pelophylax kl. esculentus*, but recent research has also determined the presence of *Pelophylax kurtmuelleri* and *Pelophylax shqipericus*. Water frogs are highly variable species by morphological and morphometric characteristics, therefore molecular-phylogenetic methods are used for more accurate determination. Replicated fragments of SAI-1 nuclear DNA markers were used to determine the species or the hybrid, whereas replicated COI fragments of the mitochondrial DNA were used to determine the maternal line of the analyzed individuals. Based on the nuclear and mitochondrial DNA, the analyzed frogs from seven localities, four in continental Croatia (Zagreb, Međimurje, Crna Mlaka 1, Crna Mlaka 2), two in Dalmatia (Otrić and Biskupija) and one in Lika (Podlapačko polje) represent a very diverse group characterized by high levels of hybridization and introgression. Most frogs from this research have genes of several frog species. The morphological features that have proved to be the most significant in determination are the coloring of the hips and legs, the length of the leg and the shape and size of the metatarsal tubercle.

(78 pages, 43 figures, 4 tables, 88 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central Biological Library

Key words: genus *Pelophylax*, hybridisation, introgression, morphometry, Croatia

Supervisor: Dr. sc. Göran Klobučar, red. Prof.

Assistant Supervisor: Dr. sc. Mišel Jelić

Reviewers: 1. Dr. sc. Göran Klobučar, Prof.

2. Dr. sc. Nataša Bauer, Assoc. Prof.

3. Dr. sc. Nenad Buzjak, Assoc. Prof.

4. Dr. sc. Alan Moro, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 14.2.2018

Sadržaj

1.	UVOD	1
1.1.	Razred Amphibia.....	2
1.2.	Red Anura.....	3
1.3.	Porodica Ranidae.....	4
1.4.	Rod <i>Pelophylax</i>	5
1.5.	Sistematika roda <i>Pelophylax</i>	7
1.6.	Hibridogeneza	10
1.7.	Pregled očekivanih vrsta i hibrida na području istraživanja.....	13
1.7.1.	<i>Pelophylax lessonae</i>	13
1.7.2.	<i>Pelophylax ridibundus</i>	16
1.7.3.	<i>Pelophylax kl. esculentus</i>	17
1.7.4.	<i>Pelophylax shqipericus</i>	18
1.7.5.	<i>Pelophylax kurtmuelleri</i>	19
1.8.	Molekularna filogenija	20
2.	Ciljevi istraživanja.....	26
3.	Materijali i metode	27
3.1.	Područje istraživanja	27
3.2.	Materijali	31
3.2.1.	Životinjski materijali	31
3.2.2.	Kemikalije i laboratorijski pribor	31
3.3.	Metode.....	32
3.3.1.	Vanjska morfologija	32
3.3.2.	Morfometrija.....	34
3.3.3.	Izolacija DNA.....	34

3.3.4.	Lančana reakcija polimeraze (eng. <i>Polymerase Chain Reaction</i> – PCR).....	34
3.3.5.	Elektroforeza	35
3.3.6.	Sekvenciranje	36
3.3.7.	Analiza sekvenci.....	36
4.	Rezultati.....	38
4.1.	Analiza PCR produkata SAI-1 regije na agaroznom gelu.	38
4.2.	Analiza PCR produkata COI regije na agaroznom gelu.	39
4.3.	Rasprostranjenost i raznolikost roda <i>Pelophylax</i> u Hrvatskoj/u ovom istraživanju ..	43
4.4.	Morfološke analize	44
4.4.1.	Vanjska morfologija	44
4.4.2.	Morfometrija.....	48
5.	Rasprava	60
5.1.	Genetička raznolikost vrsta roda <i>Pelophylax</i> u Hrvatskoj.....	61
5.2.	Morfološka raznolikost vrsta i hibrida roda <i>Pelophylax</i> u Hrvatskoj.....	64
6.	Zaključak	69
7.	Literatura	70
8.	Životopis.....	78

1. UVOD

Žabe roda *Pelophylax* (Fitzinger, 1843) pripadaju jednoj od najproučavanijih skupina žaba u Europi. Njihova je posebnost u tome što se jedinke nekih vrsta unutar roda *Pelophylax*, na mjestima gdje se njihovi areali preklapaju, mogu međusobno razmnožavati i davati plodno potomstvo, što je vrlo rijetka pojava u životinjskom svijetu.

Žabe imaju važnu ulogu u ekosustavima koje nastanjuju. Spona su između vodenih i kopnenih ekosustava (Unrine i sur. 2007) te čine velik dio biomase okoliša (Gibbons i sur. 2006). Važne su i zato što prenose nutrijente s nižih na više razine hranidbene mreže. Punoglavci i većina odraslih žabe hrane se beskralježnjacima i stoga su energetske učinkovite veze između beskralježnjaka i drugih kralježnjaka koji se hrane žabama (Sparling i sur. 2000).

Brojnost vodozemaca na globalnoj je razini u opadanju (Houlahan i sur. 2000.), stoga postoji sve veća potreba za razumijevanje uzroka tog problema kroz proučavanje njihove ekologije i ekotoksikologije. Polupropusna koža i složeni životni ciklus ih čini vrlo osjetljivima na promjene u okolišu (Sparling i sur. 2000). Određene vrste žaba imaju različite pragove tolerancije na različite ekološke faktore (Leuenberger i sur. 2014). Njihova prisutnost na staništu može biti pokazatelj stanja okoliša zbog smanjene mogućnosti širenja i ovisnosti o pogodnim staništima (Mayer i sur. 2013). Stoga vodozemci mogu biti osjetljivi pokazatelji promjena u biogeografskim procesima (Džukić i sur. 2003). Svaki poremećaj u okolišu može utjecati na populaciju žaba stoga su žabe dobri pokazatelji normalnog funkcioniranja ekosustava, ali i negativnog antropogenog učinka, tj. onečišćenja okoliša (Nowakowski i sur. 2010, Unrine i sur. 2007). Međutim, zbog smanjenja brojnosti, velik broj žabljih vrsta postao je ugrožen i zakonski zaštićen, što otežava njihova istraživanja (Simon 2011).

Kompleksnost međusobnog razmnožavanja različitih vrsta roda *Pelophylax* koje mogu, u većem ili manjem omjeru, dati plodno potomstvo, odražava se na izgled žaba. Izgled hibrida je vrlo varijabilan, što otežava determinaciju žaba na temelju morfoloških karakteristika te zahtijeva uporabu molekularnih metoda. Takve metode se danas sve više koriste u određivanju vrsta zbog male, ali postojane genske razlike (Domeneghetti i sur. 2013). Razjašnjenje nejasnih filogenetskih odnosa među vrstama roda *Pelophylax* i njihova točna determinacija vrlo su bitni za razumijevanje i očuvanje njihove raznolikosti koja je unutar roda još nedovoljno istražena (Pyron i Wiens 2011).

Na Mediteranu, a tako i na Balkanskom poluotoku, došlo je divergencije unutar roda *Pelophylax*, koja je dovela do velike raznolikosti vrsta (Plötner 2010). Balkanska batrahofauna stoga je bogata vrstama, ali je slabo proučavana (Džukić i Kalezić 2004). Iako su zelene žabe zbog hibridizacije jedne od najproučavanijih skupina žaba, na području Hrvatske su relativno slabo istražene. Hibridna zelena žaba *Pelophylax* kl. *esculentus* najistraživanija je hibridna vrsta i ujedno jedini takav kompleks u Hrvatskoj. Nastao je križanjem vrsta *P. lessonae* i *P. ridibundus* koje se

također nalaze u Hrvatskoj (Holsbeek i Jooris, 2010). Dosadašnja istraživanja upućuju na to da se na području sjeverne Hrvatske nalaze mješovite populacije *P. ridibundus* – *P. kl. esculentus* - *P. lessonae*, a na krajnjem jugu čiste populacije *P. ridibundus*. U Hrvatskoj su provedena lokalizirana istraživanja zelenih žaba na području Crne Mlake (Koska 2016., Korlević 2012.) i Bjelovarsko-bilogorske županije (Karaica i sur. 2016) koja su uključivala molekularnu identifikaciju vrsta. Ova istraživanja su obuhvatila relativno mala područja, stoga nedostaju podatci o žabama s većeg područja Hrvatske.

Mali broj provedenih molekularno-filogenetičkih istraživanja žaba roda *Pelophylax* u Hrvatskoj zahtijeva intenziviranje takvih istraživanja kojima će se obuhvatiti veći dio areala na kojem dolaze žabe ovog roda s ciljem potpunijeg uvida u vrste žaba roda *Pelophylax* koje nalazimo u Hrvatskoj, njihovu rasprostranjenost te tipove i učestalost njihove hibridizacije.

1.1. Razred Amphibia

Vodozemci predstavljaju jedinstveni evolucijski model koji prikazuje prelazak životinja iz vode na kopno i time prikazuje evolucijski položaj između riba i gmazova i način na koji je skupina postala prilagođena na nove uvjete. Potomci su prvih kopnenih kralježnjaka i fiziološki se izrazito razlikuju od ostalih kralježnjaka. Ime su dobili po grčim riječima „*amphi*“ i „*bios*“, što znači dvostruki život jer su tijekom života vezani za kopno i za vodu te se oslanjaju na vodu više od ostalih skupina kopnenih kralježnjaka. Svi vodozemci su monofiletska skupina, što je dokazano morfološkim i molekularno filogenetičkim istraživanjima i dijele zajedničke karakteristike, kao što je vlažna i permeabilna koža (Hillman 2009). Rasprostranjeni su na svim kontinentima osim Antarktike, a bogatstvo vrsta je predodređeno regionalnom povijesti i utjecajem voda i temperature (Buckely i Jetz 2007). Zajedničko je ime svih modernih vodozemaca Lissamphibia („*liss*“ na grčkom znači glatko). Svi vodozemci u skupini Lissamphibia dijele svojstvo glatke kože koje ih razdvaja od ostalih tetrapoda koji su u doba njihovog razvoja imali dermalni oklop (Pough 2009). Današnji vodozemci su podijeljeni u tri skupine: Anura (Bezrepci, žabe), Caudata (repaši) i Gymnophiona (beznošci). Poznato je oko 7,800 vrsta (Amphibia web; <https://amphibiaweb.org/>, siječanj 2018). San Mauro i sur. (2005) zaključuju da svi danas živući vodozemci potječu iz paleozoika, prije raspada Pangee i nakon divergencije mesoperki-Sarcopterigii. Beznošci su se vjerojatno odvojili od zajedničkog pretka prije otprilike 367 milijuna godina, dok su se repaši odvojili prije otprilike 357 milijuna godina, što se slaže sa „Batrachia“ teorijom da su beznošci i bezrepci sestrinski taksoni (Frost 2006, Pyron i Wiens 2011). Tu teoriju uz molekularne markere potvrđuju i morfološke analize (Meyer i Zardoya 2003). Preko fosila i živih vrsta znanstvenici danas pokušavaju prikazati srodstvo današnjih vrsta uz pomoć morfologije, a zatim sve više i preko molekularnih analiza, pokušavajući shvatiti koji mehanizmi dovode do ubrzavanja ili usporavanja divergencije između srodnih životinja (Bromham 2009). Vrste vodozemaca su brzo

divergirale (nakon raspada Pangea-e), stoga se ne nalazi veliki broj fosila iz toga doba (San Mauro i sur. 2005). Brza divergencija potaknuta ključnim morfološkim promjenama stvorila je „rupe“ u fosilnom zapisu, stoga je otežana interpretacija njihovih odnosa i nužno ju je nadopuniti preko molekularnih metoda (Mayer i Zardoya 2003.).

1.2. Red Anura

Rijetki fosili iz trijasa kao što su *Triadobatrachus massinoti* iz Madakaskara (Ascarrunzo i sur. 2016, Piveteau, 1936) i *Czatkobatrachus polonicus* iz trijasa iz Poljske (Evans i Borsuk-Białynicka, 1998) pokazuju kako su izgledali precij vodozemaca koji dijele dugu evolucijsku povijest. *Triadobatrachus* pokazuje sličnost građe kostura s današnjim bezrepcima, ali je imao prekratke noge pa nije imao sposobnost skakanja kao današnji bezrepci.

San Mauro i sur. (2005) ističu da se prvo razdvajanje danas živućih taksona dogodilo također prije razdvajanja Pangee, gdje su se odvojile žabe podreda *Archaeobatrachia* i *Mesobatrachia*. Ostale porodice su svrstane u podred *Neobatrachia*, čije se odvajanje dogodilo prije otprilike 200 milijuna godina (Iritsari 2012). Taj podred broji najviše živućih vrsta unutar reda Anura, preko 96% raznolikosti bezrepaca. Podijeljen je u dvije nadporodice (*Ranoidea* i *Hylodea*). Nastanak tih porodica se dogodio prije oko 65 milijuna godina za *Ranoidea* i 95 milijuna godina za *Hylodea*, dakle nakon razdvajanja Gondvane (San Mauro i sur. 2005).

Morfološke razlike kao što su izgled pojedinih kralježaka, izgled prsnog koša, raspored mišića, morfologija punoglavaca i razlike u ponašanju, kao i ekološke razlike koriste se za definiranje razlika između određenih rodova i vrsta ove skupine (Pough i sur. 1998). Danas se usporedbom molekularnih metoda može doći do točnijih podataka o srodstvu koji daju potpuniju sliku njihovih odnosa (Frost 2006).

Bezrepci su zasigurno najuspješnija skupina unutar razreda *Amphibia*, što možemo povezati s boljim lokomotornim sustavom i morfologijom koja im omogućava bolje kretanje. Bezrepci su dobili ime zbog činjenice da u odrasloj fazi života nemaju rep (grč. „*an*“ - bez i „*oura*“ - rep). Glavna karakteristika koja ih odvaja od drugih vodozemaca je sposobnost skakanja. Za to imaju mnoge prilagodbe, kao što su produljeni udovi, jaki mišići i spojene kosti donjeg dijela kralježnice - urostil. Oči su im velike i smještene naprijed što im omogućuje binokularni vid. Za razliku od repaša i beznošca koji plivaju kao ribe, bezrepci plivaju kretanjem udova, dok se na kopnu kreću skakanjem ili „hodaњem“ što im daje prednost u usporedbi sa bezrepcima i repašima. Unutar same skupine postoji velika raznolikost, što se odražava i na njihovu široku rasprostranjenost diljem svijeta, od tropskih šuma do nekih pustinjaških regija (Pough 2009). Za razliku od manjeg broja vrsta beznošca i repaša, bezrepci broje 42 porodice i oko 5300 vrsta (Frost i sur. 2006).

Reprodukcijska specijalizacija je vrlo velika. Oplođena jaja se razvijaju u ličinke ili punoglavce prilagođene na život u vodi. Kasnije se razvijaju u kopneni oblik gdje su im dostupni novi resursi. Tijekom ličinačkog stadija nemaju noge nego samo rep koji gube u metamorfozi kada dobivaju prvo stražnje pa onda i prednje noge. Svi odrasli vodozemci su mesojedi i imaju raznoliku prehranu (Pough, 2009). Mogu čak pojesti žabe iste ili druge vrste, ali i životinje više taksonomske razine kao što su glodavci (Ruchin i Ryzhov, 2002). Širina čeljusti važna je karakteristika za izbor plijena (Pough, 2009).

Oblik žabe varira o njenom staništu i prehrambenim navikama. Vrste s kraćim nogama kreću se skokovima manjih dužina u potrazi sa plijenom, dok su vrste dužih nogu sjedilačke i tako čekaju plijen. Hrane se uz pomoć snažnog ljepljivog jezika koji je spojen s prednje strane čeljusti. Neke vrste su vješti penjači i imaju adhezivne prste. Izgled vrste može se razlikovati po duljini njihovih prednjih i stražnjih nogu. Tijekom sezone parenja mužjaci se glasaju da bi privukli ženke, ali se na taj način izlažu opasnosti od predatora. Mužjaci se tokom sezone parenja uhvate za ženku i ostaju na njoj dok nije spremna za parenje. Taj položaj se zove amplexus (Pough, 2009).

1.3. Porodica Ranidae

Porodica Ranidae (prave žabe) je najrasprostranjenija porodica s 1400 opisanih vrsta, svrstanih u 13 potporodica (Pyron i Wiens, 2011). Fosilni nalazi datiraju iz Oligocena (Hollman 1998), a prisutni su na svim kontinentima, osim Antartici. U Europi, Africi i Aziji nalazimo najveće bogatstvo fosilnih vrsta, dok je porodica Hylidae bogatija na ostalim kontinentima (Wiens i sur. 2009).

Zelene žabe bile su svrstane sa smeđim žabama unutar roda *Rana*, gdje su bile smještene u podrod *Pelophylax* (Fitzinger 1843). Danas su one, prvenstveno zahvaljujući molekularnim analizama, izdignute na razinu roda, što je potvrdilo Fitzingerovu hipotezu (Frost i sur. 2006). Stuart (2008) tvrdi da zelene žabe uopće ne pripadaju potporodici Raninae, no to još uvijek nije potvrđeno.

Europske vrste žaba imaju uzak struk, glatku kožu i duge noge. Sve nativne vrste možemo podijeliti u dvije skupine: zelene i smeđe žabe. Zelene žabe, kao i smeđe, dobro su prilagođene za plivanje, dok se na kopnu kreću skakanjem (Holman 1998). Zelene žabe su društvenije u odnosu na smeđe žabe pa tako i glasnije. Uobičajeno su akvatične ili ih možemo naći u blizini vodenih tijela zbog čega su dobile i ime vodene žabe (eng. „water frogs“), dok smeđe žabe preferiraju vlažna terestrična staništa. Zelene žabe otpornije su na antropogeni utjecaj te ih stoga možemo naći i u urbaniziranim dijelovima (Nowakowski i sur. 2010). Po izgledu se razlikuju od smeđih žaba pa im tako nedostaje tamna maska s obje strane glave i imaju vanjske zvučne mjehure postavljene postrano na glavi mužjaka. Te karakteristike nisu izražene kod mladih metamorfoziranih jedinki, stoga ih je

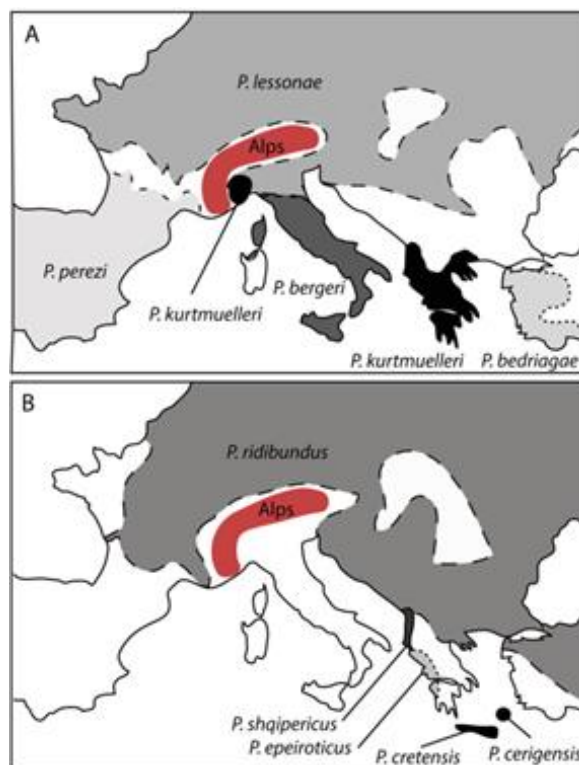
teže determinirati (Arnold i Ovenden 2004). Odrasle ženke su u prosjeku veće od mužjaka, dok obojenja zelenih žaba znaju izrazito varirati, što otežava njihovu determinaciju.

1.4. Rod *Pelophylax*

Fosilni nalazi roda *Pelophylax* datiraju još od oligocena. Međutim, fosile je teško razlikovati i zbog velike osteološke sličnosti i zbog postojanja hibrida između vrsta, stoga su nalazi imenovani pod *Rana* (*Pelophylax*) sp., kada se determiniraju vrste *R. ridibunda*, *R. esculenta* i *R. lessonae*. Vrste unutar roda *Pelophylax*, ali i *Rana* usporedno su se razvijale na području velikog dijela Europe te stoga njihove fosile nalaze nalazimo u pliocenu i pleistocenu, kao što je vrsta *P. lessonae*, ali i *R. arvalis* i *R. temporaria*. U Hrvatskoj je poznato više fosilnih nalaza vrsta *Rana* sp., kao što su špilje Veternica, Velika i Romualdova (Hollman 1998).

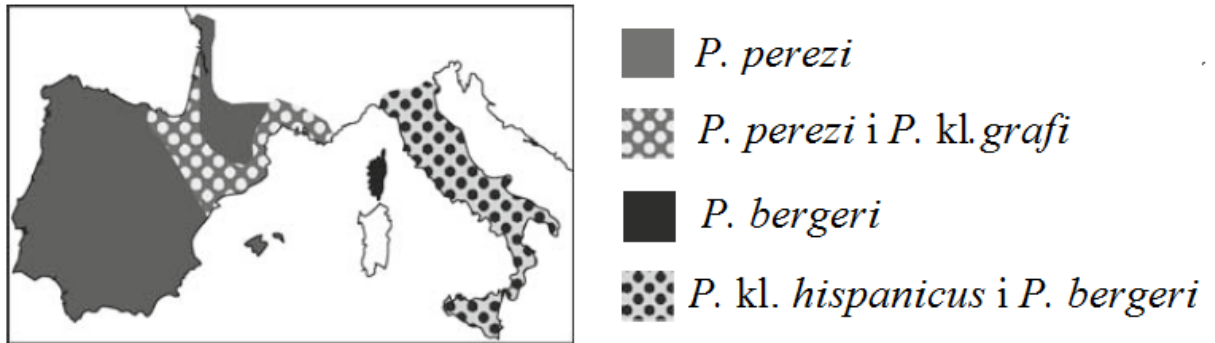
Kompleksna geološka povijest istočnog Mediterana zasigurno je odigrala veliku ulogu u rasprostranjenosti životinja. Geološki događaji kao što su razdvajanje ili spajanje kopna mogu uzrokovati širenje ili izolaciju različitih taksona, pa tako i zelenih žaba. Nemogućnost prelaska preko mora jedna je od karakteristika žaba i ostalih vodozemaca, koja ih čini dobrim modelima za biogeografska istraživanja i hipoteze o nastanku vrsta specijacijom. Takva specijacija u miocenu (prije otprilike 15 milijuna godina) dovela je do nastajanja triju linija unutar vrsta zelenih žaba koje su rasprostranjene u Europi. To su *perezi* linija, *lessonae* linija i *ridibunda/bedrigae* linija (Lymberakis i sur. 2007).

Od svih vrsta roda *Pelophylax* u Europi je prisutno 10 „čistih“ vrsta i 3 hibridne vrste (Arnold i Ovenden 2004). Na području Balkana prisutno je 6 vrsta. *P. lessonae* (Camarano, 1882) mala zelena žaba i *P. kl. esculentus* (Linnaeus, 1758) naseljavaju većinu Europe, a južni dio njihovog areala dolazi do kontinentalne Hrvatske. Velika zelena žaba *P. ridibundus* (Pallas, 1771) naseljava cijeli balkanski poluotok, dok *P. shqipericus*, (Hotz, Uzzell, Guenther, Tunner & Heppich, 1987) albanska zelena žaba naseljava Crnu Goru i Albaniju. *P. kurtmuelleri* (Gayda, 1940) naseljava Grčku i Albaniju (Amphibia web) i jedan manji dio sjeverne Italije (Bellati i sur. 2001), a *P. epeiroticus* (Schneider, Sofianidou and Kyriakopoulou-Sklavounou, 1984) zapadnu obala Grčke i južni dio Albanije (Speibroeck i sur 2016) (Slika 1).



Slika 1: Geografska distribucija „čistih“ vrsti roda *Pelophylax* u Europi i Bliskom Istoku (A), *P. bergeri*, *P. bedriagae*, *P. kurmuelleri*, *P. lessonae* i *P. perezi*; B), *P. cerigensis*, *P. cretensis*, *P. epiroticus*, *P. ridibundus* and *P. shqipericus*). Preuzeto iz Dubey i sur. 2014

Rod *Pelophylax* ima posebnost što postoje 3 tri hibridna kompleksa unutar roda. Hibridni kompleksi su: *P. kl. esculentus*, *P. kl. grafi* i *P. kl. hispanicus* (Arnold i Ovenden 2004) (Slika 2, 3). Ti hibridi mogu stvarati plodno potomstvo s roditeljskim jedinkama. Hibridna jedinka, prilikom parenja s roditeljskom vrstom, odbacuje jedan set kromosoma te stoga spolne stanice sadrže samo kromosome (genom) jedne vrste. Budući da u takvom parenju nema rekombinacije genoma, takvo je razmnožavanje hemiklonalno. Takve jedinke zapravo nisu prave vrste jer su ovisne o roditeljskim vrstama te im se stoga ne daje dvoimeno nazivlje, a između imena roda i vrste se stavlja dodatak „kl.“ (grč. *klépt(ēs)* „lopov“). Žabe koje se pare hibridogenetski „kradu“ kromosome od vrste s kojom se pare jer u takvom parenju nastaje samo hibridogenetska vrsta (Arnold i Ovenden 2004).



Slika 2: Geografska distribucija hibridnih vrsti, u Europi, od *P. kl. grafi* i *P. kl. hispanicus*, te njihovih roditeljskih vrsti, *P. perezi* i *P. bergeri*. Preuzeto i prilagođeno iz Holsbeek i Jooris 2010.

Do sada su u Hrvatskoj provedena molekularno-filogenetička istraživanja zelenih žaba na području Crne Mlake i Bjelovarsko-bilogorske županije. Korlević (2012) i Koska (2016) su na području Crne Mlake žabe determinirali analizom jezgrine DNA. Korlević (2012) je potvrdila da se na područjima Crne Mlake nalaze vrste male i velike zelene žabe, dok je Koska (2016), uz navedene vrste, potvrdila i prisutnost balkanske i albanske zelene žabe, *P. kurtmulleri* i *P. shqipericus* te hibrida *P. kurtmuelleri* x *P. shqipericus*. Nove vrste također su stvarale hibride koji su još neopisani za ovo područje, a to su *P. shqipericus* x *P. ridibundus*, *P. ridibundus* x *P. kurtmuelleri* te *P. lessonae* x *P. kurtmuelleri*. Uz velik broj različitih hibrida na lokalitetu su potvrđene i jedinke koje pripadaju roditeljskim vrstama.

Karaica i sur. (2016.) su utvrdili *P. lessonae*, *P. ridibundus* i *P. kl. esculentus* na području Bjelovarsko-bilogorske županije preko molekularnih metoda i usporedili morfološke i morfometrijske karakteristike žaba, kao i analizirali sadržaj prehrane. Zaključuju da roditeljske vrste imaju različite morfološke karakteristike dok hibridna vrsta ima veliku varijabilnost koja se preklapa s roditeljskim vrstama, dok pojedine karakteristike hibrida mogu sličiti samo jednoj roditeljskoj vrsti. Analizom prehrane zaključuju da su kukci glavni dio njihove prehrane i da preferencija plijena *P. kl. esculentus* slični *P. lessonae*.

1.5. Sistematika roda *Pelophylax*

Drugo ime za zelene žabe roda *Pelophylax* je paleoarktičke vodene žabe (eng. *Paleoartic water frogs*). Rod se može podijeliti na dalekoistočnu i na zapadnu (europsku) skupinu koja je i najistraživanija unutar porodice Ranidae. Svi filogenetički odnosi unutar skupine nisu razriješeni, stoga je status nekih vrsta još upitan (Lymberkai i sur. 2007).

Sistematika roda *Pelophylax*, Fitzinger 1843, prikazana je prema National Center for Biotechnology Information – NCBI:

- Koljeno Chordata – svitkovci
- Potkoljeno Craniata – lubanjci Vertebrata, Gnatostomata – Čeljustousti, Teleostomi, Euteleostomi, Sarcopterygii, Dipnotetrapodomorphy, Tetrapoda
- Razred Amphibia – Vodozemci
- Nadred Batrachia
- Red Anura – Bezrepci
- Podred – Neobatrachia
- Nadporodica – Ranoidea
- Porodica – Ranidae – prave žabe
- Rod – *Pelophylax* – zelene žabe

Starija literatura svrstava sve vrste roda *Pelophylax* kao rod *Rana* (primjerice *Rana ridibunda* ili *Rana lessonae*), međutim molekularnim metodama se dokazalo da zelene žabe spadaju u poseban rod, stoga će se u ovom radu tako navoditi (*P. ridibundus* i *P. lessonae*). Do sada je opisano 23 vrsta unutar roda *Pelophylax* te tri klepton vrste (Amphibia web 2017)

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 cypriensis (Plötner, Baier, Akın, Mazepa, Schreiber, Beerli, Litvinchuk, Bilgin, Borkin, and Uzzell, 2012)

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)

Klepton vrste (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. perezii* × *P. ridibundus*)

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

1.6. Hibridogeneza

Pojam hibridogeneza označava način razmnožavanja životinja križanjem roditeljske vrste s hibridom gdje se stvara plodno hibridno potomstvo. Taj pojam je uveo Schultz (1969) u svom radu o ribama roda *Poeciliopsis* koje posjeduju takav način razmnožavanja. Potomci takvog interspecijesnog razmnožavanja imaju različite reproduktivne sposobnosti. Moguća je sterilnost hibrida, isključivanje jednog parentalnog genoma gdje ne dolazi do rekombinacije ili normalna gametogeneza s rekombinacijama (Quilodrán i sur. 2014). Razmnožavanje između vrsta pri čemu nastaju fertilni hibridi, može više povećati gensku raznolikost nego što se ona povećava kroz mutacije (Holsbeek i Jooris 2010). Takva prirodna hibridizacija dovodi do uvođenja novih gena i miješanja sa genskim zalihama i genskom raznolikosti (Hofmann i sur. 2015). Smatra se da populacije s povećanom genskom raznolikošću mogu bolje podnositi i prilagoditi se na različite bolesti i negativne promjene u okolišu (Holsbeek i Jooris 2010).

Hibridi nastali evolucijskim procesima kvalificirani su za zaštitu u slučaju ugroženosti, dok hibridi koji su nastali posredovanjem čovjeka nisu, te je stoga bitno razlikovanje prirodnih i antropogenih hibrida (Allendorf i sur. 2001). Antropogeni hibridi nastaju premještanjem vrsta u novo stanište gdje se nalazi njihova blisko srodna vrsta. Na taj način, neprikladnom hibridizacijom, stvara se pritisak na autohtonu vrstu, što može dovesti do njezinog nestanka (Rhymer i Simberloff 1996), a to pogotovo utječe na vrste s lokalnom distribucijom (Domeneghetti i sur. 2013). Unutar takvih hibridnih populacija može se javiti pad u brojnosti, jer se reproduktivna energija troši na potomke smanjene sposobnosti za preživljavanje ili sterilne potomke (Rhymer i Simberloff 1996).

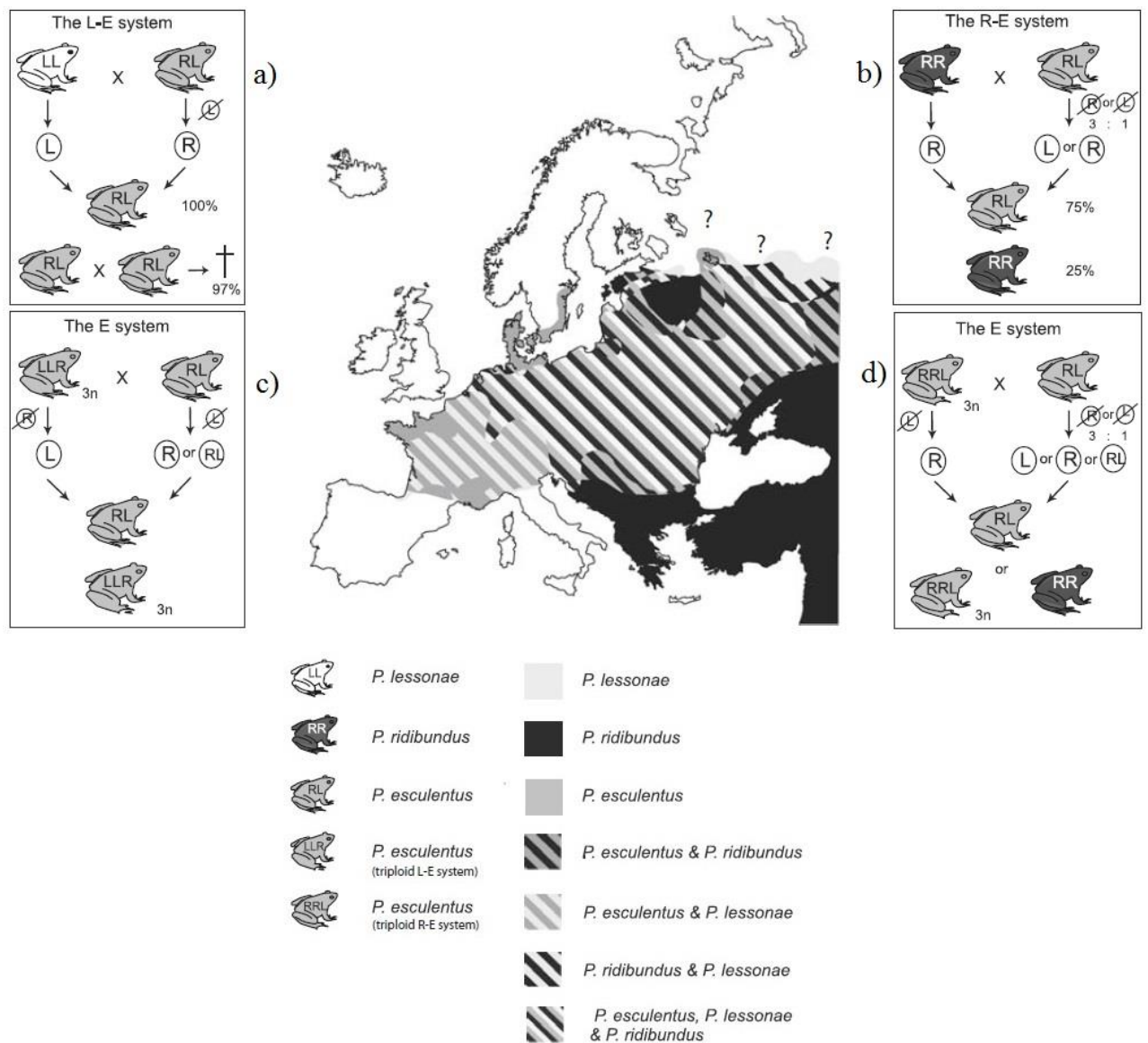
Pelophylax kl. *esculentus* hibridni kompleks je primjer prirodnog hibridogenetskog razmnožavanja. Sačinjavaju ga roditeljske vrste *P. lessonae* (genotip LL) i *P. ridibundus* (genotip RR) i hibridna vrsta *P. kl. esculentus* (genotip LR). Gametogeneza unutar tog kompleksa nije uvijek jednaka jer pokazuje geografske varijacije i može se podijeliti na 3 sustava razmnožavanja (Holsbeek i Jooris 2010):

- **L – E sustav:** *P. lessonae* – *P. kl. esculentus*
- **R – E sustav:** *P. ridibundus* – *P. kl. esculentus*
- **E sustav:** *P. kl. esculentus* (čiste hibridne populacije)

LE sustav razmnožavanja sadrži vrste *P. lessonae* i *P. kl. esculentus*, a nastao je hibridizacijom između vrsta *P. ridibundus* i *P. lessonae* i danas je najširi i najproučavaniji sustav unutar hibridnog kompleksa (Slika 3). Tokom hibridogeneze *P. kl. esculentus* ne stvara gamete vrste *P. lessonae*, već samo gamete vrste *P. ridibundus* tako da sa razmnožavanjem s vrstom *P. lessonae* nastaju samo jedinke *P. kl. esculentus*. Hibridi tako nastaju svaki put povratnim križanjem s roditeljskom vrstom koja je u ovom slučaju *P. lessonae*. Posljedica toga je izostanak promjene genoma *P. ridibundus* koji

se uvijek prenosi iz hibridnih jedinki i ne mijenja se genetički, tj. prenosi se klonalno (Holsbeek i Jooris 2010). Tijekom parenja dviju hibrida u 97% slučajeva dolazi do nastanka *P. ridibundus* punoglavaca s teškoćama u razvoju, koji završavaju smrću prije spolne zrelosti (Graf i Polls Pelaz 1989), što je rezultat nakupljanja recesivnih delecija. Javlja se zato jer se *P. ridibundus* genom prenosi klonalno i ne postoje rekombinacije tijekom spolnog razmnožavanja. U ostalih 3% slučajeva punoglavci *P. ridibundus* prežive i dosegnu spolnu zrelost. Svi punoglavci su ženke budući da se prvobitna hibridizacija dogodila između mužjaka *P. lessonae* i ženke *P. ridibundus* (Berger 1970), gdje se prenosi X kromosom unutar R genoma. Takav postotak od 3% se odnosi na razmnožavanje hibrida s istim klonalnim genomom, dok u slučaju razmnožavanja hibrida različitog genoma, u ovom slučaju *P. ridibundus*, punoglavci preživljavaju (Vorburger 2001, Geux i sur. 2002). *P. ridibundus* jedinke, nastale od hibrida s klonalnim genomom nadalje se razmnožavaju s *P. kl. esculentus* ili *P. lessonae* mužjacima budući da u LE sustavu nema *P. ridibundus* mužjaka. S time se javlja nova linija R genoma i hibrida obzirom da se u *P. ridibundus* jedinkama tijekom gametogeneze događa rekombinacija i smanjuje se postotak recesivnih delecija, što će se daljnjim razmnožavanjem odraziti na bolji fitness cijele populacije (Som i Reyer 2006).

Budući da se prvobitna hibridizacija dogodila između *P. ridibundus* ženke i *P. lessonae* mužjaka, očekuje se da će hibridne jedinke imati *P. ridibundus* mitohondrijsku DNA (Berger 1970), međutim to nije uvijek slučaj, jer većina sadrži mitohondrijsku DNA *P. lessonae* (Spolsky i Uzzell 1984). Moguća su dva objašnjenja te pojave. Prva je da se prvobitna hibridizacija dogodila između *P. lessonae* ženke i *P. ridibundus* mužjaka što je suprotno očekivanju zbog veličinske razlike, dok je druga mogućnost da je unutar LE populacije češće križanje između *P. lessonae* ženke i *P. kl. esculentus* mužjaka. Obje mogućnosti u konačnici rezultiraju sa hibridnim jedinkama *P. lessonae* mitohondrijske DNA (Spolsky i Uzzell 1984) te je takva introgresija nepovratna (Plötner i sur. 2008). Preko hibrida sa mitohondrijskom DNA *P. lessonae* se dogodila daljnja introgresija u *P. ridibundus* jedinke. Prva mogućnost jest križanje između dva hibrida s *P. lessonae* mitohondrijskom DNA gdje nastane mali broj preživjelih *P. ridibundus* jedinki, dok je druga križanje između ženke hibrida s *P. ridibundus* mužjakom.



Slika 3. Geografska distribucija različitih sustava križanja žaba roda *Pelophylax*. a) L – E sustav: Hibridne jedinice stvaraju isključivo *P. ridibundus* gamete, b) R – E sustav: Hibridne jedinice stvaraju *P. lessonae* i *P. ridibundus* gamete u omjeru 3:1, c) i d) E sustav: Čiste hibridne linije gdje se javljaju diploidne i triploidne jedinice (RRL i LLR). Triploidi proizvode haploidne gamete dok diploidi mogu proizvoditi diploidne i haploidne gamete. Preuzeto i prilagođeno iz Holsbeek i Jooris, 2010.

RE sustav sadrži vrste *P. ridibundus* i *P. kl. esculentus* (Slika 3). Sličan je LE sustavu, samo što se ne događa potpuna ekskluzija drugog genoma (kao LE sustavu *P. lessonae* genom), nego se odbacuje u omjeru 3:1. To znači da će se većinom proizvoditi *P. lessonae* gamete i nastajati mužjaci hibridi, dok će se u manjem dijelu proizvoditi *P. ridibundus* gamete, gdje će nastati *P. ridibundus* ženke (Uzzell i sur. 1977). Za taj fenomen u RE sistemu Vinogradov i sur. (1991) su predložili ime amfispermija.

E sustav sadrži samo hibridne jedinke koje se međusobno razmnožavaju (Slika 3). Prilagodba na nedostatak roditeljskih jedinki je postojanje triploida koji su preuzeli ulogu roditeljskih jedinki. U hibridnoj populaciji najčešće se nalaze diploidne ženke i triploidni mužjaci (Christiansen 2009). LLR triploid, najčešće mužjak, donira *P. lessonae* gamete jer se u njima *P. ridibundus* genotip odbacuje, a *P. lessonae* dalje mitotski dijeli i stvara nove kombinacije genoma. (Christiansen i sur. 2005; Uzzell i sur. 1980). Diploid stvara diploidne gamete genotipa RL i haploidne R gamete. Obje gamete se dalje pare sa L gametama gdje nastaje nova generacija diploidnih i triploidnih jedinki. Roditeljske vrste su pronađene među takvim hibridnim populacijama, međutim samo u juvenilnom stanju, jer nikad ne dosegnu metamorfozu (Berger 1988). Iako hibridne populacije mogu opstati bez roditeljskih jedinki, protok gena između hibrida i njih postoji jer se u blizini nalaze populacije sa LE, RE ili REL jedinkama (Plötner 2005).

REL sustav sadrži sve 3 vrste *P. esculentus* kompleksa. One se mogu međusobno razmnožavati i stoga je moguće da unutar populacije postoji i do 5 različitih genotipova: LL, LLR, LR, LRR i RR (Hofmann i sur. 2015).

1.7. Pregled očekivanih vrsta i hibrida na području istraživanja

Prema literaturnim podacima (Holsbeek i Jooris 2010) u Hrvatskoj se nalaze 2 vrste, *Pelophylax lessonae* i *P. ridibundus* i jedan hibridni kompleks, *Pelophylax* kl. *esculentus*. Recentna molekularna istraživanja (Koska 2016, Korlević 2012) ukazala su na postojanje *P. shqipericus* i *P. kurtmuelleri*, njihovih međusobnih hibrida kao i njihovih hibrida s nativnim vrstama na Crnoj Mlaci, ali i potencijalno na drugim lokalitetima. Ponađeni hibridi su *P. kurtmuelleri* x *P. shqipericus*, *P. shqipericus* x *P. ridibundus*, *P. ridibundus* x *P. kurtmuelleri* te *P. lessonae* x *P. kurtmuelleri*.

1.7.1. *Pelophylax lessonae*

Mala zelena žaba je rasprostranjena diljem Europe. Areal joj seže od Francuske i Italije s istočne strane pa sve do Rusije i Latvije na sjeveru (Slika 1). Postoje i izolirane populacije u Švedskoj, Norveškoj i Finskoj. Južni dio areala seže sve do Italije i sjevernog dijela Balkana gdje i završava kod Hrvatske, Srbije i Rumunjske (Speibroeck 2016). Moguće je da je nativna vrsta u Engleskoj, ali je vjerojatnije da je tamošnja vrsta introducirana (Arnold i Ovenden 2004).



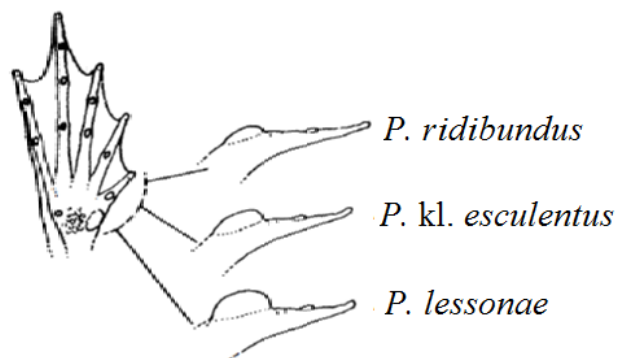
Slika 4. *Pelophylax lessonae* (mala zelena žaba)

Odrasle jedinke su obično do 8 cm dužine i oštre njuške, što ih čini manjima od vrsta *Pelophylax* kl. *esculentus*, iako su slične po izgledu (Slika 4). Rezonatori su bijele boje, dok bedra mogu biti žuta, narančasta, smeđa ili crna. Stražnje noge su kraće i peta ne dolazi preko očiju ako se ispruži za determinaciju (Slika 5). Metatarzalna kvržica velika, tvrda i polukružna, obično više od pola duljine prvog palca (Slika 6). Tijelo žabe je dorzalno obojeno različitim tonovima zelene boje, a ponekad i smeđa na donjem dijelu tijela, ovisno o jedinci, prošarana sa tamnim mrljama na nogama i donjem dijelu tijela i ima glatku i sjajnu kožu. Populacije u sjevernom dijelu areala su tamnije obojene. Dorzolateralni nabori su bljeđi, a na nekim jedinkama se vidi i ledna pruga. Ventralna strana je obojena bijelo, ponekad sa sivim mrljama, dok je oko područja kukova žućkasta. Mužjaci za vrijeme parenja mogu poprimiti uniformno zeleno žuto obojenje i zlatnožute oči (Arnold i Ovenden 2004).



Slika 5. Određivanje duljine noge žaba roda *Pelophylax*. Kraće noge koje sežu do oka obično imaju *P. lessonae* dok noge koje sežu do njuške i preko nje imaju jedinke vrste *P. ridibundus*.

Može ih se naći do 1500 m nadmorske visine i najviše obitavaju u dobro osunčanim malim vodenim tijelima kao što su mala jezera, potopljeni jarci ili rubovi močvara. Imaju diurnalni ritam, iako ponekad znaju biti i aktivne noću kada se hrane izvan vode. Najčešće žive u simpatiji s *Pelophylax* kl. *esculentus*, iako ih ponekad možemo naći i s *P. ridibundus*. Glasaju se slično kao *P. ridibundus*, ali s manje rezonacije i jasnije. Žive 6-12 godina i hiberniraju na kopnu (Arnold i Ovenden 2004). Prema IUCN-u vrsta je pod kategorijom LC (eng. *least least concern*), dok u Hrvatskoj ima status strogo zaštićene vrste.



Slika 6. Prikaz različitih oblika metatarzalnih kvržica stražnjih nogu kod *P. ridibundus*, *P. kl. esculentus*, *P. lessonae*. Preuzeto iz Arnold i Ovenden 2004.

1.7.2. *Pelophylax ridibundus*

Areal velike zelene žabe (*P. ridibundus*) seže od istočne Europe i Balkanskog poluotoka pa sve do zapadnoga dijela Francuske (Slika 1). Postoji i introducirana populacija u Engleskoj (Arnold i Ovenden 2004).

Odrasle su jedinke prosječno duge 15 cm, ali mogu dosežati i do 18 cm (Slika 7). Velika zelena žaba je najveća i najrobusnija nativna žaba u Europi. Rezonatori su tamni, dok su im bedra obojana sivo ili bijelo. Stražnje noge su duge i mogu se ispružiti preko njuške, ako se ispruži za determinaciju (Slika 5). Metatarzalna kvržica je niska i manja od pola dužine prvog palca (Slika 6). Varijabilno je smeđe ili zeleno obojana s dorzalne strane sa tamnim mrljama i grubom kožom. Prisutni su dorzolateralni nabori i ponekad ledna pruga. Varijacije su inducirane okolišem, stoga različite veličine ili obojenja iste vrste nisu rijetke (Speibroeck 2016).



Slika 7. *Pelophylax ridibundus* (velika zelena žaba)

Društvena je životinja i živi u jezerima, rijekama i velikim vodenim tijelima gdje ju često možemo naći kako se sunča uz vodu. Živi do 2000 metara nadmorske visine. Glasa se danju i noću tijekom reproduktivne sezone u proljeće, ali i tijekom ljeta. Diurnalna je, iako se može naći tijekom noći u blizini vodenog tijela. Teritorijalna je, hibernira u vodi i živi do 11 godina (Arnold i Ovenden 2004). Prema IUCN-u vrsta je pod kategorijom LC (eng. *least concern*), dok u Hrvatskoj nema status strogo zaštićene vrste.

1.7.3. *Pelophylax kl. esculentus*

Zelena žaba (*P. kl. esculentus*) je hibridna vrsta nastala križanjem vrsta *P. ridibundus* i *Pelophylax lessonae*. Njezin genotip je RL (križanje RR x LL), no uz diploidan oblik možemo je naći u triploidnom obliku (RRL ili RLL) (Holsbeek i Jooris 2010). Nalazimo je od istočne Europe i sjevera Balkanskog poluotoka pa sve do središnjeg i sjevernog dijela Francuske (Slika 3). Često dijeli stanište s jednom ili obje roditeljske vrste, no možemo je i naći samostalno u „čistim“ hibridnim populacijama.



Slika 8. *Pelophylax kl. esculentus* (zelena žaba)

Žaba je srednje veličine i može narasti do 10 cm (Slika 8). Glatke i sjajne kože s bijelim, sivim ili crnim rezonatorima kod mužjaka. Obojenje može znatno varirati. Leđna pruga obično prisutna, dok je boja tijela svijetlo ili tamno zelena ili smeđe s crnim mrljama po tijelu i nogama. Stražnja noga obično seže do njuške, a metatarzalna kvržica je asimetrična (Slika 6).

Može se naći od malih do velikih vodenih tijela do 1500 m nadmorske visine. Tijekom dana često izlazi van, ali je aktivna i noću. Može hibernirati u vodi i na kopnu. Glasanje je po akustičnim karakteristikama između roditeljskih vrsta.

1.7.4. *Pelophylax shqipericus*

Albanska zelena žaba (*P. shqipericus*, Slika 9) naseljava vrlo malo područje na zapadnoj obali Albanije i južni dio Crne Gore (Speibroeck 2016) (Slika 1), a donešena populacija postoji u središnjoj Italiji (Domeneghetti i sur. 2013.) i u Hrvatskoj na području Crne Mlake (Koska 2016, Korlević 2012). Naraste do 7.5 cm i slična je *P. lessonae* (Slika 4). Rezonatori su sivi ili maslinasto zeleni. Noge su umjereno duge. Metatarzalna kvržica velika, zaobljena i nagnuta prema stopalu. Velika je otprilike 40% dužine prvog palca. Dorzalna strana je kod mužjaka zelena ili smeđa dok su ženke svjetlosmeđe ili maslinaste. Oba spola imaju tamne mrlje na leđima, a ponekad se javi i leđna pruga. Koža im je glatka i sjajna. Ventralna strana je bijela s tamnim mrljama, dok po kukovima ima žuto obojenje. U vrijeme sezone parenja, mužjaci znaju poprimiti travnato zelenu ili maslinasto žutu boju (Arnold i Ovenden 2004).



Slika 9. *Pelophylax shqipericus*

Stanište joj se nalazi 60 kilometara od obale, gdje obitava u nizinama unutar vodenih tijela kao što su močvare, potopljeni jarci i spore rijeke. Speibroek i sur. (2016) tvrde da vrsta samo živi s vrstom *P. ridibundus*, iako je Vucić (2015.) utvrdio da vrsta živi na području Skadarskog jezera sa vrstom *P. kurtmuelleri* i da stvaraju hibride. Naseljava vodene kanale s puno vegetacije do 500 m nadmorske visine, ali i rijetko obrasla jezera. Može se često naći uz vodu gdje se sunča (Arnold i Ovenden 2004). Prema IUCN-ovoj listi *P. shqipericus* ima status ugrožene vrste (EN – *Endangered*).

1.7.5. *Pelophylax kurtmuelleri*

Status balkanske zelene žabe (*P. kurtmuelleri*) je još uvijek upitan jer neki autori tvrde se radi o podvrsti *P. ridibundus* (Speibroeck 2016, Jablonski 2011). Međutim *P. kurtmuelleri* je od vrste *P. ridibundus* odvojena na temelju akustičnih razlika i morfoloških karakteristika (Džukić i sur. 2003). Vrlo je slična vrsti *P. ridibundus* pa je tako i prvi put bila razlikovana tek na temelju glasanja (Schneider i sur. 1993), stoga će se i u ovom istraživanju smatrati vrstom.



Slika 10. *Pelophylax kurtmuelleri*

Rasprostranjena je na jugu Balkanskog poluotoka u Grčkoj i Albaniji, ali je također potvrđena kao invazivna vrsta u Sjevernoj Italiji (Bellati i sur. 2011) (Slika 10). Veličine je do 10 cm i posjeduje tamne rezonatore i malu metatarzalnu kvržicu (Slika 9). Noge su joj relativno duge bez žućkastog obojenja. Može biti obojana zeleno i smeđe s crnim mrljama po leđima i također može imati svijetlu leđnu prugu. Budući da dijeli slične morfološke karakteristike s *P. ridibundus*, može se razlikovati po arealu gdje se nalazi i glasanju, a najpouzdanije po molekularnim analizama.

Prema IUCN-ovoj listi *P. kurtmuelleri* ima status najmanje zabrinjavajuće vrste (LC- *least concern*).

1.8. Molekularna filogenija

Srodstveni odnosi između živog svijeta su oduvijek bili predmet proučavanja unutar biologije. Ernest Haeckel je 1866. godine uveo pojam „filogenija“ koja označava znanstvenu disciplinu koja se bavi istraživanjem evolucijske prošlosti različitih taksonomskih kategorija. Na temelju morfoloških, anatomskih, fizioloških, ekoloških, biogeografskih i paleontoloških karakteristika proučavaju se srodstveni odnosi između i unutar pojedinih taksona. Posebnu granu filogenije čini molekularna filogenija koja proučava odnose unutar i između taksona na temelju makromolekula, DNA i proteina. Svaka analiza sadrži više različitih koraka na odabranom ili odabranim taksonima. Oni uključuju umnažanje DNA (ili neke druge makromolekule) lančanom reakcijom polimeraze (eng. *Polymerase chain reaction*), sekvenciranja, sravnjivanja sekvenci u računalnim programima i izrade filogenetskog stabla.

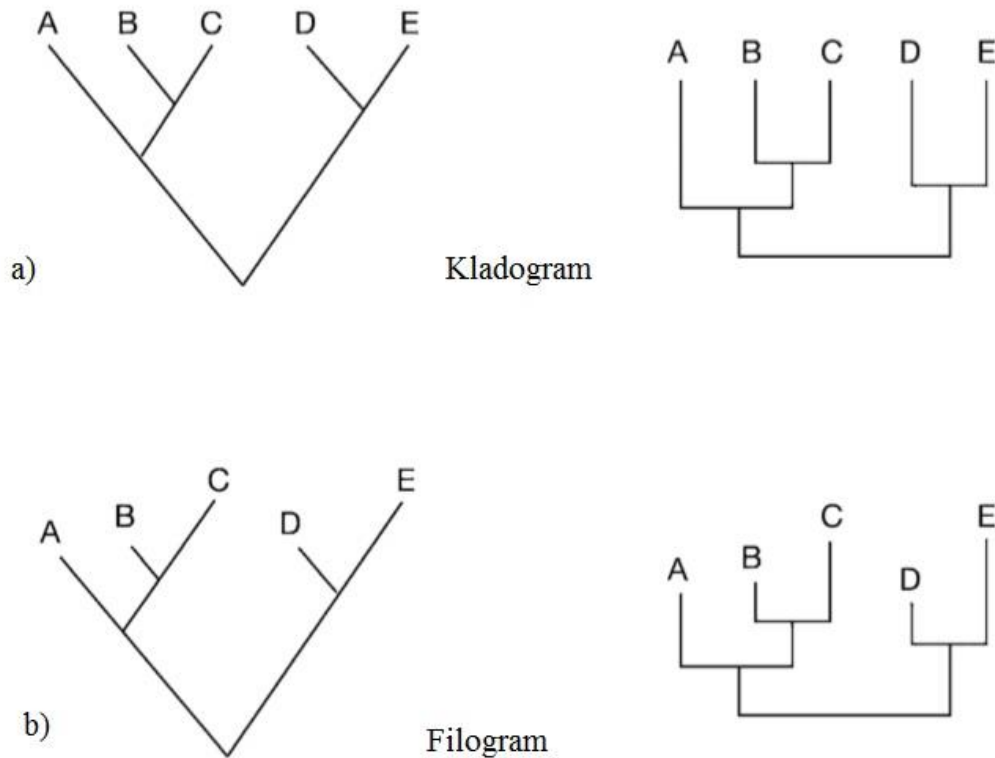
Genski markeri su dijelovi DNA koji su varijabilni te se lako izoliraju i identificiraju (Shulman i sur. 2004), stoga su ključni element u filogenetičkoj analizi. Koriste se u detekciji genske varijabilnosti koja nastaje u promjenama u nukleotidnom slijedu, tj. supstitucijama. Takve promjene se nakupljaju linearno prema teoriji evolucijskog sata (Zuckerlandl i Pauling 1965) i one se u konačnici koriste za rekonstrukciju filogenetičke povijesti organizma, tj. može se odrediti vrijeme divergencije pojedinih taksona. Stopa promjena može značajno varirati s veličinom organizma i dinamikom populacije (Bromham 2000). Proučavajući više taksonomske kategorije, odnosno udaljenije skupine, prikladnije je koristiti visoko konzervirane markere, dok je za niže taksonomske kategorije, odnosno srodnije skupine, prikladnije koristiti više varijabilne markere (Hwang i Kim, 1999). Jezgrina DNA je primjer visoko konzervativnog markera pošto ima sporiju stopu mutacije, tj. promjena na nukleotidnom slijedu, dok je mitohondrijska DNA zbog svoje manje veličine i veće stope mutacija, tj. brže evolucije, prikladnija kao visoko varijabilni marker (Tzagaloff i Myers, 1986). I jezgrina i mitohondrijska DNA se mogu koristiti kao markeri za zoologijska istraživanja, iako se mitohondrijska više koristi za istraživanja populacija (Moritz, 1998) zbog lake izolacije, velikog broja kopija i brže evolucije. Nedostaci korištenja mitohondrijske DNA kao markera jesu praćenje isključivo majčinske linije zbog nasljeđivanja DNA od jednog roditelja. Moguće je i krivo interpretirati filogenetičke odnose zbog umnažanja nuklearnih mitohondrijskih sekvenci. Mitohondrijski genom se može ugraditi u genom jezgre te se ponašati kao pseudogen čime se smanjuje brzina evolucije mitohondrijskog gena i postaje slična onoj okolnih jezgrinih sekvenci (Bermingham i Moritz 1998). Nije nužno koristiti samo jedan marker u istraživanju, nego se preporuča korištenje više markera varijabilne brzine mutacija i različitog porijekla (jezgrini, spolno vezani, citoplazmatski...) (Emerson i Hewit, 2005). Time raste vjerodostojnost podataka i olakšava se otkrivanje hibridizacije, lateralnog prijenosa gena, umnažanja pseudogena i sličnih procesa koji mogu rezultirati krivim zaključcima (Bermingham i Moritz 1998).

Evolucijski odnosi između određenih taksona prikazuju se kroz filogenetičko stablo. To je rezultat filogenetičkih analiza i ono vizualno rekonstruira srodnost i vrijeme kada su organizmi dijelili zajedničkog pretka. Za konstrukciju filogenetskog stabla treba zadovoljiti određene pretpostavke. Jedna od njih je da proučavani taksoni imaju zajedničkog pretka koji se razdvojio tijekom vremena (homologija). Druga pretpostavka je da raznolikost između nukleotidnih slijedova pokazuje dovoljno informacija za konstrukciju nedvosmislenog filogenetičkog stabla (Xiong 2006). Sastavni dijelovi filogenetičkog stabla su čvorovi i grane. Čvorovi su proučavane taksonomske jedinice, dok grane spajaju te jedinice i predstavljaju njegovu topologiju. Čvorovi mogu biti unutarnji ili vanjski. Vršci grana na takvom stablu spadaju u vanjske čvorove (OTU, eng. *Operational taxonomic units*) koji označavaju taksonomske jedinice koje proučavamo, dok unutarnji čvorovi (HTU, eng. *Hypothetical taxonomic units*) predstavljaju zajedničke hipotetske pretke. Na dnu stabla se nalazi korijen koji predstavlja sve taksonomske jedinice u stablu (Hall 2007). Odnosi među taksonomskim jedinicama, tj.

čvorovima su predstavljeni topologijom stabla, što označava uzorak grananja stabla. Stabla mogu biti dihotomska gdje su sve grane bifurkalne, što znači da svaki predak daje dva potomka. Mjesto grananja gdje nastaje više od jednog potomka naziva multifurkalni čvor i označava politomiju, što može biti rezultat radijacije ili nerazriješene filogenije (Xiong 2006).

Svi taksoni koji pripadaju istoj grani potječu od zajedničkog pretka i imaju monofiletsko podrijetlo, što se naziva klaster ili sestrinske grupe. Parafiletska skupina sadrži članove koji dijele porijeklo od najmlađeg zajedničkog pretka, ali ne sadrži sve potomke toga pretka, dok su u polifiletskoj skupini članovi koji evolucijski srodni i imaju više zajedničkih predaka.

Filogenetička stabla se mogu i podijeliti po evolucijskoj udaljenosti na filograme i kladograme (Slika 11). Duljina grana u filogramu odražava evolucijsku udaljenost i trajanje evolucijskih procesa između taksona pa tako dulja grana označava da je prošlo više vremena i da se dogodilo više promjena u makromolekuli, tj. markeru kojeg proučavamo. Za razliku od filograma, kladogram ne pokazuje koliko je vremena prošlo između evolucijskih promjena, stoga su grane i čvorovi postavljeni na jednake duljine čime se prikazuje samo topologija (Xiong 2006).



Slika 11. Prikaz filogenetičkog stabla. Slika a) prikazuje kladogram dok slika b) prikazuje filogram. Grane mogu biti prikazane u kvadratnom obliku (desno) ili u obliku s kutovima između grana (lijevo). Preuzeto i prilagođeno od Xiong 2006.

Filogenetička stabla se mogu podijeliti na ukorijenjena ili neukorijenjena. Kod ukorijenjenog stabla sve grane potječu iz jednog čvora i taj čvor se ukorjenjuje uz pomoć vanjske skupine (eng. *Outgroup*). Vanjski takson je taksonomska jedinica blisko srodna s taksonima koje proučavamo, ali nju samu ne proučavamo. S druge strane, neukorijenjena stabla prikazuju odnose između određenih taksona bez stvaranja pretpostavke o zajedničkim predcima (Hall, 2007). Nakon odabira tipa stabla slijedi izrada koja je računalno zahtjevna jer broj mogućih stabala raste s brojem taksona koji su uključeni u analizu. U slučaju da analiza rezultira s više optimalnih stabala, može se napraviti konsenzusno stablo. Jedno rješenje za stvaranje optimalnog stabla jest da se svi bifurkalni čvorovi koji se ne slažu spoje u jedan politomni čvor. Drugo rješenje je da se bifurkalni čvorovi koji se slažu u 50% slučajeva ostavljaju, dok se čvorovi koji se ne slažu stavljaju u politomne čvorove (Xiong 2006). Osim uobičajenog prikaza stablom, filogenetski odnosi mogu se prikazivati filogenetskom mrežom koja je bolji odabir za prikaz odnosa među taksonima i unutar taksona (Posada i Crandall, 2001).

Svaka filogenetska analiza ima četiri koraka: 1) Višestruko sravnjivanje; 2) Određivanje supstitucijskog modela; 3) Rekonstrukcija filogenetskog stabla; 4) Evaluacija dobivenog stabla (Baxevanis i Oullette 2001).

Višestruko sravnjivanje povezuje poravnate nukleotidne sljedove koji su genealoški povezani i uspostavlja njihovu pozicijsku evoluciju. Nukleotidni nizovi se uspoređuju nalaženjem homolognih dijelova te se tako stavljaju u međusobni odnos. Algoritmi tako pronalaze dva najbližija slijeda pa dodaju ostale po redu sličnosti (Vandamme 2009). Jedna od takvih metoda je metoda BLAST (eng. *Best Local Alignment Search Tool*) kojom se provodi lokalno sravnjivanje elemenata nukleotidnih sljedova pronalaskom sličnih slova unutar slijeda koji se potom nazivaju riječi (eng. *words*). Nakon prolaska riječi, algoritam pronalazi se više sličnih regija i slaže dalje homologni niz. Međutim, u nukleotidnom nizu, rezultat višestrukih supstitucija i konvergencija mogu dovesti do netočnih rezultata filogenetičkog stabla što se zove homoplazija. Metode kao što je BLAST služe da bi se preko statističkih izračuna ispravili krivi rezultati i dobila točna homologija. (Xiong, 2006)

Metode za rekonstrukciju stabla mogu se podijeliti na metode temeljene na matrici udaljenosti (eng. *Distance matrix*) i metode temeljene na stanjima karaktera (eng. *Character state*). Prema primijenjenoj strategiji za rekonstrukciju stabala dijele na strategije stupnjevitog klasteriranja i strategije iscrpnog pretraživanja. Ne postoji jedinstvena metoda za rekonstruiranje filogenetičkog stabla, već se koristi model s kojim se najbolje opisuje evolucija proučavanih taksona (Baxevanis i Oullette, 2001).

Metoda susjednog sparivanja (NJ, eng. *Neighbor joining*) koristi matricu udaljenosti i strategiju postepenog klasteriranja. Metoda postepeno pronalazi susjedne parove operacijskih taksonomskih jedinica i tako rekonstruira stabla koja onda odvaja iz nerazrješivog “zvjezdanog” klastera.

Metoda najveće štedljivosti (MP, eng. *Maximum parsimony*) koristi stanja karaktera i strategiju iscrpnog pretraživanja. Temelji se na principu Okamove oštrice gdje je najjednostavnija hipoteza najbolja pa je po takvoj hipotezi najbolje ono filogenetsko stablo za koji je topologiju odgovoran najmanji broj promjena. Algoritam koristi samo informativna mjesta zbog optimizacije računalnog vremena.

Metoda najveće vjerojatnosti (ML, eng. *Maximum likelihood*) koristi stanja karaktera i strategiju iscrpnog pretraživanja. Izračunava se vjerojatnost pojavljivanja nukleotidnih baza ili aminokiselina u unutarnjim čvorovima. Potom se rekonstruira vjerojatnost strukture stabla iz tih podataka.

Bayesian analiza (BA, eng. *Bayesian analysis*) je vrlo kvalitetna metoda, ali računalno zahtjevana. Koristi spoznaju o naknadnim vjerojatnostima koje su procijenjene po nekom evolucijskom

modelu koji se zove prethodno očekivanje. Na temelju određenih spoznaja o podacima rekonstruira se stablo. Metoda *Metropolis-coupled Markov Chain Monte Carlo* provodi se na temelju niza neovisnih potraga za najboljim stablima.

2. Ciljevi istraživanja

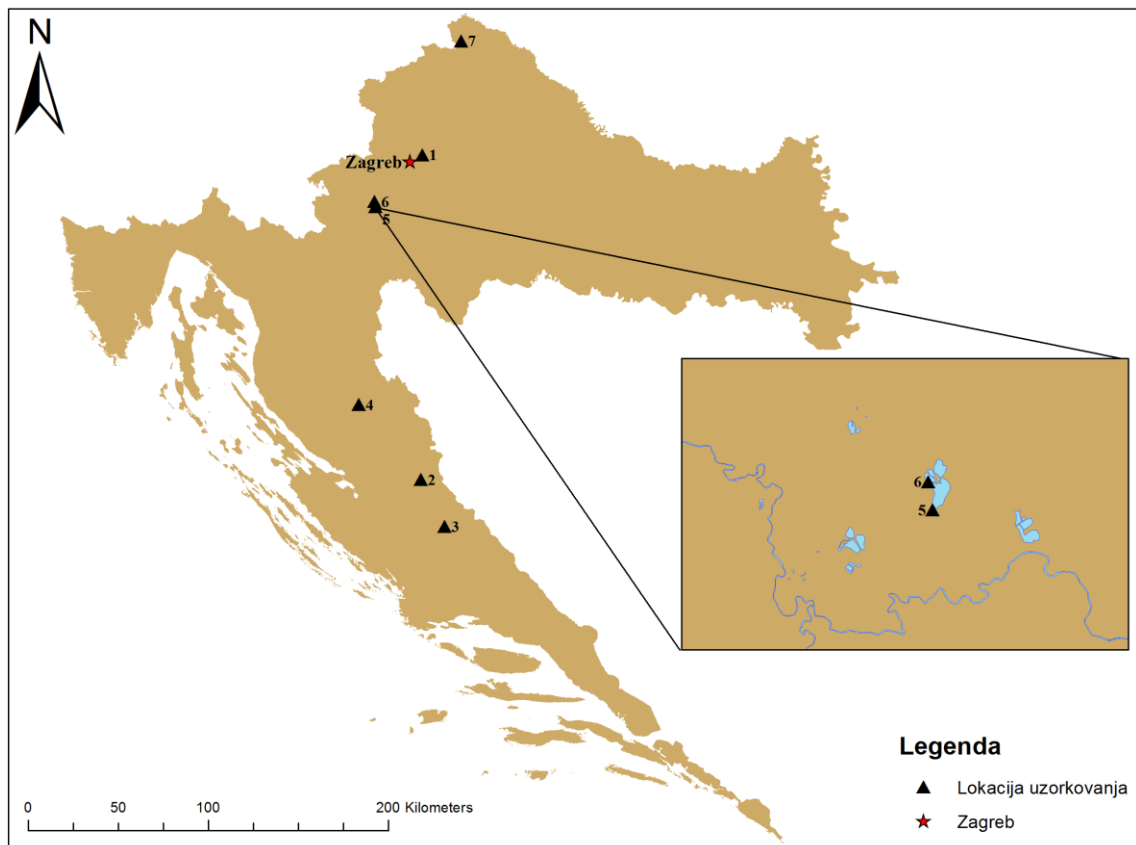
Cilj ovog istraživanja je molekularno-filogenetičkim metodama, koristeći jezgrine (*serum albumin intronske regije*, SAI-1) i mitohondrijske molekularne biljege (*podjedinica I citokrom c oksidaze*, COI), analizirati veći broj populacija zelenih žaba na području Hrvatske. Na taj način će se dobiti potpuniji uvid u prisutnost svih vrsta žaba roda *Pelophylax* koje nalazimo u Hrvatskoj, njihovu rasprostranjenost te tipove i učestalost njihove hibridzacije.

Rezultati molekularno-filogenetičkih analiza usporedit će se s rezultatima morfoloških i morfometrijskih analiza uzrokovanih jedinki što će omogućiti određivanje najboljih svojstva za točniju morfološku determinaciju.

3. Materijali i metode

3.1. Područje istraživanja

Uzrokovanje jedinki izvršeno je na području Republike Hrvatske na 7 lokaliteta (Slika 12), 4 u kontinentalnoj Hrvatskoj (Zagreb 1, Međimurje 1 i 2, lokacije kod Crne Mlake), 2 u Dalmaciji (Otrić i Biskupija) i jedno u Lici (Podlapačko polje).



Slika 12. Pregled lokacija uzorkovanja žaba roda *Pelophylax*: 1. Zagreb, 2. Otrić, 3. Biskupija, 4. Podlapačko polje, 5. Crna Mlaka 1, 6. Crna Mlaka 2, 7. Međimurje.

1. Zagreb: lokalitet se nalazi unutar grada Zagreba tj. sjevernog dijela gradske četvrti Gornja Dubrava. Stanište je manji meandriraajući potok imenom Reka, s betoniranim stranama. Okružen je naseljem i cestom s jedne, dok su s druge strane poljoprivredne površine (Slika 13). Vegetaciju sačinjavaju šaševi i alge. Antropogeni učinak je velik zbog blizine naselja pa je

unutar potoka i pronađen otpad, ali je moguće i kemijsko onečišćenje zbog blizine poljoprivrednih površina. S lokaliteta su prikupljeni podaci od 32 jedinke.



Slika 13: Lokalitet 1 u Zagrebu

2. Otrić: lokalitet se nalazi unutar Zadarske županije. Stanište je bara okružena travnjacima i s prometnom cestom u neposrednoj blizini (Slika 14). S lokaliteta su prikupljeni podaci od 25 jedinki.



Slika 14: Lokalitet 2 u Otriću

3. Biskupija: lokalitet se nalazi u Šibensko-kninskoj županiji. Stanište je smješteno na najnižem dijelu udoline gdje se nalazi bara koja je obrasla sa algama (Slika 15). U blizini je manje naselje. S jedne strane se nalazi obronak brda, dok su s druge travnjaci. S lokaliteta su prikupljeni podaci od 15 jedinki.



Slika 15: Lokalitet 3 u Biskupiji

4. Podlapača: lokalitet se nalazi u Ličko-senjskoj županiji. Stanište je bara obrasla šaševima i vodenim biljem. Bara je okružena travnjacima i poljoprivrednim površinama. Cijelo područje je u kotlini. S lokaliteta su prikupljeni podaci od 22 jedinke.
5. i 6. Crna Mlaka 1 i 2: lokalitet se nalazi unutar Zagrebačke županije, u općini Jastrebarsko. Lokalitet se nalazi usred močvarnog područja gdje se sama jezera koriste kao ribogojilišta (Slika 16). Mjesto je također posebni ornitološki rezervat i ima bogatu floru i faunu. Lokalitet A se nalazi uz makadamsku cestu u blizini šumskog potoka, dok su jedinke pronađene skrivene u vegetaciji. Lokalitet B su sama jezera koja se koriste kao ribogojilišta i obližnji potok. Na Lokalitetu A prikupljeni su podaci od 7 jedinki, dok su na lokalitetu B prikupljeni podaci od 29 jedinki.



Slika 16: Lokalitet 6 u Crnoj Mlaci

7. Međimurje: lokalitet se nalazi kod Dragoslavec sela u Međimurskoj županiji. Stanište je jezero koje se koristi kao ribnjak a obraslo je šašom (Slika 17). Okruženo je šumom, travnjacima i makadamskom cestom. S lokaliteta su prikupljeni podaci od 32 jedinke.



Slika 17. Lokalitet 7 u Međimurju

3.2. Materijali

3.2.1. Životinjski materijali

Uzorci tkiva zelenih žaba skupljeni su tijekom terenskog rada. Jedinke su uhvaćene na terenu između 04. svibnja i 29. lipnja 2017. godine. Svako uzorkovanoj jedinci dodijeljena je pripadajuća oznaka, mjesto i vrijeme uzorkovanja. Žabe nisu morfološki determinirane, nego im je određena pripadnost rodu *Pelophylax*. Oznaka se sastoji od slova HRWF i četiri znamenke od kojih su prve dvije redni broj lokacije, a druge dvije redni broj uzorka žabe po lokaciji. Uzet je uzorak tkiva (prst stražnje lijeve noge) i spremljen u mikroeprevetu s 96% alkoholom za DNA analizu. Uzorci tkiva su potom spremljeni u hladnjak na +4°C na Biološkom odsjeku Prirodoslovno–matematičkog fakulteta u Zagrebu. Jedinke su fotografirane i izmjerene te su im određene morfološke karakteristike. Dozvola za uzorkovanje je izdana od strane Ministarstva za zaštitu okoliša i energetike.

3.2.2. Kemikalije i laboratorijski pribor

Kemikalije

Agaroz

Chelex, 100 sodim form

Proteinase K (*Tritirachium album*) lyophilized powder, ≥ 30 units/mg protein

DreamTaq Green PCR Master MIC

Osnovni materijal:

Mikroeprevete 1.5 i 2 mL

PCR mikropruvete 0.2 mL

Poklopci za PCR 0.2 mL mikropruvete

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

Zaštitne rukavice

Tehnički pribor:

Centrifuga

Digitalni fotoaparata

Kadice za elektroforezu

Kadice za pripremu agaroznih gelova

Mikrovalna pećnica

Mikropipete

Nanodrop spektrofotometar

PCR uređaj

PCR ploče s 96 jažica

Transiluminator

Vodene kupelji

Vorteks miješalica

Zamrzivač i hladnjak

3.3. Metode

3.3.1. Vanjska morfologija

Žabe su fotografirane tijekom terenskog dijela istraživanja za analizu morfoloških karakteristika. Fotografirane su leđna, trbušna i bočna obojenja, obojenja bedra i oblik glave. Karakteristike kao što su obojenje rezonatora i oblik metatarzalne kvržice nisu u svakom slučaju mogle biti precizno fotografirane stoga su također zabilježene na terenu radi potpunijih podataka. Sve

žabe su fotografirane s DSLR fotoaparatom marke Nikon tipa D3200. Svi rezultati opisa morfoloških karakteristika su upisani u Microsoft Excel tablicu.

Usporedba vanjskih svojstva žaba temelji se na vanjskim karakteristikama koje je koristio Krizmanić (2008):

I. Zvučni mjehuri: 1. Bijeli, 2. Svijetlo sivi, 3. Tamno sivi, 4. Bez mjehura;

II. Glavna boja vanjske površine stražnjih nogu: 1. Bez boje, 2. Maslinasta i zelena ili smeđa, 3. Potpuno žuta, 4. Djelomično žuta, 5. Žuta u tragovima;

III. Žuto obojenje na bokovima: 1. Prisutno, 2. Žuto-zeleno, 3. Nije prisutno;

IV. Crne pruge na nogama: 1. Prisutne, 2. Nisu prisutne; 3. Pruge diferencirane u točke;

V. Obojenje na unutrašnjoj strani stražnjih nogu: 1. Žuto, 2. Žuto zelena, 3. Bez žute;

VI. Dorzalna pruga: 1. Prisutna, 2. Nije prisutna;

VII Ventralna strana tijela i vrata: 1. Bijela, 2. Slabo točkasta, 3. Točkasta;

VIII. Oblik metatarzalne kvržice 1. Simetrična polukružna, 2. Asimetrična, viša točka rema prvom prstu, 3. Asimetrična, viša točka prema zglobu, 4. Niska i ravna;

IX. Prednja strana glave: 1. Eliptična, 2. Oštra;

X. Pregib noge: 1. Do oka, 2. Između oka i njuške, 3. Iznad njuške;

XI. Površina kože: 1. Hrapava, 2. Glatka;

XII. Boja bubne opne: 1. Brončana/smeđa, 2. Zelena.

Od 10 karakteristika koje koristio Krizmanić (2008) ne koristi se veličina metatarzalne kvržice iz razloga što se to obilježje detaljnije analiziralo u morfolozijskom dijelu istraživanja. Karakteristika kao što je obojenje na bokovima je podijeljeno na 3 tipa umjesto 2, kao što je koristio autor, zbog zamijećenih većih razlika. Nadalje, dodane su tri nove promatrane karakteristike. Prva je duljina stražnje noge kada se položi uz tijelo za što se smatra da se razlikuje od vrste do vrste. Druga je površina dorzalne strane, tj. da li je koža hrapava ili glatka prema Arnold i Ovenden (2004), a treća je površina bubne opne.

3.3.2. Morfometrija

Sve jedinke su izmjerene digitalnom pomičnom mjerkom točnosti 0.01 mm. Mjere su određene po Plötner (2010) te uključuju: SVL - dužina tijela, HW - širina glave; TiL - dužina goljениčne kosti; LFT - duljina prvog nožnog palca; LMtT - duljina metatarzalne kvržice; LNpOE - duljina između nosnice i posteriornog kraja oka. Sve mjere je provodila ista osoba kako bi se minimalizirala statistička pogreška i sve su mjere izvođene na desnoj strani tijela osim SVL i HW.

Međusobno uspoređujući mjere sa svakom dobiveno je 15 omjera koji će se koristiti za daljnje statističke analize. Omjeri su SVL/HW, SVL/TiL, SVL/LFT, SVL/LMtT, SVL/LNpOE, HW/TiL, HW/LFT, HW/LMtT, HW/LNpOE, TiL/LFT, TiL/LMtT, TiL/LNpOE, LFT/LMtT, LFT/LNpOE i LMtT/LNpOE. Podaci su omjerima standardizirani i pokazuju normalnu distribuciju. Određeni omjeri su već korišteni za determinaciju roda *Pelophylax* (Krizmanić 2008, Karaica i sur. 2016), no u ovom istraživanju nisu uključeni omjeri koji koriste veličinu natkoljениčne kosti (F - femur) jer ta mjera nije bila određivana tokom terenskog dijela istraživanja. Svaki omjer je analiziran koristeći Kruskal–Wallis test statističke značajnosti u programu PAST (<https://folk.uio.no/ohammer/past>). Svaka jedinka unutar analize varijance označena je sa genotipom i sa omjerom. Sve jedinke kojima je potvrđen genotip i sadrže sve morfološke mjere su korištene u analizi varijance, osim *P. shqipericus* jer je pronađena samo jedna jedinka. Jedinke sa oštećenim ekstremitetima, gdje nije bilo moguće izmjeriti sve mjere, nisu uzete u obzir.

3.3.3. Izolacija DNA

Izolacija DNA je napravljena metodom Chelex uz korištenje protokola opisanog u Casquet i sur. (2012). Početni postupak je izrezivanje 1-2 mm³ tkiva s vrha prsta žabe koji je pohranjen u 96%-tnom etanolu. Tkivo se stavi na dno jažice na PCR ploči. Postupak se nastavlja dok se ne popuni svih 96 jažica na PCR ploči. PCR ploča se stavi u termostat s cirkulacijom zraka i temperaturom postavljenom na 25 °C dok ne ispari sav etanol iz tkiva. Zatim se u svaku jažicu dodaje 160 µL otopine u kojoj je pomiješano 10 µL Proteinaze K (>600 mAU/mL, Sigma-Aldrich) i 150 µL 10%-tne otopine Chelex 100 resin (Sigma-Aldrich) u vodi slobodnoj od nukleaza. Jažice se zatvore poklopcima i inkubiraju preko noći u PCR uređaju na 55°C. Izolat DNA se čuva tako da se zamrzne na -20°C.

3.3.4. Lančana reakcija polimeraze (eng. *Polymerase Chain Reaction* – PCR)

Upotrebom PCR-a umnoženi su dijelovi serum albumin intronske 1 (SAI-1) regije jezgrine DNA prema uputama u Hauswaldt i sur. (2012). Također su umnoženi dijelovi citokrom oksidaza I

(COI) regije mitohondrijske DNA koji se koriste u genetičkom barkodiranju životinjskih organizama, tzv. „Folmerova regija“ (Folmer i sur. 1994; <http://boldsystems.org/>).

Nuklearni i mitohondrijski DNA biljezi su umnoženi u 20 µL PCR smjese koja se sastojala od DreamTaq polimeraze (Thermo-Scientific), 400 nM „forward“ početnice, 400 nM „reverse“ početnice, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dATP, 0.2 mM dCTP, 0.2 mM dGTP, 0.2 mM dTTP, vode slobodne od nukleaza i 20 do 100 ng ukupne genomske DNA.

Za umnažanje SAI-1 regije korištene su početnice Pel-SA-F1 (5'-TCCATACAAATGTGCTAAGTAGGTT-3') i Pel-SA-R2 (5'-GACGGTAAGGGGACATAATTCA-3') (Hauswaldt i sur. 2012) te sljedeći profil na termociklirajućem uređaju (Bio-Rad 96 Well MyCycler Thermal Cycler): početna denaturacija na 95°C tijekom 3 minute; 35 ciklusa denaturacije na 94°C tijekom 30 sekundi, sljepljivanja početnica na 59°C tijekom 40 sekundi i sinteze na 72°C tijekom 1 minute i 40 sekundi; završne sinteze na 72°C tijekom 10 min; hlađenja PCR uzorka na 10°C nakon završetka PCR-a.

Za umnažanje COI regije korištene su početnice Chmf4 (5'-TYTCWACWAAYCAYAAAGAYATCGG-3') i Chmr4 (5'-ACYTCRGGRTGRCCRAARAATCA-3') (Che i sur. 2012) te sljedeći profil na termociklirajućem uređaju (Bio-Rad): početna denaturacija na 95°C tijekom 3 minute; 35 ciklusa denaturacije na 94°C tijekom 1 minute, sljepljivanja početnica na 46°C tijekom 1 minute i sinteze na 72°C tijekom 1 minute i 10 sekundi; završne sinteze na 72°C tijekom 10 min; hlađenja PCR uzorka na 10°C nakon završetka PCR-a.

3.3.5. Elektroforeza

Proizvodi PCR na SAI-1 regiji su stavljeni na gel elektroforezu kako bi se prema duljinama PCR amplikona odredile vrste prema metodologiji opisanoj u Hauswaldt i sur. (2012), gdje se molekule DNA razdvajaju na temelju naboja ili molekularne mase. Na 1%-tni agarozni gel stavljeno je 3 µL PCR proizvoda. Za određivanje veličine amplikona korišteno je 3.5 µL elektroforetskog standarda 100-bp Gene Ruler Plus DNA ladder (Fermentas) i 3.5 µL Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas) koji su stavljeni u rubne jažice na gelu. Radi vizualizacije amplikona u gel se izravno dodavala boja Midori Green Advance DNA stain (Nippon Genetics Europe GmbH). Elektroforeza je provedena u TAE puferu na 100 V, u trajanju 23 minute, korištenjem uređaja EP-2117: RunOne™ Electrophoresis Unit (EmbiTec). Vizualizacija amplikona na gelu i fotodokumentiranje gela je provedeno korištenjem UV svjetla u uređaju UV Transilluminator TR2000 (Bio-Rad, SAD) i korištenjem digitalnog fotoaparata Camedia C-4000 Zoom (Olympus, Japan).

Također, kraća elektroforeza (13 min) je provedena za COI amplikone kako bi se utvrdila uspješnost PCR i da li je veličina PCR proizvoda oko 700 parova baza.

3.3.6. Sekvenciranje

Amplikoni SAI-1 regije nisu sekvencirani tj. nije im određen slijed nukleotidnih baza, dok su amplikoni COI regije poslani u tvrtku Macrogen Corporation (Amsterdam, Nizozemska) radi određivanja primarnog slijeda nukleotida umnoženih gena. Prije slanja u Macrogen, PCR proizvodi su enzimatski pročišćeni od ostataka početnica korištenjem enzima Exonuclease I i AnP (Antarctic Phosphatase) (New England Biolabs). Reakcija sekvenciranja je napravljena s istim početnicama koje su korištene u PCR-u.

3.3.7. Analiza sekvenci

Datoteke koje sadrže sirove podatke dobivene nakon sekvenciranja u Macro genu su obrađene u programu SEQUENCHER (version 5.3; Gene Codes Corp., Ann Arbor, USA). Nakon provjere kvalitete očitavanja nukleotida u sekvencama i rezanje krajeva sekvenci, obrađene sekvence su izvedene iz programa SEQUENCHER u pojedinačne fasta datoteke. Zatim su iz javnih baza GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) i BOLD (<http://boldsystems.org/>) skinute sve dostupne COI sekvence koje se odnose na rod *Pelophylax*. Fasta datoteke su nakon toga učitane u programski paket MEGA 6.06 (Tamura i sur. 2013) gdje su ujedinjene u skupnu fasta datoteku. Sve dostupne sekvence COI regije su sravnjene upotrebom programa MAFFT v7 (Katoh 2013) kako bi položaji nukleotidnih baza u sekvencama bili homologni. Sravnjene sekvence su međusobno uspoređene pomoću programa DnaSP v5.10 (Librado i Rozas 2009) kako bi se izdvojili jedinstveni haplotipovi potrebni za filogenetske rekonstrukcije. Prije pokretanja filogenetskih rekonstrukcija, određen je evolucijski model uz korištenje programa JModelTest 2 (Darriba i sur. 2012) i Bayesov informacijski kriterij (BIC) kako je postavljeno na Cipres Science Gateway (version 3.1; <http://www.phylo.org>; Miller i sur. 2010).

Sekvence COI regije koje su dobivene iz vrsta *P. nigromaculatus* i *P. plancyi* su korištene kao vanjska grupa u filogenetskim rekonstrukcijama.

Upotrebom MEGA-e, izrađena su filogenetska stabla za COI upotrebom statističkih metoda najveće vjerojatnosti (eng. *Maximum Likelihood*) i najveće štedljivosti (eng. *Maximum Parsimony*).

U analizi najveće vjerojatnosti, početna stabla za heurističku pretragu su dobivena metodom sparivanja susjeda (eng. *Neighbor-Joining*) primjenjenom na matricu uparenih udaljenosti procjenjenih pristupom „*Maximum Composite Likelihood*“. Rekonstruirana ML filogenija je testirana pomoću 1000 neparametrijskih replikata samoučitanja (eng. *Bootstrap*).

U analizi najveće štedljivosti (MP), stablo je izrađeno pomoću algoritma “*Subtree-Pruning-Regrafting*” (Nei i Kumar 2000) s razinom pretrage 1 u kojoj su početna stabla dobivena nasumičnim dodavanjem sekvenci (10 replikata). MP filogenija je testirana pomoću 1000 neparametrijskih replikata samoučitanja.

Upotrebom programa MrBayes 3.2 (Ronquist i sur. 2012) na , izrađeno je filogenetsko stablo pomoću Bayesove metode. Dvije nezavisne analize sa četiri „*Metropolis-coupled Markov Chain Monte Carlo*“ lanca su izvedene na 50 milijuna generacija. Uzorkovanje je postavljeno na svakih 5000 generacija, temperaturnim parametar na 0.2 i početnih 25% generacija/uzoraka je uklonjeno kao „*Burn-in period*“. Konvergencija između dvije analize je provjerena pomoću programa AWTY (Nylander i sur. 2008) dok je efektivna veličina uzorka provjerena pomoću programa TRACER 1.5 (Drummond i Rambaut 2007)

Grananja u filogenetskim stablima su smatrana podržanima ako imaju vrijednosti samoučitanja $P \geq 70$ kod stabala dobivenih metodama najveće vjerojatnosti i najveće štedljivosti, i posteriorne vjerojatnosti (pp) ≥ 0.95 u Bayesovoj metodi.

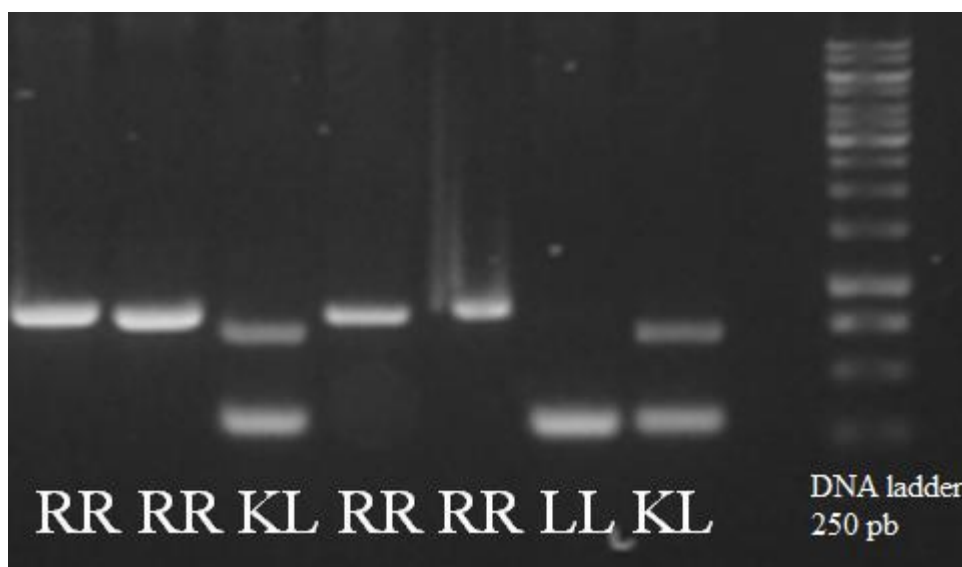
Odnosi među haplotipovima su analizirani pomoću programa PopART (Population Analysis with Reticulate Trees) v1.7 (Leigh i Bryant 2015) u kojem je napravljena Median-Joining (MJ) (Bandelt i sur. 1999) filogenetska mreža.

4. Rezultati

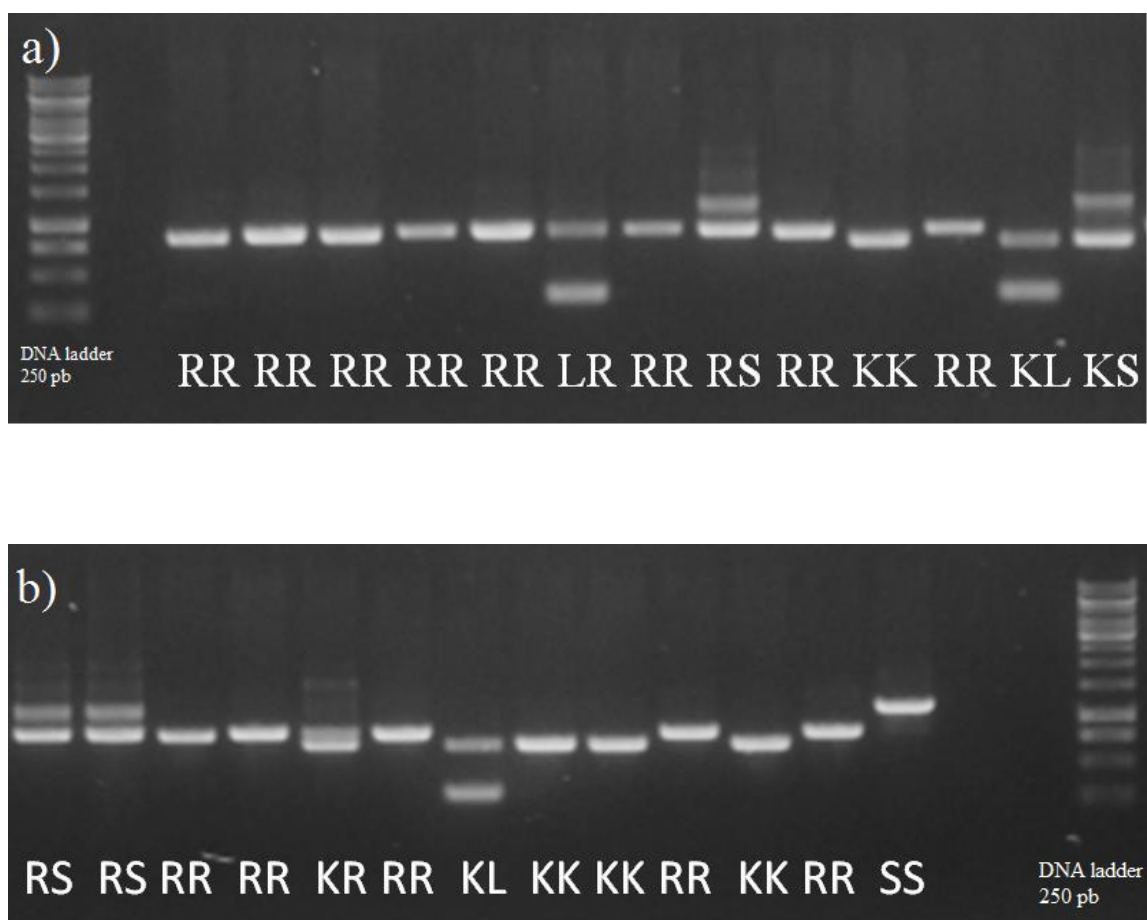
Zbog velikog broja latinskih imena čistih vrsta, hibridnih vrsta i mitohondrijske DNA, imena su skraćena samo na prva slova vrste. „Čiste“ vrste označava prvo slovo njihove vrste (*P. ridibundus* = RR, *P. lessonae* = LL, *P. shqipericus* = SS i *P. kurtmuelleri* = KK). Hibridni oblici su prikazani kao kombinacija dva slova od roditeljskih vrsta (npr. *P. kl. esculentus* = RL). Kada se označava koju vrstu mtDNA jedinka ima, dodaje se prvo (malo) slovo od vrste mtDNA (npr. *P. kl. esculentus* sa L mtDNA se piše kao RL1).

4.1. Analiza PCR produkata SAI-1 regije na agaroznom gelu.

Jedinke nisu determinirane koristeći morfološke osobine, nego analizom duljine PCR amplikona serum albumin gen intronske 1 regije detektirane na agaroznom gelu. Zabilježene su ukupno 4 različite duljine fragmenata. Dio jedinki posjeduje jednu duljinu fragmenta, čime pripadaju čistim jedinkama, dok drugi dio ima dvije duljine fragmenta što označava da su hibridi. Najkraći fragmenat od 306 parova baza (pb) pripada vrsti LL, dio fragmenta od 717 pb pripada KK, dio fragmenta od 839–843 pb pripada RR, dok najduži fragment od ~1200 pripada SS (Hauswaldt i sur. 2012, Vucić 2016). Od 162 uzorka SAI-1 sekvenca je 156 uzorka davalo vidljivu sekvencu na elektroforezi. Utvrđeno je da 48 jedinki pripada vrsti RR, 45 vrsti KK, 5 vrsti LL i jedna SS. Od hibridnih jedini je utvrđeno 40 vrsti KR, 5 vrsti LK, 5 vrsti RL, 4 vrsti RS i 2 vrste KS. Produkta nije bilo u 6 uzoraka i te jedinke nisu mogle biti determinirane (Slike 18, 19).



Slika 18. Prikaz PCR produkata serum albumin gen intronske 1 regije na agaroznom gelu nakon elektroforeze. Najkraći dio fragmenata od 306 pb pripada vrsti LL, dio fragmenta od 717 pb pripada KK, dio fragmenta od 839–843 pb pripada RR. Uzorci koji sadrže dvije duljine fragmenata ukazuju na postojanje hibrida između dvije vrste s odgovarajućim duljinama fragmenta.



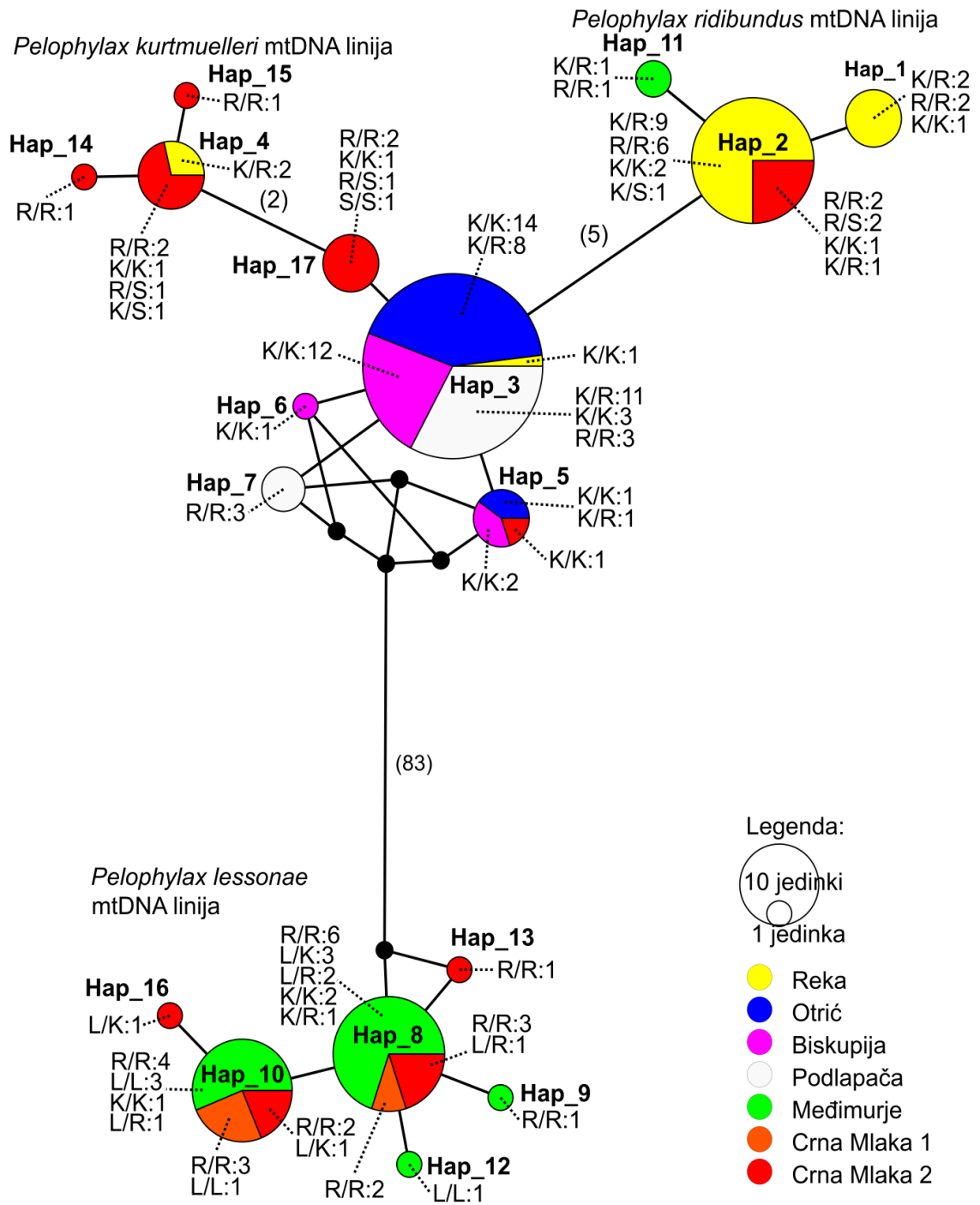
Slika 19 a) i b): Prikaz PCR produkata serum albumin gen intronske 1 regije na agaroznom gelu nakon elektroforeze. Najkraći dio fragmenata od 306 pb pripada vrsti LL, dio fragmenata od 717 pb pripada KK, dio fragmenata od 839–843 pb pripada RR i najduži fragment od ~1200 pripada SS . Uzorci koji sadrže dvije duljine fragmenata ukazuju na hibrida između dvije vrste s odgovarajućim duljinama fragmenata.

4.2. Analiza PCR produkata COI regije na agaroznom gelu.

Od 156 jedinki kojima je potvrđena SAI-1 regija, iz njih 149 je dobivena sekvenca gena COI koja je uparena sa SAI-1 specifičnom za pojedinu vrstu. Određivanjem sekvence COI regije jedinki žaba u ovom istraživanju utvrđena je prisutnost 3 tipa mtDNA svojstvena za vrste *P. ridibundus*, *P. kurtmuelleri* i *P. lessonae*, dok za *P. shqipericus* nije ustanovljena. Za 54 jedinke (36.24% ukupnog uzorka) je utvrđeno da imaju mtDNA od iste vrste kao i jezgenu DNA. Od 54 jedinki 11 je utvrđeno kao RRr, 38 kao KKk i 5 kao LLI. Za 49 jedinki (32.88% uzorka) je utvrđeno da su hibridi koji imaju mtDNA od jedne roditeljske: 14 ih je utvrđeno kao KRr, 23 kao KKk, 5 kao KLI, 1 kao KSk, 4 kao RLI, te 2 kao RSr. Jedinke kod kojih se javlja mitohondrijska introgresija čini 46 jedinki tj. 30.88%

uzorka. Od 46 jedinki njih 22 su utvrđene kao RR1, 12 kao RRk, 4 kao KKr, 3 kao KKL, 2 kao RSk, 1 kao SSk, 1 kao KR1 i 1 kao KSr.

Sljedovi nukleotidnih baza od 146 jedinki (određeni u Macro genu) su korišteni za određivanje filogenetičkog stabla i filogenetske mreže. Srađnjene COI sekvence analiziranih jedinki iz ovog istraživanja sadrže ukupno 17 različitih haplotipova (Slika 21). Mitohondrijsku DNA karakterističnu za RR posjeduje 31 jedinki, a sadrži 3 različita haplotipa, tip 1 (17%), tip 2 (77%) i tip 11 (6%). Mitohondrijsku DNA karakterističnu za KK posjeduje 75 jedinki, a sadrži 8 različita haplotipa, tip 3 (69%), tip 4 (10%), tip 5 (7%), tip 6 (1%), tip 7 (4%), tip 14 (1%), tip 15 (1%) i tip 17 (7%). Mitohondrijsku DNA karakterističnu za LL sadrži 3 različita haplotipa, tip 8 (50%), tip 9 (2.5%), tip 10 (40%), tip 12 (2.5%), tip 13 (2.5%) i tip 16 (2.5%). Odnosi među haplotipovima prikazani su na filogenetičkoj mreži (Slika 20). Uspoređujući COI sekvence iz ovog istraživanja s javno dostupnim sekvencama iz GenBank baze podataka prikazani su njihovi međusobni odnosi putem filogenetičkog stabla (Slika 21). Stablo prikazuje odvajanje vrste *P. ridibundus*, *P. kurtmuelleri* i *P. lessonae*.



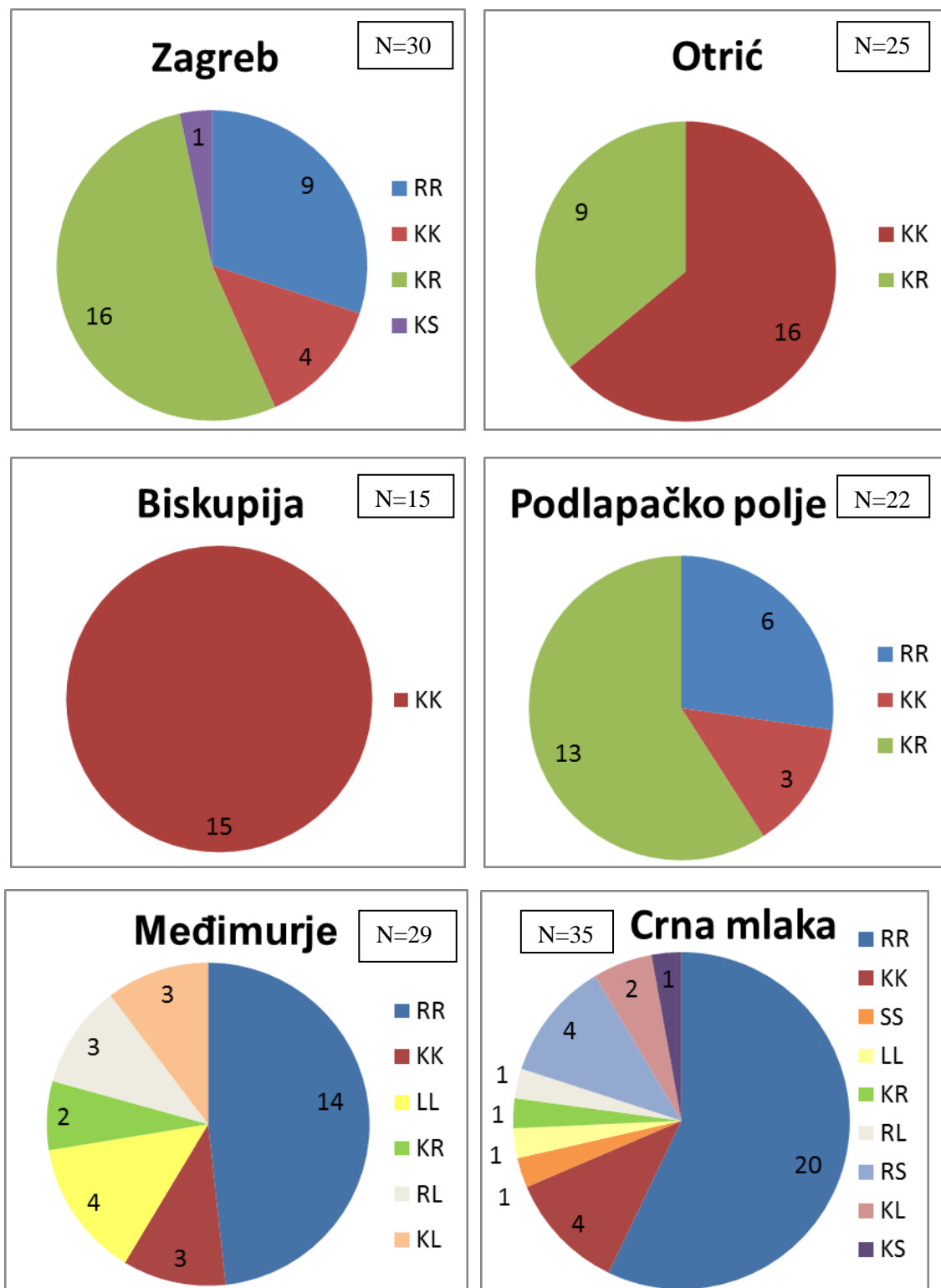
Slika 20. Filogenetički odnosi među haplotipovima unutar jedinki roda *Pelophylax* iz ovog istraživanja prikazani kroz filogenetičku mrežu.



Slika 21: Filogenetički odnosi vrsta roda *Pelophylax* prema COI bilježu. Upotrebom MEGA-e, izrađena su filogenetska stabla za COI sekvence, korištenjem statističkih metoda najveće vjerojatnosti (ML) i najveće štedljivosti (MP). Sekvence COI regije vrsta *P. nigromaculatus* i *P. plancyi* su korištene kao vanjska grupa u filogenetskim rekonstrukcijama.

4.3. Rasprostranjenost i raznolikost roda *Pelophylax* u Hrvatskoj/u ovom istraživanju

Na području Hrvatske unutar ovog istraživanja je utvrđena prisutnost 4 čiste linije i 5 hibridnih vrsta. Prikupljanje jedinki na terenskom dijelu istraživanja je bilo neselektivno s obzirom na vrste i veličinske kategorije te nije rezultiralo u homogenom uzorku. Raznolikost staništa i međusobni brojčani odnosi su prikazani su na slici 22.



Slika 22. Pregled brojnosti taksona roda *Pelophylax* na istraživanim lokacijama

4.4. Morfološke analize

4.4.1. Vanjska morfologija

Tablica 1 i 2 prikazuju rezultate analize vanjskih svojstva prikupljenih žaba. Prikazana je učestalost različitih oblika 12 promatranih svojstva po taksonu. Sedam jedinki od ukupnog nije uvršteno jer im nisu utvrđene SAI-1 regije ili nije bilo moguće slikati morfološke osobine.

Tablica 1. Učestalost vanjskih karkteristika (iz poglavlja 3.3.1.) vrsta *P. kurtmuelleri*, *P. kurtmuelleri* x *P. ridibundus*, *P. kurtmuelleri* x *P. shqipericus* i *P. kurtmuelleri* x *P. lessonae*

Vrsta		<i>P. kurtmuelleri</i>	<i>P. kurtmuelleri</i>	<i>P. lessonae</i>
	<i>P. kurtmuelleri</i>	x	x	x
		<i>P. ridibundus</i>	<i>P. shqipericus</i>	<i>P. kurtmuelleri</i>
N	45 / M=18	41 / M=20	2 / M=0	5 / M=3
Osobina				
I.1	2	1	0	1
I.2	7	7	0	0
I.3	9	12	0	0
II.1	0	0	0	0
II.2	35	28	0	0
II.3	1	0	1	2
II.4	3	4	0	3
II.5	6	9	1	0
III.1	0	0	0	0
III.2	8	8	2	4
III.3	37	33	0	1
IV.1	40	33	1	4
IV.2	0	0	0	0
IV.3	5	8	1	1
V.1	0	0	0	1
V.2	6	9	2	3
V.3	39	32	0	1
VI.1	33	20	1	5
VI.2	12	21	1	0
VII.1	29	25	1	1
VII.2	11	11	2	2
VII.3	5	5	0	2
VIII.1	0	0	0	1
VIII.2	40	35	1	3
VIII.3	0	0	0	0
VIII.4	5	6	1	1
IX.1	7	15	1	2
IX.2	38	26	1	3
X.1	5	2	0	3
X.2	15	14	2	2
X.3	25	25	0	0
XI.1	42	38	2	4
XI.2	3	3	0	1
XII.1	39	38	2	3
XII.2	6	3	0	2

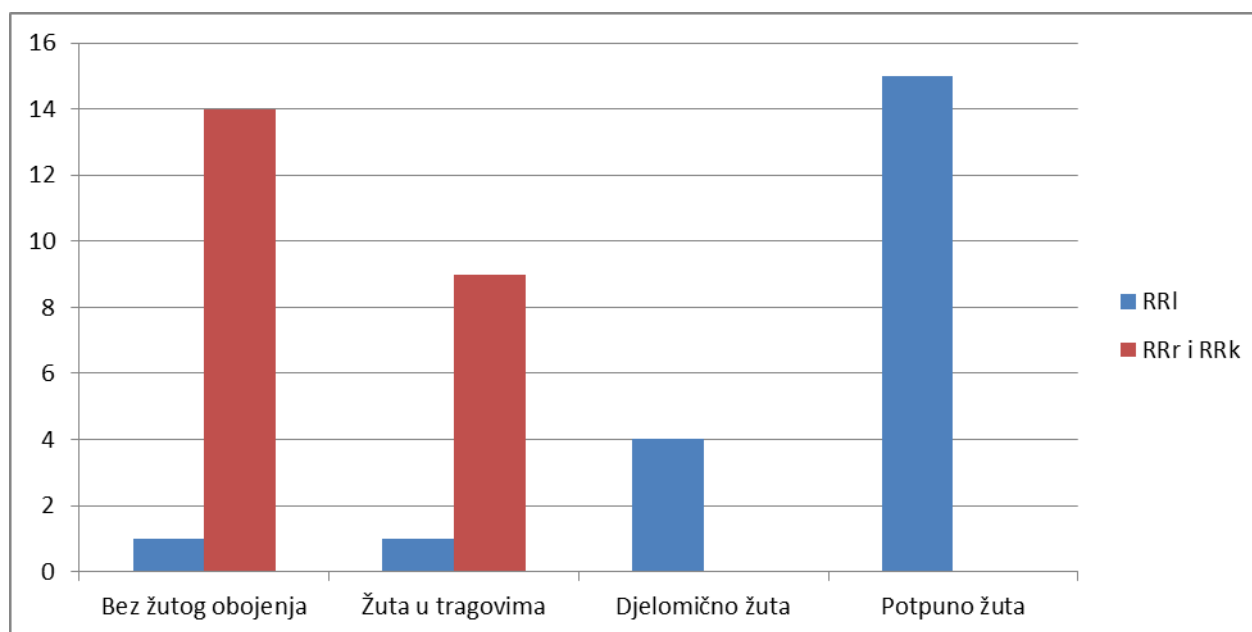
Tablica 2. Učestalost vanjskih karkteristika (iz poglavlja 3.3.1.) vrsta *P. lessonae*, *P. kl. esculentus*, *P. ridibundus*, *P. ridibundus* x *P. shqipericus* i *P. shqipericus*

Vrsta				<i>P. ridibundus</i>	
	<i>P. lessonae</i>	<i>P. kl. esculentus</i>	<i>P. ridibundus</i>	x	<i>P. shqipericus</i>
				<i>P. shqipericus</i>	
N	5	4 / M=2	48 / M=20	4 / M=2	1 / M=0
Osobina					
I.1	4	2	9	0	0
I.2	0	0	8	2	0
I.3	0	0	3	0	0
II.1	0	0	0	0	0
II.2	0	0	15	3	0
II.3	5	3	17	0	0
II.4	0	1	5	0	0
II.5	0	0	11	1	1
III.1	4	2	7	0	0
III.2	1	2	20	1	1
III.3	0	0	21	3	0
IV.1	5	4	42	4	1
IV.2	0	0	1	0	0
IV.3	0	0	5	0	0
V.1	3	2	5	0	0
V.2	2	2	21	1	1
V.3	0	0	22	3	0
VI.1	5	4	32	2	0
VI.2	0	0	16	2	1
VII.1	0	1	13	0	0
VII.2	3	0	21	0	0
VII.3	2	3	14	3	1
VIII.1	5	1	0	0	0
VIII.2	0	3	38	3	1
VIII.3	0	0	0	0	0
VIII.4	0	0	10	1	0
IX.1	0	4	20	3	0
IX.2	5	0	28	1	1
X.1	5	2	6	0	0
X.2	0	2	31	4	0
X.3	0	0	11	0	1
XI.1	1	4	45	4	1
XI.2	4	0	3	0	0
XII.1	4	4	43	4	1
XII.2	1	0	5	0	0

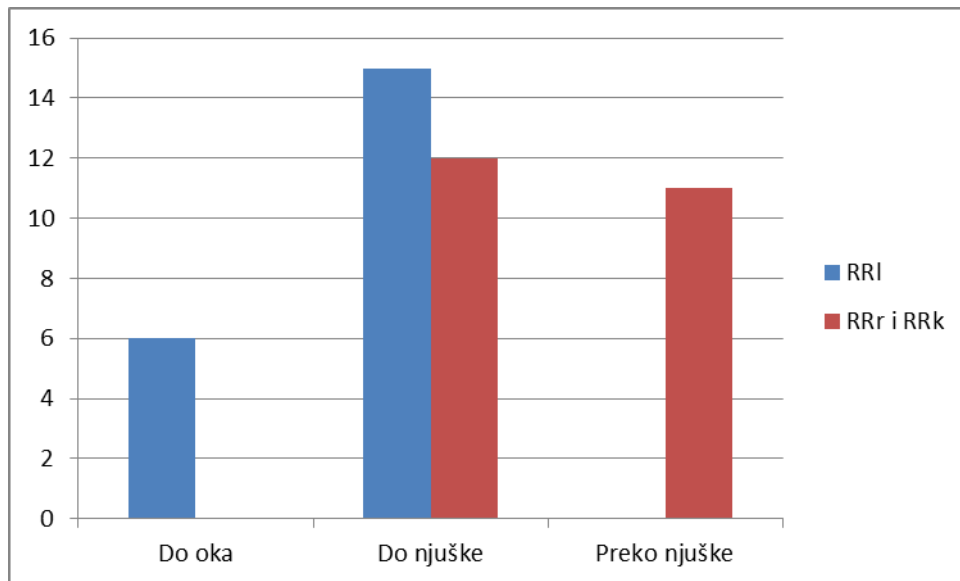
Uspoređujući morfološka svojstva jedinki u odnosu na mtDNA jedino RR jedinke pokazuju razlike u odnosu na mtDNA (Tablica 3). Jedinka sa LL mtDNA pokazuju razlike svojstva u odnosu na jedinke sa RR ili KK mtDNA u obojenju na nogama (Slika 23) i duljini noge (Slika 24).

Tablica 3. Učestalost različitih duljina nogu i obojenja bokova *P. ridibundus* jedinki s *P. ridibundus* *P. kurtmuelleri* ili *P. lessonae* mtDNA.

		RRI	RRr	RRk
Duljina noge	Do oka	6	0	0
	Do njuške	15	1	11
	Preko njuške	0	10	1
Obojenje bokova	Bez žutog obojenja	1	7	7
	Žuta u tragovima	1	4	5
	Djelomično žuta	4	0	0
	Potpuno žuta	15	0	0



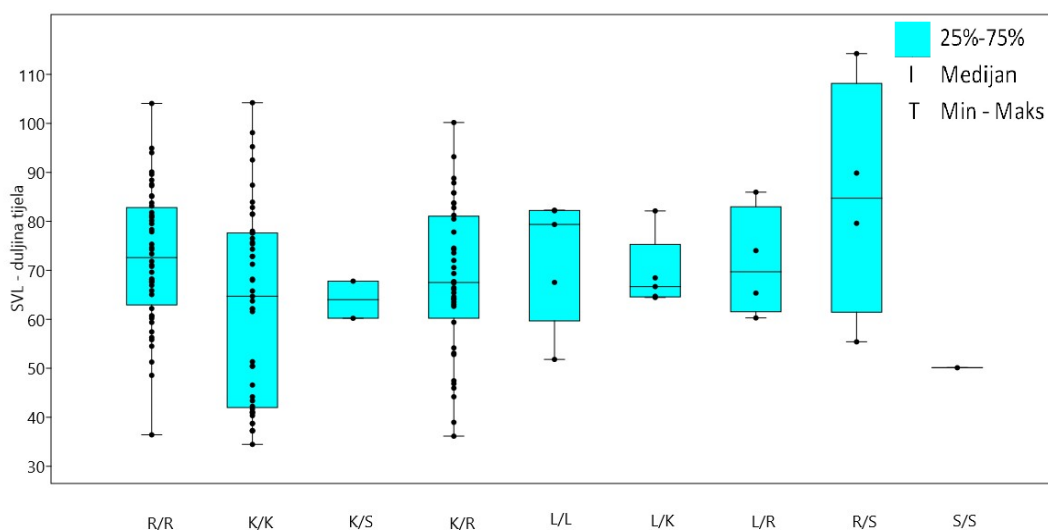
Slika 23. Učestalost žutog obojenja na nogama kod RRI (plavo) u odnosu na RRr i RRk (crveno).



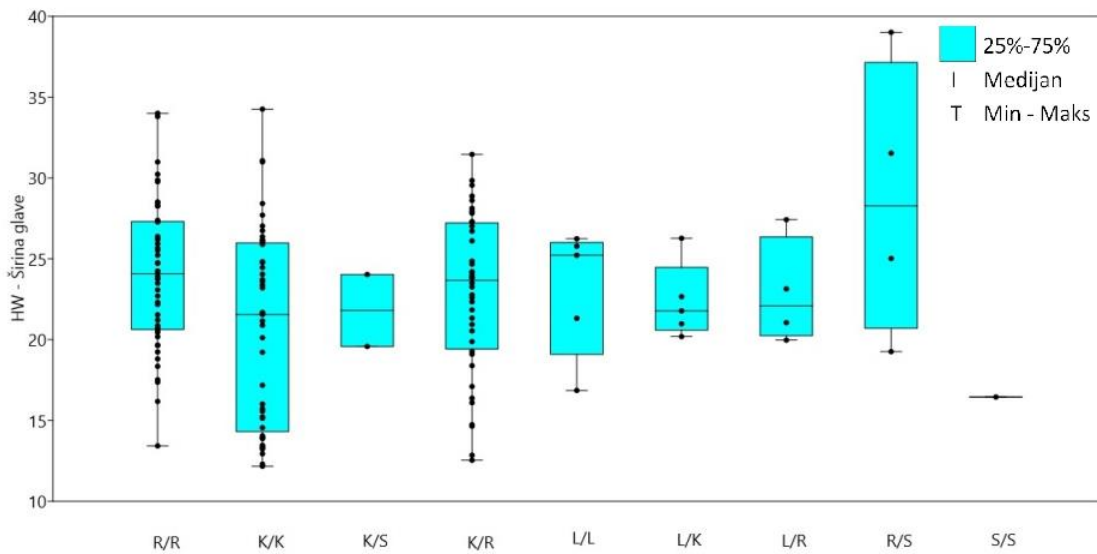
Slika 24. Frekvencija različitih duljina stražnje noge taksona RRI (plavo), RRr i RRk (crveno).

4.4.2. Morfometrija

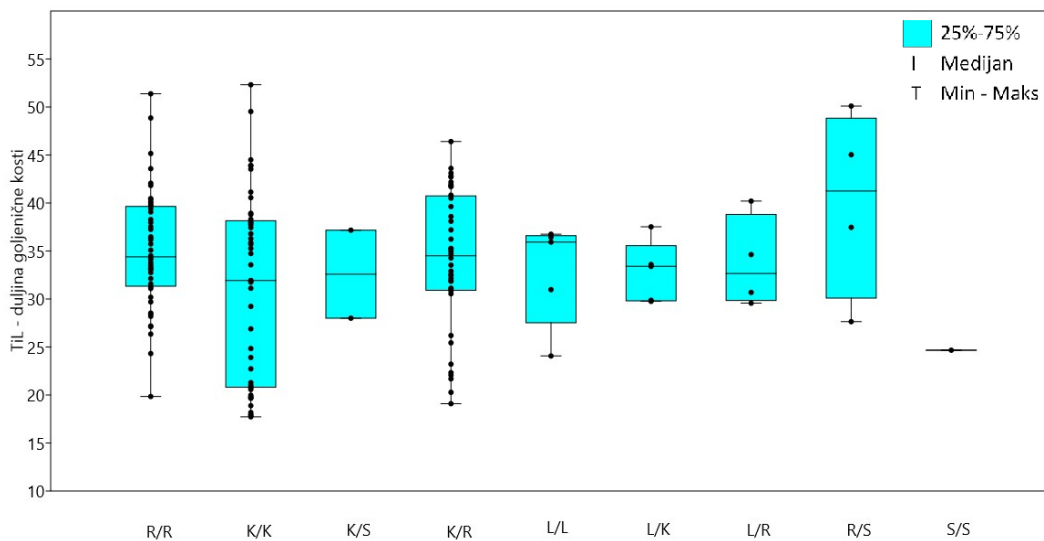
Minimalne i maksimalne vrijednosti svih mjera za sve taksona dane su u slikama 25, 26, 27, 28, 29, 30. Vrste LL genoma prikazuju srednju vrijednost jednaku ili višu kao i jedinke sa RR ili KK genomom što nije bilo za očekivati. Ta pojava se može objasniti time da su KK ili RR uzorkovane u svim veličinskim i starosnim kategorijama dok su LL jedinke uzorkovane samo u odraslom stadiju. Ista činjenica vrijedi i za ostale skupine koje imaju manje od 10 jedinki unutar skupine.



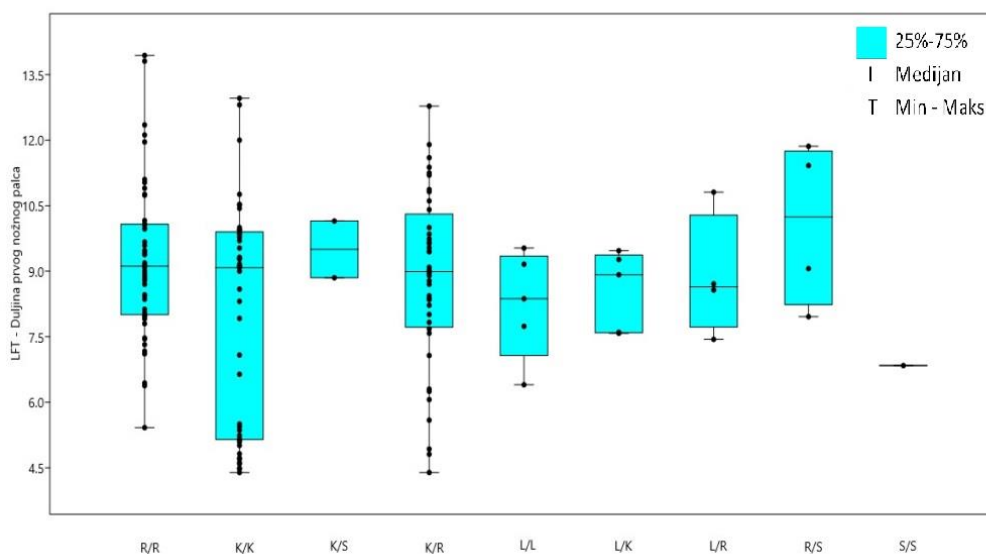
Slika 25. Raspon duljine tijela (SVL) promatranih taksona roda *Pelophylax*.



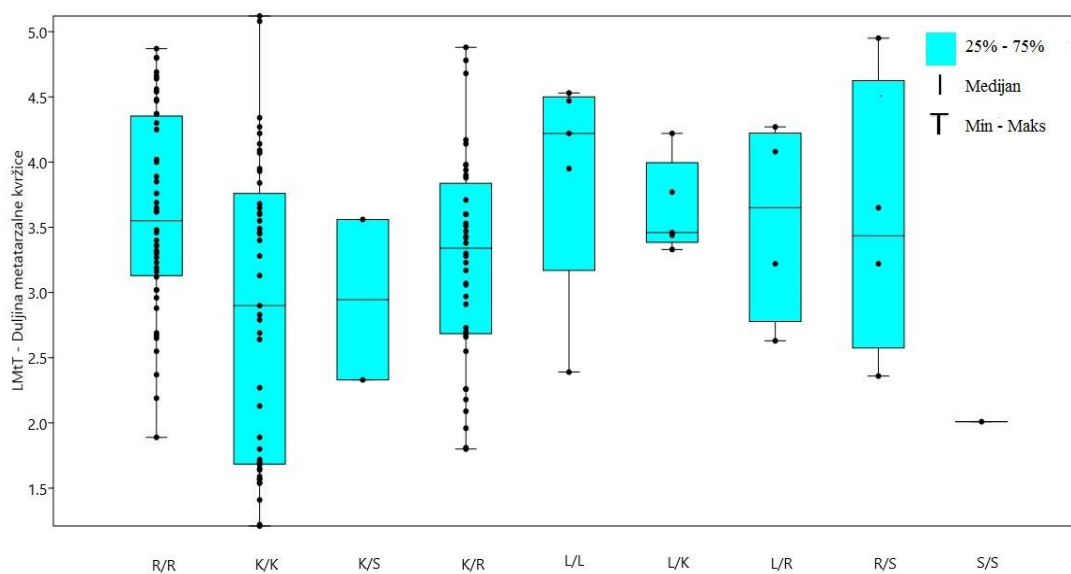
Slika 26. Raspon širine glave (HW) promatranih taksona roda *Pelophylax*



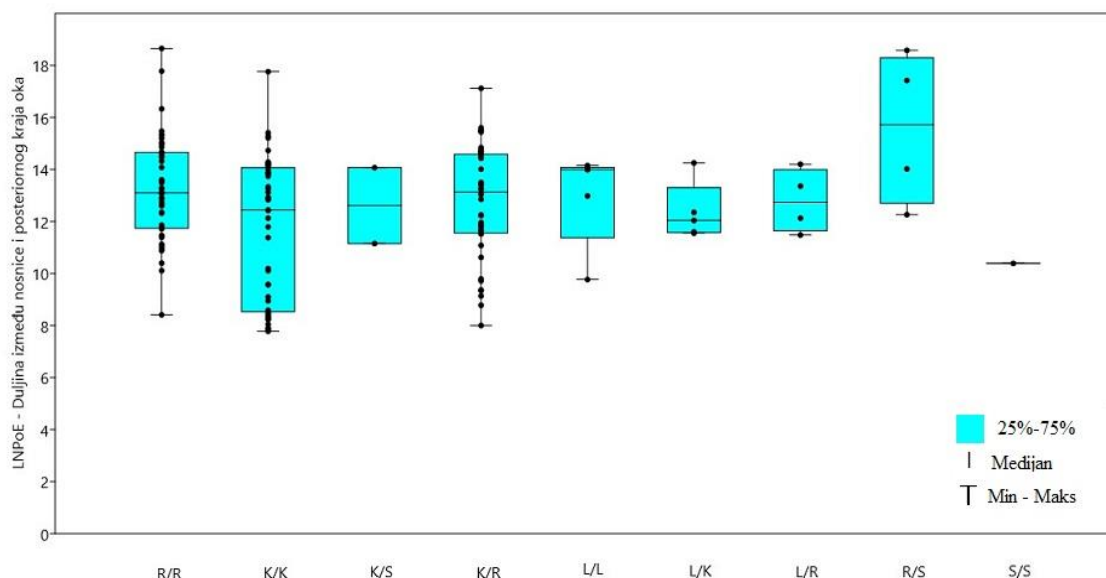
Slika 27. Raspon duljine goljenične kosti (TiL) promatranih taksona roda *Pelophylax*



Slika 28. Raspon duljine prvog nožnog palca (LFT) promatranih taksona roda *Pelophylax*



Slika 29. Raspon duljine metatarzalne kvržice (LMtT) promatranih taksona roda *Pelophylax*

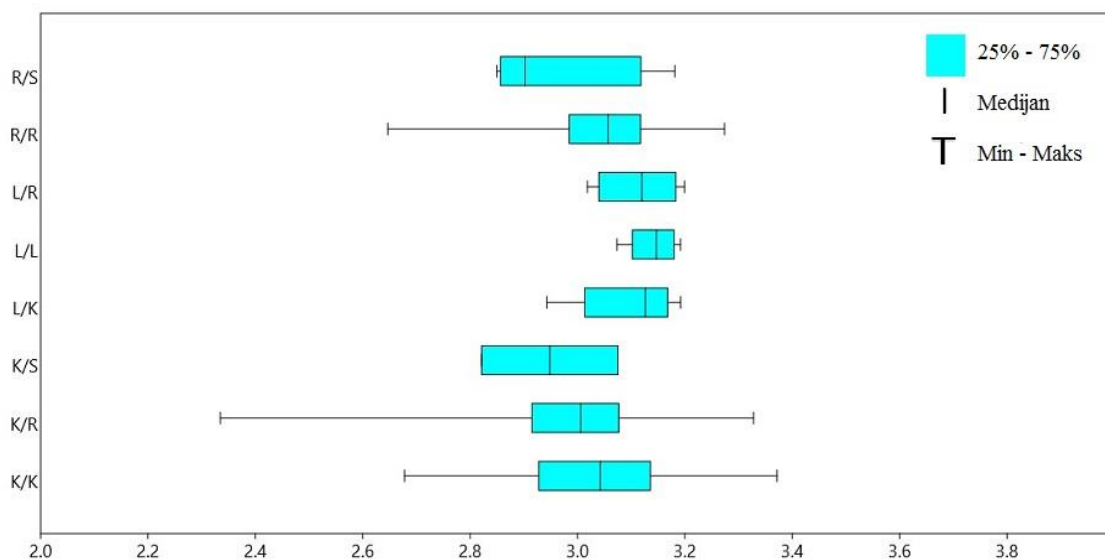


Slika 30. Raspon duljine između nosnice i posteriornog kraja oka (LNPoE) promatranih taksona roda *Pelophylax*

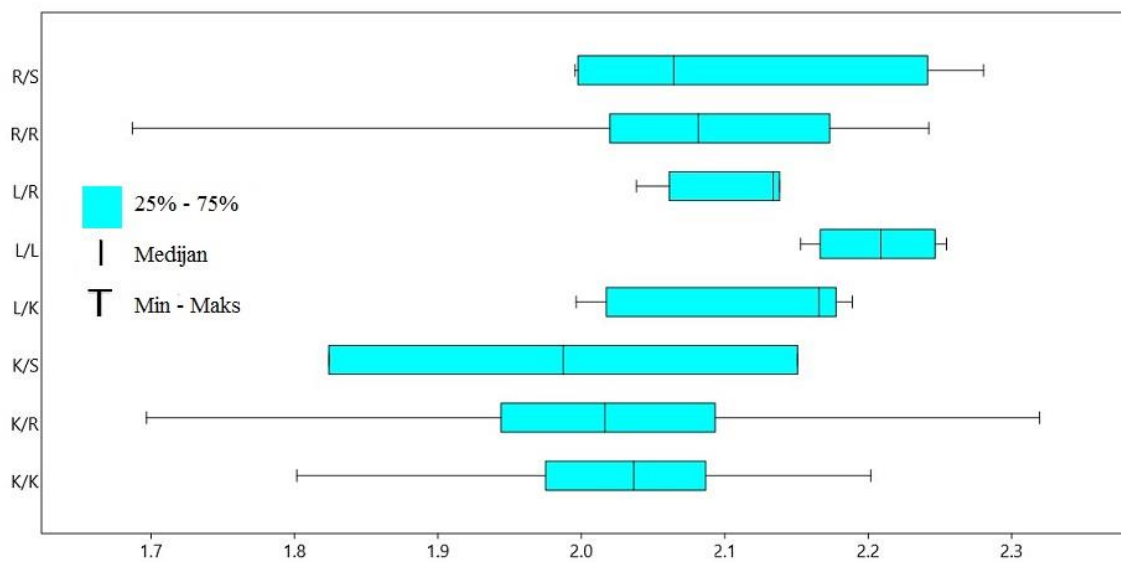
Izmjerene vrijednosti jedinki roda *Pelophylax* postavljene su u 15 omjera. Omjeri su SVL/HW, SVL/Til, SVL/LFT, SVL/LMtT, SVL/LNPoE, HW/Til, HW/LFT, HW/LMtT, HW/LNPoE, Til/LFT, Til/LMtT, Til/LNPoE, LFT/LMtT, LFT/LNPoE i LMtT/LNPoE. Kruskal – Wallis test je bio proveden na svim omjerima uspoređujući sve jedinke podijeljene u taksona, radi izračuna vrijednosti koje su statistički značajne (Tablica 4). Rezultati prikazuju da je 8 omjera statistički značajno ($p < 0.05$) između svih taksona; SVL/HW, SVL/Til, SVL/LFT, SVL/LMtT, HW/LMtT, Til/LMtT, LFT/LMtT, LMtT/LNPoE. Raspon 8 omjera prikazani su Slikama 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37 i 38. 4 dobivena omjera sa statističkom značajnošću ($p < 0.05$) su dobiveni u prijašnjim radovima (Karaica i sur. 2016, Krizmanić 2008) koristeći parametrijski test statističke značajnosti, ANOVA. Ti omjeri uključuju Til/LMtT, LFT/LMtT, SVL/Til i SVL/LMtT te su oni korišteni u daljnjim analizama. Uspoređujući dva omjera, koji sadrže jednu istu mjeru, preko raspršenog grafikona se prikazalo odvajanje prosječne vrijednosti taksona (slike 39, 40, 41 i 42).

Tablica 4. Rezultati Kruskal-Wallis statističkog testa za sve morfološke omjere istraživanih vrsta roda *Pelophylax*. Omjeri uključuju mjere SVL - dužina tijela, HW - širina glave; TiL - dužina goljenične kosti; LFT - duljina prvog nožnog palca; LMtT - duljina metatarzalne kvržice; LNPeE - duljina između nosnice i posteriornog kraja oka Statistički značajne vrijednosti ($p < 0,05$) su prikazane u masno otisnutim slovima.

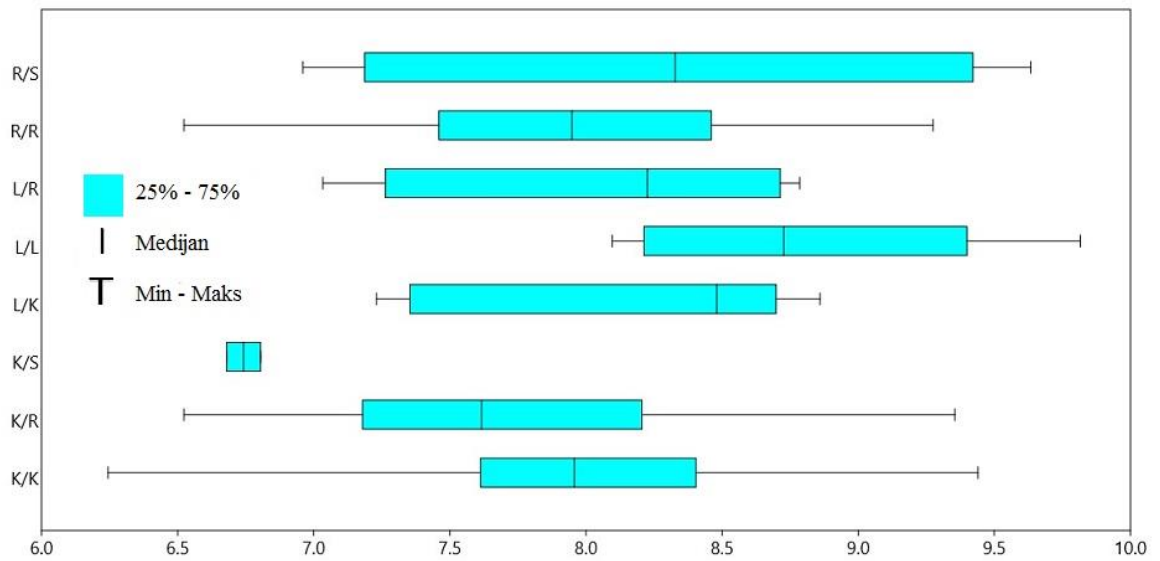
Omjer	p vrijednost
SVL/HW	0,043
SVL/TiL	0,000
SVL/LFT	0,049
SVL/LMtT	0,000
SVL/LNPeE	0,218
HW/TiL	0,060
HW/LFT	0,262
HW/LMtT	0,000
HW/LNPeE	0,285
TiL/LFT	0,237
TiL/LMtT	0,000
TiL/LNPeE	0,562
LFT/LMtT	0,000
LFT/LNPeE	0,153
LMtT/LNPeE	0,000



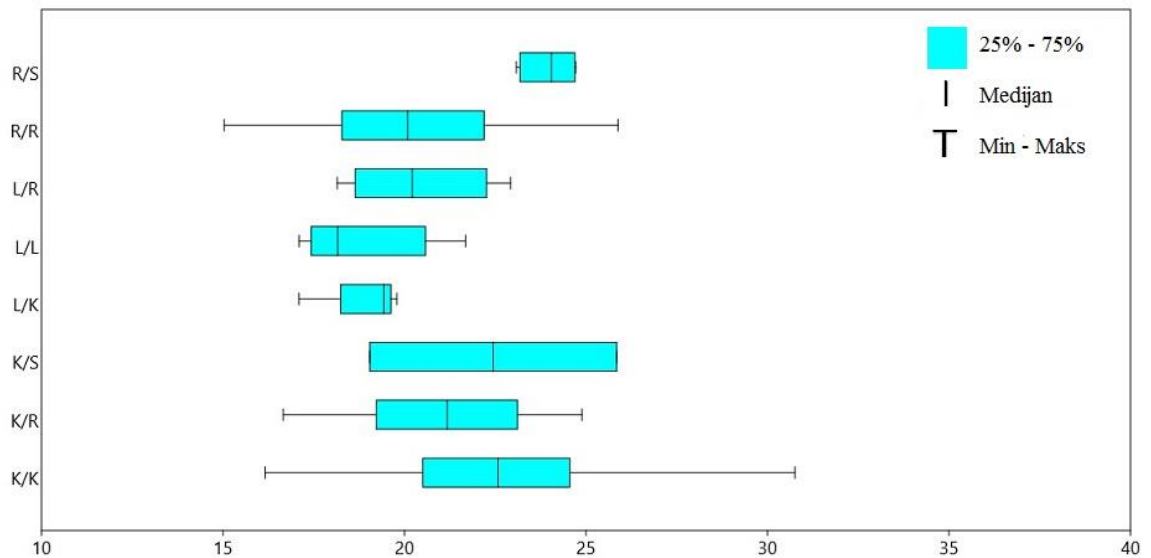
Slika 31. Raspon omjera SVL/HW (duljina tijela/ širina glave) ($p < 0,05$) za promatrane taksone roda *Pelophylax*



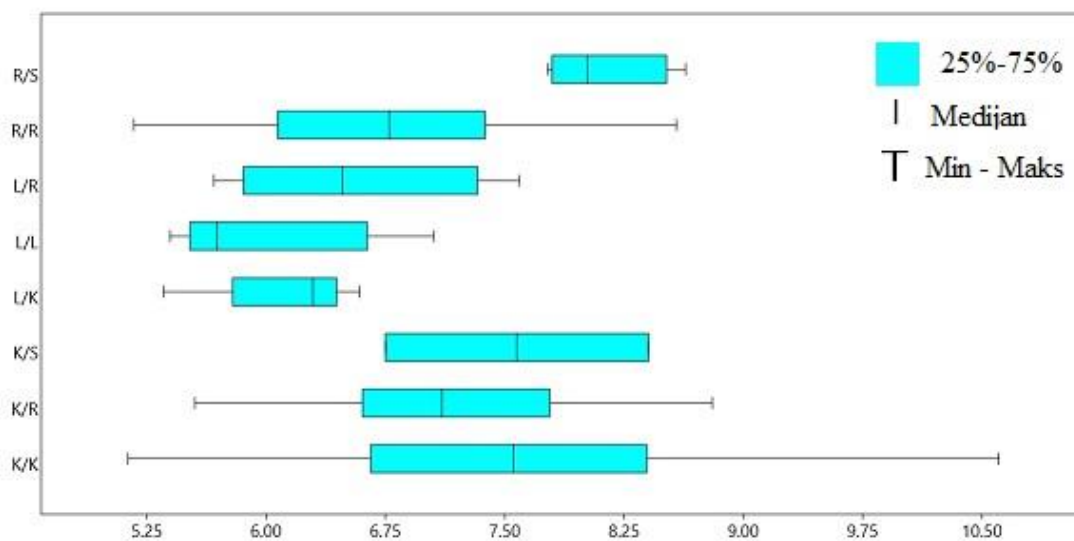
Slika 32. Raspon omjera SVL/Til (duljina tijela/duljina goljenične kosti) ($p < 0,05$) za promatrane taksone roda *Pelophylax*



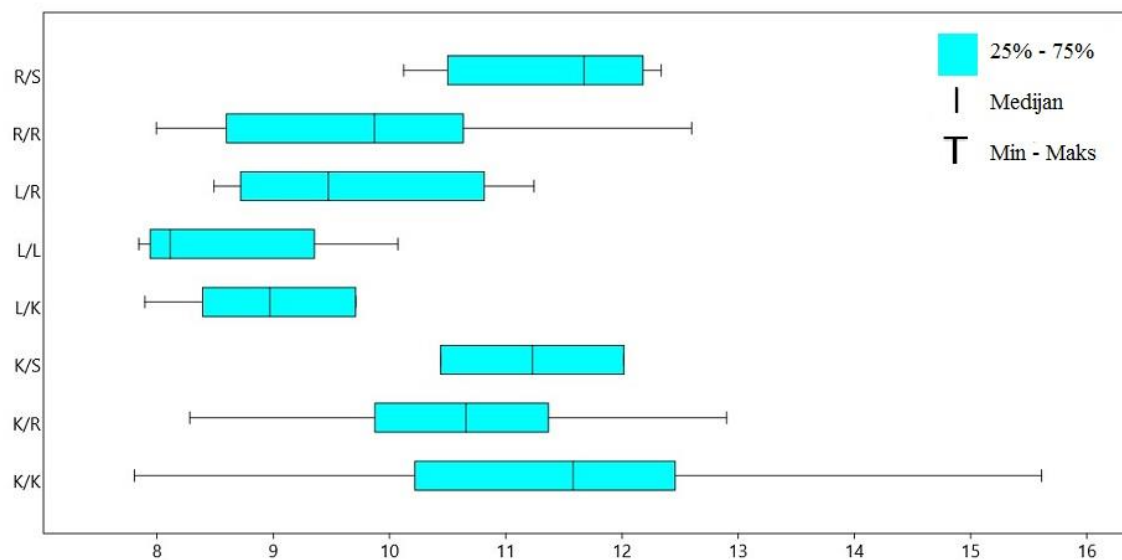
Slika 33. Raspon omjera SVL/LFT (duljina tijela /duljine prvog nožnog palca) ($p < 0,05$) za promatrane taksone roda *Pelophylax*



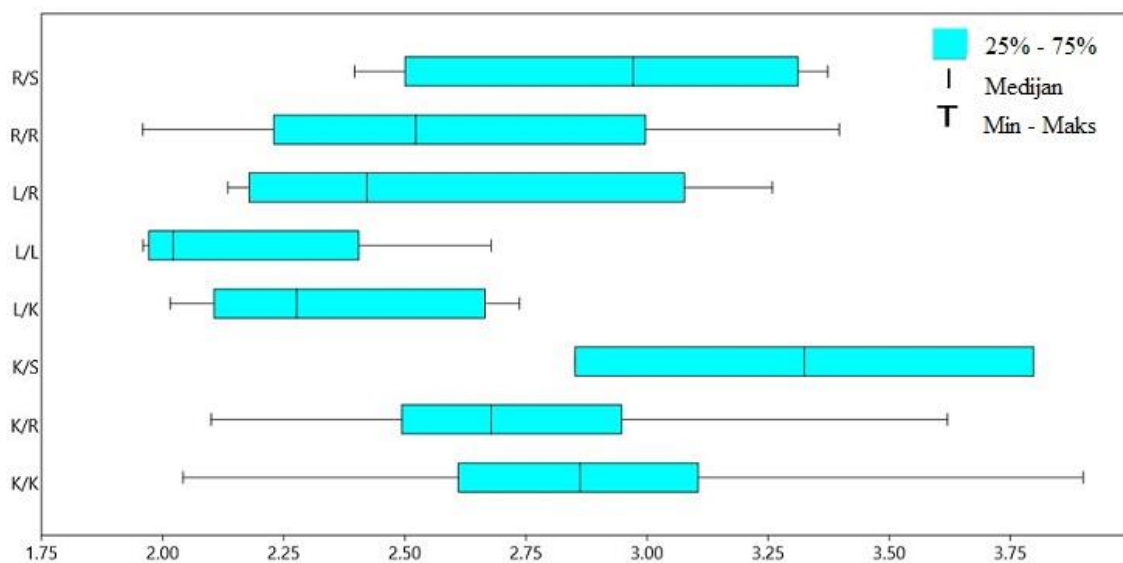
Slika 34. Raspon omjera SVL/LMtT (duljina tijela/duljina metatarzalne kvržice) ($p < 0,05$) za promatrane taksone roda *Pelophylax*



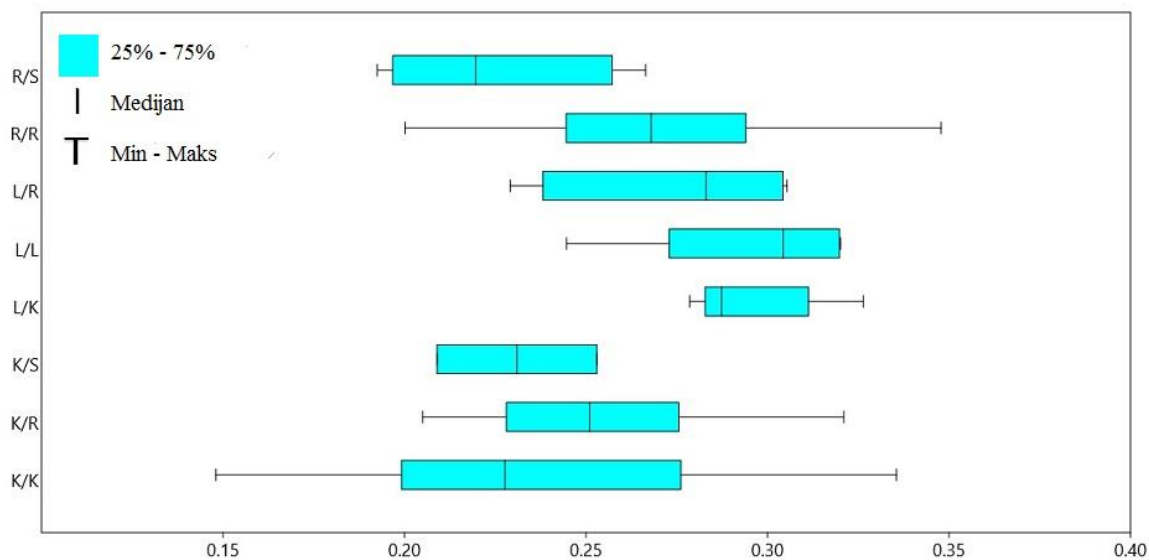
Slika 35. Raspon omjera HW/LMtT (širina glave/ duljina metatarzalne kvržice)($p < 0,05$) za promatrane taksone roda *Pelophylax*



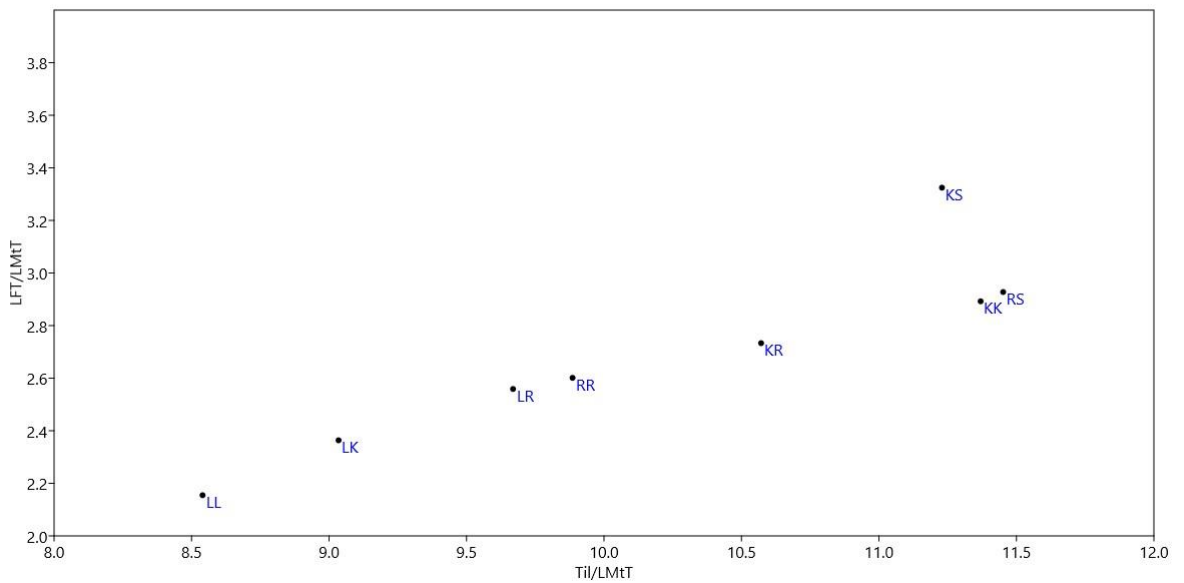
Slika 36. Raspon omjera Til/LMtT (duljina goljenične kosti/duljina metatarzalne kvržice) ($p < 0,05$) za promatrane taksone roda *Pelophylax*



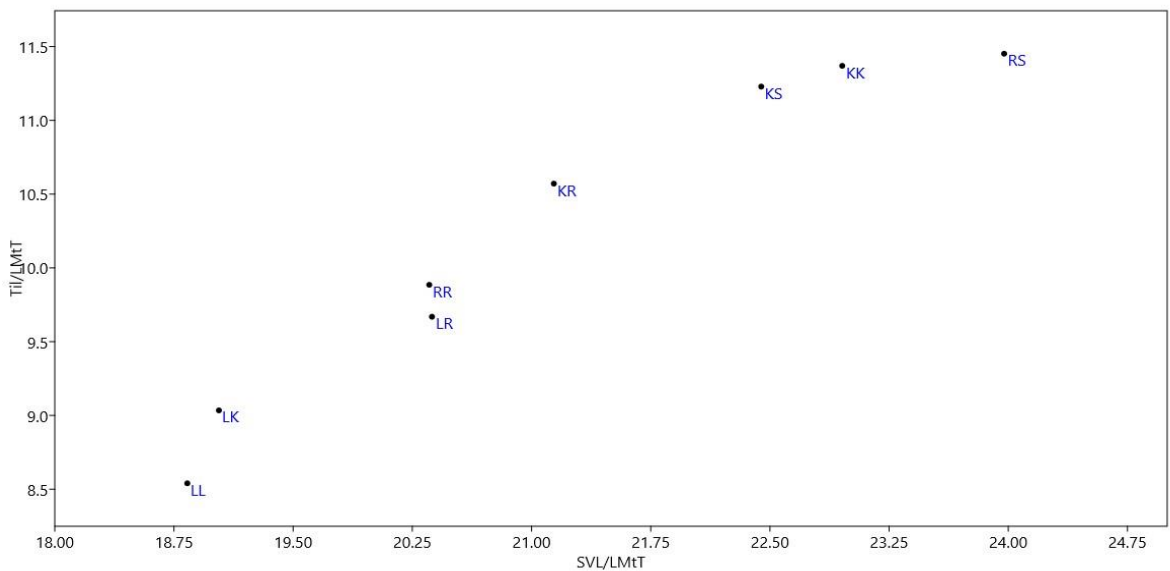
Slika 37. Raspon omjera LFT/LMtT (duljine prvog nožnog palca/duljina metatarzalne kvržice) ($p < 0,05$) za promatrane taksone roda *Pelophylax*



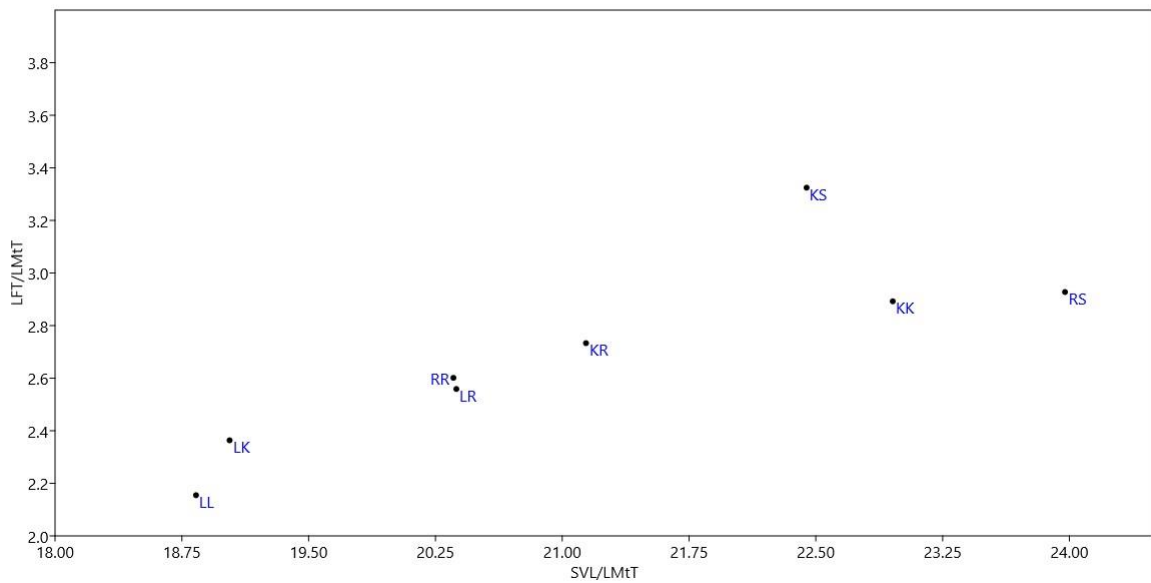
Slika 38. Raspon omjera LMtT/LNPOE (duljina metatarzalne kvržice/ duljina između nosnice i posteriornog kraja oka) ($p < 0,05$) za promatrane taksone roda *Pelophylax*



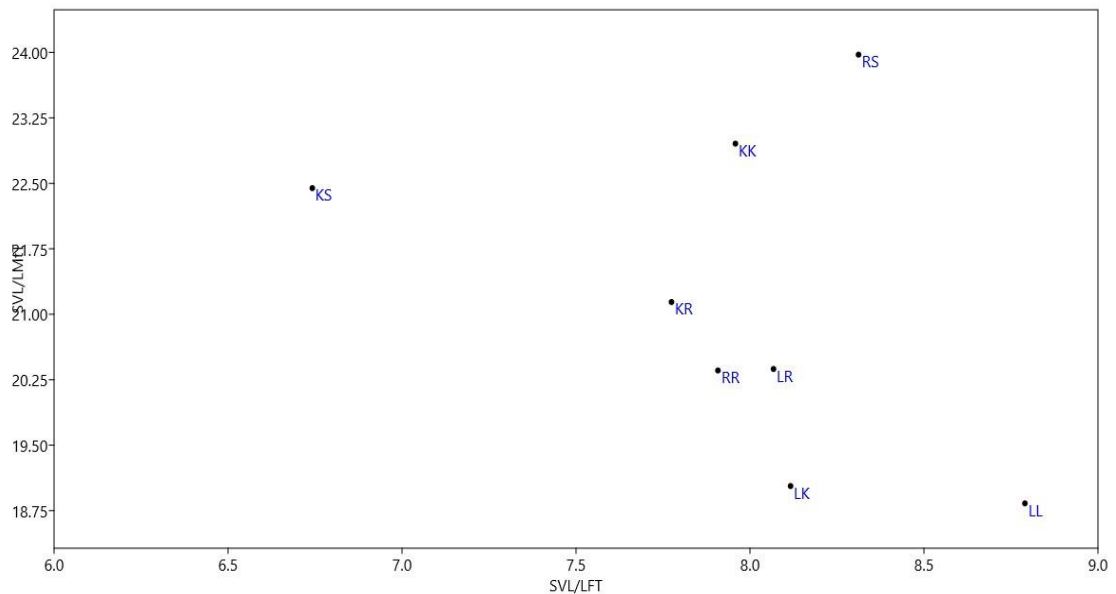
Slika 39. Odnosi aritmetičkih sredina omjera Til/LMtT (duljina goljениčne kosti/duljina metatarzalne kvržice) i LFT/LMtT (duljine prvog nožnog palca/duljina metatarzalne kvržice) između vrsta i hibrida roda *Pelophylax*.



Slika 40. Odnosi aritmetičkih sredina omjera SVL/LMtT (duljina tijela/duljina metatarzalne kvržice) i Til /LMtT (duljina goljениčne kosti/duljina metatarzalne kvržice) između vrsta i hibrida roda *Pelophylax*.

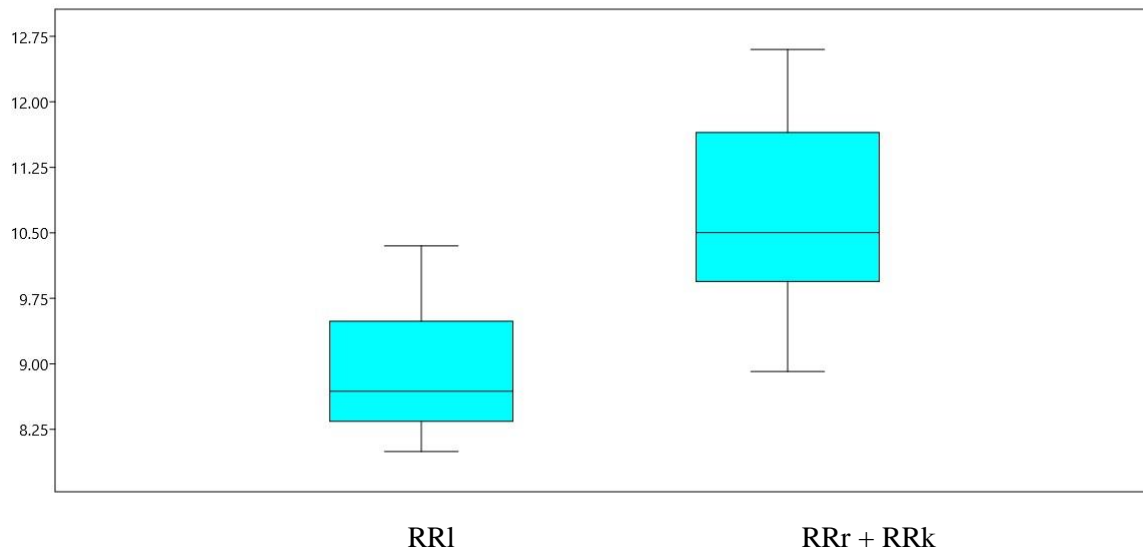


Slika 41. Odnosi aritmetičkih sredina omjera SVL/LMtT (duljina tijela/duljina metatarzalne kvržice) i LFT/LMtT (duljine prvog nožnog palca/duljina metatarzalne kvržice) između vrsta i hibrida roda *Pelophylax*.



Slika 42. Odnosi aritmetičkih sredina omjera SVL/LMtT (duljina tijela/duljina metatarzalne kvržice) i T1l/LMtT (duljine prvog nožnog palca/duljina metatarzalne kvržice) između vrsta i hibrida roda *Pelophylax*.

Uspoređujući duljine goljениčne kosti i metatarzalne kvržice između RR1 i RRr + RRk jedinki pokazuje se razdvajanje te dvije skupine (Slika 43).



Slika 43: Raspon omjera Til/LMtT uspoređujući RR1 i RRr + RRk

5. Rasprava

U Hrvatskoj se unutar posljednjih desetak godina otkrila veća raznolikost unutar roda *Pelophylax* nego što je to utvrđeno prijašnjim istraživanjima. Prisutnost novih vrsta i njihovih hibrida sa zabilježenim vrstama, kao i utvrđena široka distribucija novih vrsta, stvara potrebu njihove točne determinacije morfometrijskom analizom, kako bi se terenskim istraživanjem mogla procijeniti njihova prisutnost. Najtočnija metoda određivanja vrste je molekularnim analizama, no one se ne mogu izvoditi na terenu. Nužno je zbog toga upotrebom molekularno-filogenetičkih i morfoloških analiza na istim jedinkama izdvojiti najbolje morfološke karakteristike analiziranih žaba za njihovu što točniju determinaciju.

Na temelju rasprostranjenosti vrsta roda *Pelophylax* u Hrvatskoj, dobivenih ovim istraživanjima, moguće je podijeliti Hrvatsku na dvije regije: sjevernu i južnu. U južnu regiju spadaju lokaliteti u Lici i Dalmaciji: Otrić, Biskupija i Podlapačko polje, gdje su utvrđene jedinke *Pelophylax kurtmuelleri* (KK), *Pelophylax ridibundus* (RR) i njihovi hibridi (KR) (Slika 22). Sjeverna regija sadrži 4 vrste, RR, KK, *P. lessonae* (LL) i *P. shqipericus* (SS) te njihove hibride RK, RL, RS, KL i KS (Slika 22). Vrstu *P. kl. esculentus* hibridnog kompleksa nalazimo na sjeveru Hrvatske što se podudara s literaturnim nalazima, i samo RR na jugu (Holsbeek i Jooris 2010). KK je jedina vrsta koja je pronađena na svim istraživanim lokalitetima. Uz široku distribuciju u Hrvatskoj, KK se po novijim istraživanjima nalazi i u drugim zemljama, kao što su Poljska i Srbija (Kolenda i sur. 2017), iako IUCN (2018) navodi da je nalazimo samo na jugu Balkanskog poluotoka i sjeverne Italije. Kolenda i sur. (2017) su utvrdili prisutnost KK preko jezgrinih (SAI-1) i mitohondrijskih (cyt-b) markera. Pretpostavili su da je do širenja *P. kurtmuelleri* moglo doći slučajnom translokacijom prilikom transporta riba za potrebe uzgoja u akvakulturi ili recentnijim odvajanjem od *P. ridibundus* gdje dulje vrijeme nije bila prepoznata zbog velike sličnosti. Stoga velika prisutnost *P. kurtmuelleri* u Hrvatskoj upućuje na slične događaje koji upućuju na veliki migracijski potencijal. *P. shqipericus* i njeni hibridi s *P. ridibundus* i *P. kurtmuelleri* su ponovo utvrđeni kao i u nedavnim istraživanjima (Koska 2016), ali pronalasci hibrida SK na lokalitetu u Zagrebu upućuju na potencijalno širu distribuciju SS u Hrvatskoj. Mogućnost da se *P. shqipericus* utvrdi toliko sjeverno od svojeg prirodnog areala podkrijepljuju i recentni nalazi iz Italije (Domeneghetti i sur. 2013).

Prema analizi COI sekvenci, *P. kurtmuelleri* pokazuje veću raznolikost s 8 haplotipa u odnosu na samo 3 haplotipa utvrđenih u *P. ridibundus* (Slika 21). RR i KK se odvajaju kao zasebne vrste prema filogenetičkom stablu dobivenom u ovom istraživanju (Slika 21), što je i potvrđeno novijim istraživanjima (Hofman i sur. 2015, Plötner i sur. 2010).

5.1. Genetička raznolikost vrsta roda *Pelophylax* u Hrvatskoj

Lokaliteti unutar područja Dalmacije i Like pokazuju manju genetičku raznolikost vrsta žaba roda *Pelophylax* od vrsta iz sjeverne Hrvatske. Uz odsutnost vrsta *P. shqipericus* i *P. lessonae*, vrste *P. kurtmuelleri* i *P. ridibundus* i njihovi hibridi dijele samo mtDNA *P. kurtmuelleri*, dok je u sjevernoj Hrvatskoj prisutna mtDNA *P. ridibundus* i *P. lessonae* (Slika 20). Njihova mtDNA sadrži samo 4 različita haplotipa (3, 5, 6 i 7) koji su jedino u dva druga slučaja utvrđeni u sjevernoj Hrvatskoj (1 KK jedinka sa haplotipom u Zagrebu i jedna KK jedinka u Crnoj Mlaci) (Slika 20). Haplotip 3 sadrži većina jedinki. Haplotipovi 3, 5, 6 i 7 prikazuju odvajanje od drugih KK haplotipova Crne Mlake po filogenetičkom stablu i mreži (Slike 20, 21). Najjužnija lokacija, Biskupija, sadrži samo KK jedinke, dok sjevernija lokacija na Otriću sadrži KR hibride i KK, a ona na Podlapačkom polju (Slika 22) KK, RR i njihov hibrid. *P. ridibundus* stoga nije najčešća vrsta unutar južnih lokacija, iako je jedina literaturno potvrđena te pokazuje pad brojnosti prema jugu. Sve jedinke sadrže mtDNA *P. kurtmuelleri* što upućuje na to da je *P. kurtmuelleri* već duže vrijeme prisutna na tom području i prevladava staništem jer su se sva razmnožavanja morala razviti iz KK ženki te da su RR mužjaci preferirali KK ženke u odnosu na RR ženke. Na Podlapačkom polju, usprkos prevladavanju mtDNA *P. kurtmuelleri*, najčešće su jedinke ipak hibridi KR (59%), dok je KK najrjeđa vrsta sa 14% jedinki. Hibrid RK je utvrđen u nedavnim istraživanjima Kolende i sur. (2017) u Poljskoj i Koske (2016) u Crnoj Mlaci. Poznato je da hibridi mogu imati određene ekološke prednosti koje im mogu omogućiti bolje preživljavanje (Plötner 2008), što je moguće i u ovom slučaju. Suprotan slučaj nalazimo na Otriću gdje je 36% hibrida i 64% KK, no moguće da bi udio hibrida bio veći kada bi bila prisutna i druga roditeljska vrsta RR.

Zagreb, tj. Reka dijeli sličnost s vrstama iz južne Hrvatske po nuklearnoj DNA, ali ne i s mtDNA. Ustanovljena je prisutnost vrsta RR, KK i njihovog hibrida, kao i na lokaciji Podlapačko polje. Uz te vrste pronađena je i jedna jedinka KS hibrida (Slika 22). KS hibridi u prirodnim populacijama su utvrđeni na Skadarskom jezeru (Vucić 2015) te na lokalitetu Crna Mlaka u Hrvatskoj (Koska 2016). Unutar većine jedinki se nalazi mtDNA *P. ridibundus* (89%) dok 3 jedinke (11%) imaju mtDNA *P. kurtmuelleri* (haplotip 4 i haplotip 3) (slika 21). Jedina KKk jedinka u populaciji dijeli haplotip 3 s najčešćim KK haplotipom iz južnih populacija. mtDNA *P. ridibundus* je zastupljena s dva haplotipa, tip 2 (70.5%) koji imaju sve vrste na lokalitetu i rjeđi tip 1 (18.5%). Jedina KS jedinka u populaciji ima mtDNA *P. ridibundus* (tip 2) te tako predstavlja poseban nalaz jer sadrži genetski materijal tri vrste žaba. Jedan od predaka joj je morala biti vrsta RR koja je stvorila fertilni hibrid s KK ili SS. Sličan slučaj gdje je u jednoj jedinci utvrđen genetski materijal triju vrsta žaba, već je jednom utvrđen unutar roda *Pelophylax* (Plötner 2008). Tip 2 haplotipa dijele jedinka KS s Reke i dvije RS jedinke iz Crne Mlake, dok ostali RR haplotipovi nemaju jedinki sa genomom *P. shqipericus* (Slika 20). Dvije KK jedinke dijele isti haplotip 4 kao i jedinke iz Crne Mlake, dok haplotip 3 dijeli jedna jedinka s KK jedinkama iz južne Hrvatske, što ukazuje da imaju malu, ali postojanu genetičku

povezanost iz prošlosti (Slika 20). U južnoj Hrvatskoj se ne ponavljaju RR vrste s mtDNA *P. ridibundus*, dok se u Zagrebu javlja KK s mtDNA *P. kurtmuelleri*. *P. ridibundus*, iako srodna sa *P. kurtmuelleri*, češće ulazi u hibridizacije s drugim vrstama, stoga postoji veća šansa da „izgubi“ svoju mtDNA. Hibride *P. kurtmuelleri* ne nalazimo toliko često te stoga ta vrsta ima veće šanse da zadrži svoju mtDNA (Plötner 2008). U populacijama u Zagrebu također je najprisutniji hibrid KR u svim haplotipovima što potvrđuje pretpostavku da su hibridi bolje prilagođeni (Plötner 2008).

Lokacija u Međimurju pokazuje veliku raznolikost s prisutnim čistim vrstama RR, LL, KK i hibridnim vrstama RL, RK i RK (Slika 22). Polovica jedinki čini RR jedinke 48%, dok su podjednako zastupljene sve ostale vrste LL (14%), KK (10%), RL (10%), KL (10%) i KR (7%). Međutim, većina jedinki dijeli mtDNA *P. lessonae* (93%), podijeljenu u 4 haplotipa: 8, 9, 10 i 12. Prisutnost mtDNA *P. lessonae* u drugim vrstama, kao što je *P. ridibundus*, je pojava introgresije mitohondrijske DNA koja je utvrđena u Njemačkoj (Plötner 2008). Introgresija je uznapredovala budući da većina jedinki ima mtDNA *P. lessonae* te se smatra da ona daje ekološke prilagodbe zbog čega je njihovo preživljavanje učestalije. LL jedinke te populacije su mužjaci (100%). Ta činjenica se podudara s hipotezom da je introgresija mtDNA *P. lessonae* u RR nepovratna jer je razmnožavanje češće između LL mužjaka i RR ženki unutar kojih je već prisutna mtDNA *P. lessonae* (Spolsky i Uzzell 1984, Plötner i sur. 2008). RR i KK jedinke ulaze u jednak broj hibrida, no na lokalitetu međutim nije prisutna mtDNA *P. kurtmuelleri*, što potvrđuje fertile hibride *P. ridibundus* (Holsbeek i Jooris 2010). Unutar jedne hibridne jedinke KR, se nalazi mtDNA *P. lessonae* što je primjer uznapredovale introgresije unutar lokacije jer sadrži gene 3 različite vrste žaba. Jedinke koje sadrže mtDNA *P. ridibundus* (7%) sadrže isti haplotip 11 (jedna RR i jedna KR jedinka), a taj haplotip nije pronađen na drugom lokaciji u Hrvatskoj. Prisutnost KK jedinki u populaciji može prouzročiti pad populacije RL sustava jer se troši reproduktivni potencijal (Hotz i sur. 1985), međutim sve KK i KL jedinke u ovoj populaciji sadrže mtDNA *P. lessonae*, stoga je nepoznato kakav utjecaj imaju na populaciju. Hibridi KL do sada su utvrđeni samo u eksperimentalnim istraživanjima (Hotz i sur. 1985), dok su u prirodnim populacijama utvrđeni samo na ovom lokalitetu u ovom i prijašnjem istraživanju Koske (2016). MtDNA *P. lessonae* u Međimurju sadrži 4 haplotipa od koja su dva najčešća (10 i 8) i njih dijele s jedinkama u Crnoj Mlaci koji također posjeduju iste haplotipove, dok za ostala dva haplotipa (9 i 12) postoji po jedna jedinka. mtDNA *P. lessonae* tako ima povezanost s ostatkom Hrvatske, dok mtDNA *P. ridibundus* na toj lokaciji nema.

Lokacije na Crnoj Mlaci (1 i 2) su se pokazale najbogatijima za čiste vrste i za hibride. Utvrđene su vrste RR, LL, KK i SS. RR i KK stvaraju hibride sa svim ostalim vrstama i međusobno, što ukupno čini 9 genotipa na tom lokalitetu (hibridi su RL, RK, RS, KL i KS) (Slika 22). LL i nekoliko RR jedinki je pronađeno na staništu Crna Mlaka 1 koje je više terestrično nego Crna Mlaka 2, što se podudara s odabirom mikrostaništa LL (Arnold i Ovenden 2004). Ostale vrste su nađene na lokalitetu Crna Mlaka 1 koji je više akvatični. Najčešća „čista“ vrsta RR je zastupljena s 57%, dok *P.*

kurtmuelleri ima 11% a *P. shqipericus* i *P. lessonae* po 3%. Slični odnosi u brojnosti čistih vrsta su utvrđeni i u zadnjim istraživanjima na tom području (Koska 2016). Najveću brojnost hibrida imaju jedinke RS genotipa (11%), dok su drugi manje zastupljeni, KL sa 6% i KS, KL i RL sa 3%. Pojava velikog broj RS hibrida je neočekivana iz dva razloga. Prva je činjenica da je RL hibridogenetski kompleks koji stvara plodno potomstvo, ustanovljen u manjem broju nego RS, što je zamijećeno i u prijašnjem radu (Koska 2016). U ovom istraživanju utvrđeno je iznenađujuće malo RL jedinki (3%) u odnosu na čak 11% RS jedinki. RS ne stvaraju hibridogenetski kompleks (za razliku od RL) pa se postavlja pitanje zašto je utvrđeno više RS jedinki. Osim toga druga najčešća vrsta nije SS, nego KK i stoga je realno očekivati RK hibride u većini. Treba također naglasiti da su hibridi RS po prvi puta utvrđeni u prirodnim populacijama na Crnoj Mlaci upravo u prijašnjem istraživanju Koske (2016), kao i ovim istraživanjem. Hotz i sur. (1985) su ih prije utvrdili samo u eksperimentalnim istraživanjima. Visok udio RS hibrida otvara pitanje radi li se o novom hibridogenetskom kompleksu. Jedna od mogućnosti je da se doista radi o hibridogenetskom kompleksu budući da ova vrsta hibrida prevladava, dok je druga mogućnost da je *P. shqipericus* invazivna te da je njena prisutnost poremetila ravnotežu svih drugih vrsta i hibrida na lokalitetu. Mužjaci *P. shqipericus* vjerojatno biraju veće ženke *P. ridibundus* zbog veće plodnosti. RS hibridi su prema našim podacima veći od ostalih taksona (Slika 25), što im daje ekološku prednost u preživljavanju. Poznato je da druge vrste roda *Pelophylax* mogu remetiti reproduktivnu ravnotežu unutar vrsta *P. kl. esculentus* sustava gdje se reproduktivni potencijal troši na neplodne vrste (Holsbeek i Jooris 2010). RK je najčešći hibrid ustanovljen kod Koske (2016.), dok je u ovom istraživanju ustanovljen samo jedan primjerak (3%), što je i jedino neslaganje između brojnosti jedinki ova dva istraživanja po brojnosti vrsta. KS i KL imaju malu brojnost (3%). kao i u prošlim radovima (Koska 2016). Koska (2016) je utvrdila prisutnost mtDNA *P. kurtmuelleri* i *P. ridibundus*, dok je u ovom istraživanju utvrđena i prisutnost mtDNA *P. lessonae* (Slika 21). MtDNA *P. lessonae* prisutna je u svim LL, LR i LK, dok je u najvećoj mjeri kao introgresija u RR jedinkama. RR jedinke u Crnoj Mlaci imaju raznoliku mtDNA, koja može biti *P. lessonae* (58%), *P. kurtmuelleri* (31%) ili *P. ridibundus* (11 %). Pretpostavka je da u ovom kompleksom staništu RR jedinke koje nemaju RR mtDNA imaju veće prilagodbe, pošto ih je više koje imaju mtDNA *P. lessonae* ili *P. kurtmuelleri*. Činjenica potvrđuje da jedinke s introgresijom imaju veće prilagodbe od ne-introgresiranih jedinki (Plötner 2008). Hibridi RS podjednako sadrže mtDNA *P. ridibundus* i *P. kurtmuelleri*. Iako je hibrid RS genotipa, vidljiv je veliki utjecaj KK jedinki na njih budući da i SS jedinka sadrži mtDNA *P. kurtmuelleri*, a učestalo se razmnožavaju pošto su RS najčešći hibridi. Polovica KK jedinki ima mtDNA *P. kurtmuelleri*, dok druga polovica ima mtDNA *P. ridibundus*. Jedina KS jedinka posjeduje mtDNA *P. kurtmuelleri*, dok jedina RK jedinka posjeduje mtDNA *P. ridibundus*.

Rezultati pokazuju da je introgresija i hibridizacija u žabama roda *Pelophylax* u Hrvatskoj vrlo česta. Čiste jedinke čine 36.24% uzorka, dok jedinke s više genoma čine 69,13%. Prisutnost 8

različitih primjera introgresije dokazuje slabe reproduktivne barijere između vrsta: s 2 vrste: RRI, RRk, KKr, KKI, SSk; ali i s 3 vrste: KRI, KSr i RSk (Slika 20).

Južne populacije pokazuju relativno veliku homogenost KK vrste, dok je na sjeveru uočena velika razina introgresije i hibridizacije. Crna Mlaka pokazuje najveću razinu miješanja žabljih populacija. Pojava KK i SS vrsta uzrokuje poremećaj u populaciji gdje su dominirale RR i LL vrste. Introgresija je zastupljena u gotovo pola populacije (45% jedinki). Takva visoka razina introgresije pokazuje da je ona uznapredovala i postavlja se pitanje kako će dalje utjecati na brojnost pojedinih vrsta i hibrida. Minimalan broj jedinki vrste u populaciji se mora održati da bi vrsta preživjela jer mora sadržavati dovoljan broj genetičkih varijanti da se može s vremenom prilagoditi (Jamieson i Allendorf 2012), no u Crnoj Mlaci je već uočen nesrazmjer domaćih i stranih vrstama. Hibridizacije među domaćim i stranim vrstama mogu pokrenuti biološku invaziju koja za posljedicu može imati pad brojnosti ili izumiranje domaćih vrsta (Hall i Ayres 2009).

5.2. Morfološka raznolikost vrsta i hibrida roda *Pelophylax* u Hrvatskoj

Uobičajeno je određivanje vrsta žaba pomoću morfoloških karakteristika koje su navedene u ključevima (Arnold i Ovenden 2004, Speibroeck 2016). Najčešći kriteriji su duljina noge, boja rezonatora, oblik metatarzalne kvržice i obojenja na tijelu.

Rezultati istraživanja vanjskih karakteristika prikazuju žabe kao varijabilnu skupinu gdje se njihove karakteristike između taksona preklapaju. Sivi i tamno sivi rezonatori su najviše zastupljeni u KR i KK jedinkama, dok i jedna druga vrsta imaju manji broj primjeraka s bijelim. Također se u RR jedinkama javlja ista pojava bijelih rezonatora, ali u velikom broju, što je suprotno literaturnim nalazima. Pojava se, prema rezultatima ovog istraživanja, može pripisati posjedovanju mtDNA različitih vrsta unutar RR jedinki. Sve RRI jedinke posjeduju bijele rezonatore, dok sve RRr i RRk imaju tamne. Ista pojava bijelih rezonatora se pripisuje KRI i KKI jedinkama. RSk i RSr jedinke imaju sive rezonatore dok sve LL, RL, KL jedinke imaju bijele rezonatore (svi imaju mtDNA *P. lessonae*). Krizmanić (2008) je također ustvrdio da se bijelo obojenje javlja u *P. lessonae*, ali da ima manji broj jedinki *P. lessonae* s tamnim rezonatorima, što u ovom istraživanju nije utvrđeno. Krizmanić (2008) je ustanovio da RR jedinke većinom imaju tamno sive rezonatore dok u ovom istraživanju postoje i jedinke sa svijetlim, što otvara mogućnost da je u ovom istraživanju više RRI jedinki, dok je Krizmanić (2008) ustanovio više RRr jedinki. Sve RL jedinke u ovom istraživanju imaju bijele rezonatore, što se ponovno pripisuje mtDNA *P. lessonae* u njima (Tablice 1, 2; slika 23).

RR se pojavljuju sa i bez žutog obojenja na bokovima i nogama. Većina RR jedinki (29) u ovom istraživanju ima žuto obojenje na bokovima i nogama što je prema dostupnoj literaturi suprotno očekivanjima. Uspoređivanjem njihove mtDNA s obojenjima nogu i bedara, pokazuje se odvajanje

žaba po mtDNA. Žabe s mtDNA *P. lessonae* pokazuju veću tendenciju prema žutim obojenjima, dok one s RR ili KK pokazuju suprotnu tj. bez žutog obojenja (Slika 23). Većina nalaza RR, ali KK i KR jedinki (sa mtDNA *P. lessonae*) ima žutu boju na bokovima i nogama, dok su KK i KR s RR ili KK mtDNA bez žutog obojenja. Sve jedinke LL i RL imaju mtDNA *P. lessonae* te imaju žuto obojenje na bokovima i nogama. Jedan primjerak SS je obojen zeleno s tragovima žute na bokovima i nogama. RS i KS jedinke su obojene zeleno ili u manjem broju slučajeva zeleno u tragovima. Vidljivo je da jedinke s mtDNA *P. lessonae* dobivaju žuto obojenje. Krizmanić (2008) uočava da pojava žutog obojenja na bokovima i nogama postoji samo u LL, dok RR i RL nemaju žuto obojenje, što se ne slaže s rezultatima iz ovog istraživanja. Nasuprot tome Karaica i suradnici (2016) uočavaju žuta obojenja na svim vrstama koje su proučavali (RR, LL i RL), što se slaže s našim rezultatima (Tablice 1, 2).

Svi promatrani taksoni imaju prisutne pruge na nogama, uz nekoliko primjeraka gdje su diferencirane u točke, osim u LL, RL, RS, gdje nema jedinke bez pruga na nogama. Jedna jedinka SS ima pruge na nogama. U svim taksonima je velikom većinom prisutna leđna pruga. Jedna jedinka KS ima leđnu prugu dok druga nema, SS jedinka nema leđnu prugu. Karakteristika leđne pruge je varijabilna i ne pokazuje mogućnost za bolju determinaciju žaba (Tablice 1, 2). Krizmanić (2008) također uočava prisutnost leđne pruge u svim vrstama iz njegovog istraživanja.

Kod obojenja trbuha je zamijećena pojava suprotna od očekivane. Vrste KK, RR i KR imaju sva tri tipa trbušnog obojenja. RR jedinke su većinom umjereno točkaste po dorzalnoj strani, dok su podjednako bijelo obojane i jako točkaste. KK i RK imaju većinom bijelo obojene trbuhe, dok su manjim dijelom slabo obojani ili izrazito točkasti. Druga neočekivana pojava je nepresutnost bijelih obojenja kod LL, dok RL isto tako nema bijeli trbuh. Nasuprot tome, sve jedinke LK imaju bijeli trbuh. Svi RS imaju potpuno točkaste trbuhe. KS imaju bijele ili slabo točkaste trbuhe. Karaica i suradnici (2016) su ustanovili pojavu LL i s bijelim i točkastim trbuhom, gdje se prisutnost obojenih trbuha slaže s ovim istraživanjem, ali pojava bijelih trbuha ne. Pretpostavlja se da nije zamijećena pojavnost bijelog trbuha jer je uzorak LL jedinki mali (5) te se u prirodi ipak nalaze. Sve RR jedinke su u istraživanju Karaice i suradnika (2016) bile točkaste, dok su u ovom istraživanju nađeni i bijeli trbusi. Krizmanić (2008) je utvrdio sve varijacije obojenja na trbuhu kod RR i RL, što se uočava i kod nas, međutim kod LL nalazi većinom bijeli trbuh, što nije utvrđeno u ovom istraživanju (Tablice 1, 2).

Svi taksoni koji imaju LL i LK imaju simetričnu i veliku metatarzalnu kvržicu, što je karakteristika za LL. RL ima također simetričnu i veliku metatarzalnu kvržicu, uz jedan primjerak koji ima asimetričnu. Svi ostali taksoni imaju asimetrične, a manjim dijelom niske i ravne kvržice (Tablice 1, 2). Svim asimetričnim kvržicama je veći kraj bio usmjeren prema prstima. Ista zapažanja su ustanovili i Karaica i suradnici (2016) i Krizmanić (2008).

KR i RR mogu imati eliptične, ali i oštre njuške jednake učestalosti, dok KK također ima oba tipa, ali je oštra njuška zapažena u većini jedinki. Sve jedinke LL imaju oštru njušku, što se podudara s

literaturnim podacima (Arnold i Ovenden 2004), dok sve RL imaju eliptičnu njušku. Kod LK i RS su uočene eliptične i oštre njuške, dok SS ima eliptičnu njušku. Svi taksoni većinom imaju hrapavu kožu i smeđu bubnu opnu, uz iznimku da LL ima u većini slučajeva glatku kožu (Tablice 1 i 2).

KR i KK imaju noge koje se pružaju do njuške ili preko, a u manjem broju slučajeva se noga pruža do oka. LL uvijek ima kratke noge dok se RL i KL jedinkama pruža do oka ili između oka i njuške. KS i RS jedinkama je zamijećeno samo duljina noge do između oka i njuške, dok SS jedinka ima nogu koja seže do njuške. Unutar RR jedinki se ponovno javlja odstupanje po mtDNA. RRI u prosjeku imaju kraće noge u odnosu na RRr ili RRk (Slika 24). Hibridi pokazuju intermedijarna svojstva između roditeljskih jedinki (Tablice 1 i 2).

Determinacija vrsta samo preko morfoloških osobina ne daje dovoljno precizan rezultat zbog prevelikih varijacija karakteristika unutar pojedine vrste, ali i zbog preklapanja istih karakteristika među vrstama. Ne postoje osobine koje bi bile svojstvene samo za jednu vrstu. Moguće je samo isključiti neke genotipove zbog karakteristika koje se u njima ne pojavljuju ili svesti determinaciju na nekoliko opcija, kao što je primjer simetrične metatarzalne kvržice koje samo imaju žabe LL, LK i RL. Pregib noge također ukazuje na taksone KK, RR i RS s duljim nogama, dok kraće noge ima LL. RRI pokazuje odstupanja od tog pravila u odnosu na RRr i RRk. Prisutnost strane DNA u njemu potiče osobine sličnije LL (Slika 24, Tablice 1 i 2).

Svi omjerni dokazani kao značajni iz Kruskal – Wallis analize sadrže barem jedan od omjera SVL i LMtT (Tablica 4). Sama duljina tijela ne može biti faktor po kojem se određuje vrsta roda *Pelophylax*, jer sve vrste variraju po veličini. Dužina tijela se tako mora postaviti u omjer s drugim vrijednostima. Isto tako se veličina metatarzalne kvržice mora usporediti s drugim mjerama da bi se postavili značajni omjeri.

Uspoređujući dužinu tijela (SVL) sa širinom glave (HW) dobiva se omjer u kojem najveće minimalne vrijednosti imaju žabe sa L genomom (RL, LK i LL) (Slika 31). Ostali taksoni imaju niže vrijednosti. Uža glava, a dulje tijelo bi LL genomima dalo oštrije njuške u odnosu na druge taksone, što navode Arnold i Ovenden (2004) i Krizmanić (2008). Ostali taksoni imaju širok raspon ove vrijednosti tako da ih možemo naći s manje ili više oštrijim njuškama, što je također ustanovio Krizmanić (2008) uspoređujući RR, LL i RL vrste.

LL genomi se odvajaju i u odnosima SVL/Til i SVL/LFT (slike 32, 33). Visok SVL/Til indeks pokazuje da jedinke LL imaju dulja tijela u odnosu na goljenične kosti. Stoga žabe s LL genomom većinom imaju kraće noge u odnosu na tijelo uspoređujući ih s ostalim žabama. Takav morfometrijski indeks se podudara s podacima analize vanjske morfologije iz ovog istraživanja, gdje LL žabama noga većinom seže do očiju, dok je kod žaba s RR, KK, SS kombinacija, koji imaju SVL/Til indeks niži,

noga seže većinom do njuške ili preko nje, što je također ustvrdio Krizmanić (2008) za RR, LL i RL vrste i potvrđeno je literaturnim nalazima (Speibroeck 2016).

SVL/LFT (Slika 33) indeks pokazuje da žabe s LL genomom uz kraće noge imaju i kraće prste u odnosu na tjelesnu dužinu, dok žabe sa KK i/ili RR genomom imaju duže noge i duže prste. Zanimljivo je što vrste KK i RR pokazuju veliko preklapanje u ovim vrijednostima, međutim KS i RS pokazuju potpuno razdvajanje, iako obje sadrže SS genom i KK i RR genome koji su srodni. Omjer u literaturi nije naveden kao značajan.

Unutar vrijednosti SVL/LMtT, HW/LMtT, Til/LMtT, LFT/LMtT, LFT/LnPOE (Slike 34, 35, 36, 37, 38) pokazuje se odvajanje taksona. KK genomi (bez KL) i RS pokazuju različite vrijednosti u odnosu na LL genome. Na razliku ukazuju njihove male metatarzalne kvržice u odnosu na ostale veličine na tijelu. LL genomi imaju velike kvržice u odnosu na ostale veličine na tijelu kao što su duljina tijela, širina glave, duljine goljenične kosti, duljina prvog prsta i duljina od nosnice do kraja oka. RR posjeduje veliki raspon u svim omjerima, ali po aritmetičkoj sredini je blizak LL genomima, što po literaturnim podacima ne bi trebalo biti, budući da RR ima malu metatarzalnu kvržicu. Ta činjenica bi se iznova mogla dokazati introgresijom gdje RRI posjeduju karakteristike slične LL u odnosu na RRr i RRk. RRI jedinke posjeduju manje goljenične kosti i veće metatarzalne kvržice u odnosu su na RRr i RRk jedinke (Slika 43).

Iako unutar taksona postoje varijacije za sve vrijednosti, prosječne vrijednosti ukazuju na odvajanje taksona po morfološkim karakteristikama (Slike 39, 40, 41, 42). Prikazano je u kojoj mjeri i na koji način se taksoni odvajaju po omjerima Til/LMtT, LFT/LMtT, SVL/Til i SVL/LMtT. Svaki graf čine dva omjera unutar kojeg se ukupno nalaze tri karakteristike. Grafičkim prikazom raspodjele omjera možemo uočiti razlike u karakteristikama žaba po taksonima koji se tiču njihove veličine, veličine noge i prsta te metatarzalne kvržice. Raspodjela taksona u grafovima pokazuje gotovo linearan raspored i vidljivo je odvajanje taksona po „skupinama“. LL je svakom slučaju krajnje odvojeni takson nakon kojeg u svakom grafu slijede LK i LR. Ti taksoni imaju manje vrijednosti omjera, što ukazuje na kraće noge i tijela u odnosu na veće metatarzalne kvržice. RL posjeduje slične vrijednosti omjera na svakom grafu s RR jedinkama. Sličnost RL hibrida prema morfološkim karakteristikama jednoj roditeljskoj vrsti je i već prije zapažena (Karaica i sur. 2016, Krizmanić 2008) te se i ovdje potvrdila. RR jedinke su zahvaćene s velikim postotkom introgresije što objašnjava slična svojstva s RL hibridima s kojima dijele mtDNA *P. lessonae*, ali objašnjava i veću razliku s RK jedinkama koje imaju mtDNA *P. ridibundus* i *P. kurtmuelleri*. KR hibridi se na svakom grafičkom prikazu uvijek nalaze između KK i RR vrsta. Vizualno možemo uočiti njihovo jasno odvajanje po morfološkim osobinama, a njihov hibrid kao inermedijarni tip. Prema morfološkim karakteristikama su bliskiji roditeljskoj vrsti RR, osim u slučaju uspoređivanja omjera Til/LMtT i LFT/LMtT gdje se

nalaze jednako udaljene između roditeljskih vrsta. S najvećim vrijednostima se uvijek nalaze SS hibridi KS i RS, što ih odvaja kao najveće jedinke s najmanjim metatarzalnim kvržicama.

Uspoređivanje različitih mjera pokazuje mogućnost odvajanja žaba po njihovim karakteristikama, ali potrebno je analizirati veći broj jedinki kako bi se potvrdile uočene pravilnosti. Žabe sa LL genomima (nuklearna i mitohondrijska) pokazuju tendenciju da budu manje veličine, a da posjeduju veće metatarzalne kvržice. KK i RR žabe su većih tijela te imaju manje metatarzalne kvržice. KS i RS hibridi su se pokazali kao najveće jedinke s najmanjim metatarzalnim kvržicama. S jedinke prema literaturnim podacima imaju velike metatarzalne kvržice i manje su veličine (Speibroeck i sur. 2016), međutim čisti SS nije bio uvršten u analizu pa se stoga može pretpostaviti da je unutar genoma hibrida prevladao KK ili RR genom, stvarajući male metatarzalne kvržice u jedinkama.

6. Zaključak

Usporedbom nuklearne DNA i haplotipova roda *Pelophylax* u ovom istraživanju vidljiva je genetička raznolikost sjevernih i južnih populacija zelenih žaba u Hrvatskoj. U južnoj regiji (Lika i Dalmacija) nalazimo *P. ridibundus* i *P. kurtmuelleri* vrste s mtDNA *P. kurtmuelleri*. U Sjevernoj Hrvatskoj nalazimo vrste *P. ridibundus*, *P. lessonae*, *P. kurtmuelleri* i *P. shqipericus* s raznolikim tipovima hibrida i mtDNA (*P. ridibundus*, *P. lessonae* ili *P. kurtmuelleri*), što pridonosi velikoj heterogenosti sjevernih populacija roda *Pelophylax*.

Vrste *P. kurtmuelleri* i *P. shqipericus*, koje možemo smatrati alohtonima, utječu na autohtone populacije. *P. kurtmuelleri* je prisutna na svim lokalitetima i čini vrstu s najraširenijim arealom roda *Pelophylax* u Hrvatskoj. Genom vrste *P. shqipericus* je utvrđen na dvije lokacije (Zagreb i Crna Mlaka), što otvara pitanje kolika je prisutnosti te vrste u ostatku Hrvatske. Utvrđeno je da *P. shqipericus* stvara poremećaj u autohtonim populacijama unutar Crne Mlake, mijenjajući ravnotežu i brojnost drugih vrsta i hibrida.

Hibridne jedinice i jedinice sa introgresijom su u većini u odnosu na žabe čistog genoma. Ustanovljena je prisutnost 5 različitih hibrida: LR, LK, KR, RS i KS te 8 različitih introgresija: RRL, RRk, KKr, KKL, RSk, SSk, KRI i KSr. Ovakav rezultat upućuje na mogućnost da žabe s genetskim materijalom više vrsta posjeduju neke prilagodbe u odnosu na čiste vrste.

Filogenetička analiza fragmenata COI regije mitohondrijske DNA ukazuje na jasno odvajanje vrsta *P. ridibundus* i *P. kurtmuelleri*.

Karakteristike *P. lessonae* su žuta obojenja bokova i nogu, kraće noge te simetrična metatarzalna kvržica, dok *P. ridibundus* i *P. kurtmuelleri* nemaju žuto obojenje, imaju duže noge i asimetričnu metatarzalnu kvržicu.

Prema rezultatima morfometrijske analize vidljivo je razdvajanje svih taksa unutar roda *Pelophylax*. Uspoređivanje dvije ili tri mjere na tijelu žaba u određenim omjerima daje vrijednosti koje se razlikuju unutar roda. Homogeniji ili veći uzorak dao bi potpunije rezultate jer bi se mogle postaviti točnije granice odvajanja po morfometriji. Karakteristike *P. lessonae* su manja veličina tijela, goljenične kosti i prvog nožnog prsta te velika metatarzalna kvržica, dok *P. ridibundus* i *P. kurtmuelleri* imaju veće tijelo, goljeničnu kost i prvi nožni prst, a manju metatarzalnu kvržicu.

Hibridi pokazuju intermedijarna svojstva između roditeljskih vrsta. U vrsti *P. ridibundus* vidljiv je utjecaj introgresije *P. lessonae* mtDNA te stoga *P. ridibundus* morfološki i morfometrijski postaje sličnija *P. lessonae*.

7. Literatura

Allendorf F.W., Leary R.F., Spruell P., Wenburg J.K. (2001): The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology & Evolution* 16(11): 613-622.

Arnold N., Ovenden D. (2004): Reptiles and amphibians of Britain and Europe - Field Guide. Collins. 76–87.

Ascarrunz E., Rage J., Legreneur P., Laurin M. 2016: *Triadobatrachus massinoti*, the earliest known lissamphibian (Vertebrata: Tetrapoda) re-examined by μ CT scan, and the evolution of trunk length in batrachians. *Contributions to Zoology* 85: 201-243.

Bandelt H., Forster P., Röhl A. (1999): Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16(1): 37-48.

Baxevanis A. D., Oullette B. F. F. 2001. *Bioinformatics: a practical guide to the analysis of genes and proteins*. Second edition. Wiley-Interscience.

Bellati A., Razzetti E., Resteghini M., Sacchi R., Pellitteri-Rosa D., Casiraghi M., Bernini F., Galeotti P., Fasola M. (2011): First molecular characterization of invasive alien populations of *Pelophylax kurtmuelleri* (Gayda, 1940) and new records from Italy. *Conversano*, 26-30.

Bermingham E., Moritz C. 1998. Comparative phylogeography. *Molecular Ecology* 7: 367-369.

Berger L. (1970): Some characteristics of the crosses within *Rana esculenta* complex in postlarval development. *Annales Zoologici* 27: 373-416.

Bromham L. (2009): Why do species vary in their rate of molecular evolution. *Biology Letters* 5: 401–404.

Buckley L.B., Jetz W. (2007): Environmental and historical constraints on global patterns of amphibian richness. *Proc. R. Soc. B.* 274: 1167–1173.

Casquet, J., Thebaud, C., & Gillespie, R. G. (2012): Chelex without boiling, a rapid and easy technique to obtain stable amplifiable DNA from small amounts of ethanol-stored spiders. *Molecular Ecology Resources*, 12(1): 136-141.

Che, J., Chen, H. M., Yang, J. X., Jin, J. Q., Jiang, K., Yuan, Z. Y., Murphy, R. W. & Zhang, Y. P. (2012): Universal COI primers for DNA barcoding amphibians. *Molecular Ecology Resources*, 12(2): 247-258.

Christiansen D., Fog K., Pedersen B.V., Boomsma J.J. (2005): Reproduction and hybrid load in all-hybrid populations of *Rana esculenta* water frogs in Denmark. *Evolution* 59: 1348-1361.

Christiansen D.G. (2009): Gamete types, sex determination and stable equilibria of all-hybrid populations of diploid and triploid edible frogs (*Pelophylax esculentus*). *BMC Evolutionary Biology* 9:doi:10.1186/1471-2148-9-135.

Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. (2012) JModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8): 772.

Domeneghetti D., Bruni G., Fasola M., Bellati A. (2013): Discovery of alien water frogs (gen. *Pelophylax*) in Umbria, with first report of *P. shqipericus* for Italy. *Acta Herpetologica* 8(2): 171-176.

Drummond A.J., Rambaut A. (2007): BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7: 214.

Dubey S., Leuenberger J., Perrin N. (2014): Multiple origins of invasive and “native“ water frogs (*Pelophylax* spp.) in Switzerland. *Biological Journal of the Linnean Society* 112(3): 442-449.

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. str.126

Emerson B. C., Hewitt G. M. (2005): Phylogeography. *Current Biology* 15: 367-371.

Evans S. E., Borsuk-Białynicka M. (1998): A stem-group frog from the Early Triassic of Poland. *Acta Palaeontologica Polonica* 43: 573-580.

Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. (1994): DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3(5): 294-299.

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.

Guex G., Hotz H., Semlitsch R.D. (2002): Deleterious alleles and differential viability in progeny of natural hemiclinal frogs. *Evolution* 56(5): 1036-1044.

Gibbons J.W., Winne C.T., Scott D.E., Willson J.D., Gladus X., Andrews K.M., Todd B.D., Fedewa L.A., Wilkinson L., Tsaliagos R.N., Harper S.J., Greene J.I., Tuberville T.D., Metts B.S.,

Dorcas M.E., Nestor J.P., Young C.A., Akre T., Reed R.N., Buhlmann K.A., Norman J., Croshaw D.A., Hagen C., Rothhermel B.B. (2006): Remarkable Amphibian biomass and abundance in an isolated wetland: Implication for wetland conservation. *Conservation Biology* Volume 20, No. 5: 1457–1465.

Graf J. D., Polls Pelaz M. (1989): Evolutionary genetics of *Rana esculenta* complex. In: Dawley R.M., Bogart J.P. (eds) *Evolution and ecology of unisexual vertebrates*. The New York State Museum Bulletin, Albany, str. 298–302.

Griffiths H.I., Kryštufek B., Reed J.M. (2004): *Balkan Biodiversity: Džukić G. i Kalezić M. L. The Biodiversity of Amphibians and Reptiles in the Balkan Peninsula*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 167-192.

Hall B. G. (2007): *Phylogenetic Trees Made Easy: A How-To Manual, Third Edition*. Sinauer Associates Inc, Sunderland, str.173.

Hauswaldt J.S., Höer M., Ogielska M., Christiansen D.G., Dziewulska-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.

Hillman S.S., Withers P.C., Drewes R.C., Hallyard S.D. (2009): *Ecological and Environmental Physiology of Amphibians*. Oxford University Press, Oxford. str.482

Hofman S., Pabijan M., Osikowski A., Litvinchuk S.N., Szymura J.M. (2015): Phylogenetic relationships among four new complete mitogenome sequences of *Pelophylax* (Amphibia: Anura) from the Balkans and Cyprus. *Mitochondrial DNA part A* 27(5): 3434-3437.

Holman J.A. (1998): *Pleistocene amphibians and reptiles in Britain and Europe*. New York Oxford, Oxford University Press. str. 264

Holsbeek G., Jooris R. (2010): Potential impact of genome exclusion by alien species in the hybridogenetic water frogs (*Pelophylax esculentus* complex). *Biological Invasions* 12: 1-13.

Houlahan J. E., Findlay C. S., Schmidt B. R., Meyer A.H., Kuzmin S. (2000): Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature* 404: 752-755.

Hwang U. W., Kim W. (1999): General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *The Korean journal of parasitology* 37: 215-228.

Iritsari I., San Mauro D., Abascal F., Ohler A., Vences M., Zardoya R. (2012): The origin of modern frogs (Neobatrachia) was accompanied by acceleration in mitochondrial and nuclear substitution rates. *BMC Genomics* 13: 1-19.

Jablonski D. (2011): Reptiles and amphibians of Albania with new records and notes on occurrence and distribution. *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae*. 75: 223–238.

Jamieson I.G., Allendorf F.W. (2012): How does the 50/500 rule apply to MVPs? *Trends in Ecology & Evolution*. 27: 578–584.

Karaica D., Buj I., Čavlović K., & Stanković V.M. (2016): Comparative morphology and ecology of the *Pelophylax esculentus* complex in Croatia. *Salamandra* 52: 161-170.

Katoh S. (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30: 772-780.

Koska S. (2016): Genska raznolikost i stupanj hibridizacije zelenih žaba roda *Pelophylax* Fitzinger, 1843 (Anura: Ranidae) s područja Crne Mlake. Diplomski rad. Zagreb. 51. Str.

Korlević P. (2012): Molekularno-filogenetski odnosi unutar roda *Rana* (Amphibia, Ranidae) na osnovi metoda RFLP i analize sekvenci za 16S, cytb i ITS2. Diplomski rad. Zagreb. 71. Str.

Krizmanić I.I. (2008): Water frogs (*Rana esculenta* complex) in Serbia – morphological data. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 60 (3): 449-457.

Leigh J.W., Bryant D. (2015) PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution* 6(9): 1110-1116.

Leuenberger J., Gander A., Schmidt B.R., Perrin N. (2014): Are invasive marsh frogs (*Pelophylax ridibundus*) replacing the native *P. lessonae/P. esculentus* hybridogenetic complex in Western Europe? Genetic evidence from a field study. *Conservation Genetics*. 15(4): 869-878.

Lymberakis P., Poulakakis., Manthou G., Tsigenopoulos C.S., Magoulas A., Mylonas M. (2007): Mitochondrial phylogeography of *Rana* (*Pelophylax*) population in the Eastern Mediterranean region. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 44: 155-125.

Hall R.J., Ayres D.R. (2009): What can mathematical modeling tell us about hybrid invasions? *Biological Invasions*. 11: 1217–1224.

Hammer J.A., McDonnell M.J. (2008): Amphibian ecology and conservation in the urbanising world: A review. *Biological Conservation* 141: 2432-2449.

Mayer M., Hawlitschek O., Zahn A., Glaw F. (2013): Composition of twenty Green Frog populations (*Pelophylax*) across Bavaria, Germany. *Salamandra* 49(1): 31-44.

Mayer A., Zardoya R. (2003): Recent advances in the (molecular) phylogeny of vertebrates. *Annual review of ecology and systematics* 34: 311-338.

Miller M.A., Pfeiffer W., Schwartz T. (2010): Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*. New Orleans, LA. str. 1-8.

Moritz C., Faith D. P. 1998. Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. *Molecular Ecology* 7: 419-429.

Nei M., Kumar S. (2000): *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.

Nylander J.A.A., Wilgenbusch J.C., Warren D.L., Swofford D.L. (2008): AWTY (are we there yet?): a system for graphical exploration of MCMC convergence in Bayesian phylogenetics. *Bioinformatics* 24(4): 581-583.

Nowakowski J.J., Górski A., Lewandowski K. (2010): Amphibian communities in small water bodies in the city of Olsztyn. *Fragmenta Faunistica* 53(2): 213-231.

Piveteau J. (1936): Origine et évolution morphologique des amphibiens anoures. *Comptes rendus de l'Académie de Sciences* 103: 1084-1086.

Plötner J. (2005): *Die westpaläarktischen Wasserfrösche*. Laurenti-Verlag, Bielefeld. str.160.

Plötner J., Uzzell T., Beerli P., Spolsky C., Ohst T., Litvinchuk S.N., Guex G.D., Reyer H.U., Hotz H. (2008): Widespread unidirectional transfer of mitochondrial DNA: a case in western Palearctic water frogs. *Journal of Evolutionary Biology* 21(3): 668-681.

Plötner J., Uzzell T., Beerli P., Akin C., Bilgin C. C., Haefeli C., Ohst T., Köhler F., Schreiber R., Guex G., Litvinchuk S.N., Westaway R., Reyer H., Pruvost N., Hotz H. (2010): Genetic divergence and evolution of reproductive isolation in Eastern Mediterranean water frogs. U: Glaubrecht M., Schneider H. (ur): *Evolution in Action: Case studies in Adaptive Radiation, Speciation and the Origin of Biodiversity*. Springer, Heidelberg, Germany, str. 373-403.

Posada D., Crandall, K. A. 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology & Evolution* 16: 37-45.

Pough F.H., Andrews R.D., Cadle J.E., Crump M.L., Savitsky A.H., Wells K.D. (1998): Herpetology. Prentice-Hall, New Jersey. str. 612

Pough F.H., Janis C.M., Heiser B.J. (2009): Vertebrate life: Salamanders, Anurans and Caecilians. Pearson Benjamin Cummings, San Francisco. str. 220-265

Pyron R. A., Wiens J.J. (2011): A large-scale phylogeny of Amphibians including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders and caecilians. *Phylogenetics and Evolution* 61: 543-583.

Quilodrán C.S., Montoya-Burgos J.I., Currat M. (2014): Modelling interspecific hybridization with genome exclusion to identify conservation actions: the case of native and invasive *Pelophylax* waterfrogs. *Evolutionary Applications*. 8: 199-210.

Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P., Ayres D.L., Darling A., Höhna S., Larget B., Liu L., Suchard M.A., Huelsenbeck J.P. (2012): MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61(3): 539-542.

Ruchin A.B., Ryzhov M. (2002): On the Diet of the Marsh Frog (*Rana ridibunda*) in the Sura and Moksha Watershed, Mordovia. *Advances in Amphibian Research in the Former Soviet Union* 7: 197 – 205.

Rhymer J.M., Simberloff D. (1996): Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics* 27: 83–109.

San Mauro D., Vences M., Alcobendas M., Zardoya R., Mayer A. (2005): Initial diversification of living amphibians predated the Breakup of Pangea. *The American Naturalist* Vol. 165: 590-599.

Schneider H., Sinsch U., Sofianido T. S. (1993): The water frogs of Greece: Bioacoustic evidence for a new species. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 31: 1-80.

Schulman A.H., Flavell A.J., Ellis T.H.N. (2004): The application of LTR retrotransposons as molecular markers in plants. *Methods Mol. Biol.* 260: 145-173.

Schultz R. J. (1969): Hybridization, unisexuality, and polyploidy in the teleost *Poeciliopsis* (Poeciliidae) and other vertebrates. *The American Naturalist* 103(934): 605-619.

Simon E., Puky M., Braun M., Tóthmérész B. (2011): Frogs and toads as biological indicators in environmental assessment. *Frogs: Biology, Ecology and Uses* 7: 141-150.

Som C., Reyer H.U. (2006): Hemiclonal reproduction slows down the speed of Muller's ratchet in hybridogenetic frog *Rana esculenta*. *Journal of Evolutionary Biology* 20: 650-660.

Sparling D. W., Linder G., Bishop C. A., Krest S. (2000): Ecotoxicology of amphibians and reptiles, second edition. CRC Press, Taylor & Francis Group.

Speisbroek J., Beukema W., Bok B., Van der Voort J. (2016): Field guide to the amphibians and reptiles of Britain and Europe. Bloomsbury Publishing lpc. Bloomsbury. str.432

Spolsky C., Uzzell T. (1984): Natural interspecies transfer of mitochondrial DNA in amphibians. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81: 5802-5805.

Stuart B.L. (2008): The phylogenetic problem of *Huia* (Amphibia: Ranidae). Molecular phylogenetics and evolution 46: 49-60.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipowski A., Kumar S. (2013): MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30: 2725-2729.

Tzgaloff A., Myers A. M. (1986): Genetics of mitochondrial biogenesis. The Annual Review of Biochemistry 55: 249-285.

Unrine J. M., Hopkins W. A., Romanek C. S., Jackson B. P. (2007): Bioaccumulation of trace elements in omnivorous amphibian larvae: Implications for amphibian health and contaminant transport. Environmental Pollution 149: 182-192.

Uzzell T., Günther R., Berger L. (1977): *Rana ridibunda* and *Rana esculenta*: a leaky hybridogenetic system (Amphibia Salienta). Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia 128: 147-171.

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.

Vandamme A. (2009): Basic concepts of molecular evolution. U: Lemey P., Salemi M., Vandamme A. (ur): The Phylogenetic Handbook. Cambridge, Cambridge University Press, str. 3-31.

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

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

Wiens J. J., Sukumaran J., Pyron R. A., Brown R. M. (2009): Evolutionary Biogeographic origins of high tropical diversity in old world frogs (Ranidae). Evolution 63(5): 1217-1231.

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

Zuckerandl E., Pauling L. (1965): Molecules as Documents of Evolutionary History. *Journal of Theoretical Biology* 8: 357-366.

8. Životopis

OSOBNJE INFORMACIJE **Schmidt Bruno**

Spol Muško | Datum rođenja 04/10/1992 |

Državljanstvo hrvatsko

RADNO ISKUSTVO

01/12/2014–18/06/2015 **Pomoćnik u nastavi**
Osnovna škola Marije Jurić Zagorke, Zagreb (Hrvatska)
Rad s djetetom s teškoćama tokom školskog dana i pomaganje tokom nastave i školskog odmora.

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

01/09/2007–31/08/2011 **Državna matura** razina 4 EKO-a
XV. gimnazija, Zagreb (Hrvatska) Prirodne znanosti.

01/09/2011–danas **Student 5. godine** razina 4 EKO-a
Prirodoslovno - matematički fakultet, smjer Znanosti o okolišu, Zagreb (Hrvatska)

OSOBNJE VJEŠTINE

Materinski jezik hrvatski

Ostali jezici	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
engleski	B2	B2	B2	B2	B2
Viša razina državne					
njemački	B2	B2	B2	B2	B2

Komunikacijske vještine Dobre komunikacijske vještine stečene na poslu asistenta u nastavi u radu s djecom s teškoćama. Dobre komunikacijske vještine u radu sa djecom nižih razreda osnovne škole stečene u radu u školi.

Projekti Sudionik u edukacijskoj radionici "Herpetoškolica" 2016. godine
Sudionik na manifestacijama "Noć Biologije"-2012,2013,2015,2016 godine Sudionik na Istraživačko - edukacijskom projektu "Insula tilagus 2017" Sudionik na Istraživačko - edukacijskom projektu "Mura-Drava 2016" Organizator Istraživačko – edukacijskog projekta „Papuk 2015“.
Sudionik na Istraživačko – edukacijskom projektu „Grabovača 2014.“
Projekt integracije Eu Natura2000 (NIP za herpetofaunu), 2015. - sudjelovao na istraživanjima vodozemaca i gmazova u Lici.

Istraživanje i vrednovanje žute poljarice (*Dolichophis caspius*) na području Osječko –
baranjske županije .

