

# Genska struktura i raznolikost paklara (Petromyzontidae) dunavskog slijeva Hrvatske

---

Pleše, Sara

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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:217:217185>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno - matematički fakultet  
Biološki odsjek

Sara Pleše

**Genska struktura i raznolikost paklara  
(Petromyzontidae) dunavskog slijeva  
Hrvatske**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Sara Pleše

**Genetic structure and diversity of lampreys  
(Petromyzontidae) in the Danube River  
basin in Croatia**

Master thesis

Zagreb, 2021

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za zoologiju kralješnjaka na Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno - matematičkog odsjeka Sveučilišta u Zagrebu, pod voditeljstvom doc. dr. sc. Ivane Buj. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno - matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre struke znanosti o okolišu.

## ZAHVALA

---

Veliko hvala mojoj divnoj mentorici doc. dr. sc Ivani Buj na ukazanoj prilici, na strpljivosti i na nesebičnom prenošenju znanja i cjelokupnoj pomoći pri izradi ovog diplomskog rada.

Hvala Luciji, Luciji i Svenu na svakom savjetu i na podršci cijelo ovo vrijeme.

Hvala mojim curama na konstantnom ohrabivanju i bodrenju.

V hvala na svemu, a posebno što si me trpio dok sam najgora.

Za moje uzore, mamu i seku, a posebno za moje bake koje bi se ovom veselile više od drugih.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno - matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

### **Genska struktura i raznolikost paklara (Petromyzontidae) dunavskog slijeva Hrvatske**

Sara Pleše

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Paklare (porodica Petromyzontidae) koje se i dalje prema mnogim publikacijama svrstavaju među ribe, zapravo su skupina kralješnjaka koja se prije 500 milijuna godina na temelju fundamentalne razlike, nepostojanja čeljusti, odvojila od riba i ostalih razreda kralješnjaka koji imaju razvijenu čeljust. Njihova taksonomija nije do kraja razriješena na globalnoj razini pa tako ni na području Hrvatske uz nedovoljno proučenu taksonomiju, rasprostranjenost i ugroženost. Cilj ovog istraživanja bio je: utvrditi srodstvene odnose proučavane porodice, odrediti točan taksonomski položaj vrsta unutar porodice, napraviti filogenetsku rekonstrukciju skupine na proučavanom području te procijeniti gensku raznolikost i strukturu pojedinih utvrđenih vrsta i linija s krajnjim ciljem zaštite ako je ona potrebna. Kako bih utvrdila taksonomski položaj prisutnih vrsta na području dunavskog slijeva Hrvatske, provela sam filogenetsku rekonstrukciju koja se temeljila na sekvencama gena za citokrom *b* pomoću metode najveće parsimonije, metode najveće vjerojatnosti i metode susjednog povezivanja. Dobivena filogenetska stabla i filogenetska mreža potvrdili su postojanje 4 odvojene linije unutar vrste *Eudontomyzon vladykovi* Oliva i Zanandrea, 1959 te prisutnost vrste *Eudontomyzon danfordi* Regan, 1911 na području Hrvatske. Pomoću testova genske raznolikosti i genske različitosti uz analize molekularne dijagnostike utvrdila sam umjerenu do visoku razinu genske raznolikosti unutar i između utvrđenih vrsta i linija te duboku strukturiranost unutar vrste *Eudontomyzon vladykovi*.

(49 stranica, 13 slika, 15 tablica, 39 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: paklare, taksonomija, filogenija, citokrom *b*, linije

Voditelj: doc. dr. sc. Ivana Buj

Ocjenitelji: doc. dr. sc. Ivana Buj, doc. dr. sc. Zoran Marčić, doc. dr. sc. Ivan Čanjevac, prof. dr. sc. Blanka Cvetko Tešović

Rad prihvaćen: 13.9.2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Division of Biology

Graduation Thesis

### **Genetic structure and diversity of lampreys (Petromyzontidae) in the Danube River basin in Croatia**

Sara Pleše

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Lampreys (family Petromyzontidae), which according to many publications are still classified as fish, are actually a group of Vertebrates. 500 million years ago they separated from fish and other classes of Vertebrates that have developed jaws based on the absence of a jaw. Their taxonomy has not been fully resolved on the global level, nor in Croatia, with an insufficiently studied taxonomy, distribution and endangerment. The aim of this study was to: determine the relationships of the studied family, determine the exact taxonomic positions of species within the family, make a phylogenetic reconstruction of the group in the study area and estimate the genetic diversity and structure of individual identified species and lineages. In order to determine the taxonomic position of the species present in the Danube basin of Croatia, phylogenetic reconstruction was performed based on cytochrome *b* gene sequences using the maximum parsimony method, maximum likelihood method and the median joining method. The obtained phylogenetic trees and phylogenetic network confirmed the existence of 4 separate lineages within the species *Eudontomyzon vladkovi* Oliva i Zandrea, 1959 and the presence of the species *Eudontomyzon danfordi* Regan, 1911 in Croatia. Using tests of genetic diversity and genetic differentiation in addition to molecular diagnostic analyzes, moderate to high levels of genetic diversity within and between identified species and lineages and deep structuring within the species *Eudontomyzon vladkovi* were determined.

(49 pages, 13 figures, 15 tables, 39 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: lampreys, taxonomy, phylogeny, cytochrom *b*, lineages

Supervisor: doc. dr. sc. Ivana Buj

Reviewers: doc. dr. sc. Ivana Buj, doc. dr. sc. Zoran Marčić, doc. dr. Ivan Čanjevac, prof. Dr. sc. Blanka Cvetko Tešović

Thesis accepted: 13.9.2021.

## SADRŽAJ

---

1. UVOD .....	1
1.1. Opće značajke porodice Petromyzontidae .....	1
1.2. Taksonomski položaj i odnosi paklara .....	8
1.3. Raznolikost paklara u Europi .....	11
1.3.1. Paklare u Hrvatskoj – prisutnost, ugroženost i zaštita .....	13
1.4. Uloga i primjena suvremenih metoda filogeografije i molekularne filogenije te genskih markera za potrebe filogenetske rekonstrukcije .....	16
1.5. Ciljevi istraživanja .....	17
2. PODRUČJE ISTRAŽIVANJA – dunavski slijev Republike Hrvatske .....	19
3. MATERIJALI I METODE .....	24
3.1. Popis korištenih kemikalija, opreme i računalnih programa .....	24
3.1.1. Terenska oprema za sakupljanje uzoraka .....	24
3.1.2. Laboratorijska oprema i kemikalije .....	24
3.1.3. Računalni programi .....	24
3.2. Sakupljanje uzoraka .....	25
3.3. Postupci u laboratoriju (izolacija DNA, umnažanje gena lančanom reakcijom polimeraze (PCR), sekvenciranje) .....	25
3.4. Filogenetska rekonstrukcija .....	27
3.5. Analize molekularne dijagnostike .....	30
3.6. Genska raznolikost i genska različitost .....	30
4. REZULTATI .....	31
4.1. Filogenetski položaj vrsta unutar porodice Petromyzontidae .....	31
4.2. Genska raznolikost i genska različitost utvrđenih vrsta i filogenetskih linija .....	36
4.3. Analize molekularne dijagnostike dobivenih linija paklara .....	37

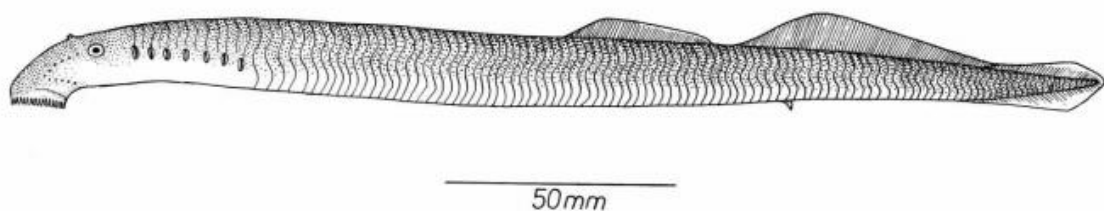


4.4. Intraspecijska struktura linija .....	39
4.5. Genska udaljenost između i unutar linija .....	39
5. RASPRAVA .....	41
6. ZAKLJUČCI .....	45
7. LITERATURA .....	46
8. ŽIVOTOPIS .....	50

## 1. UVOD

### 1.1. Opće značajke porodice Petromyzontidae

Iako se prema mnogim publikacijama paklare svrstavaju pod ribe (ribe se ne smatraju taksonomskom skupinom), među njima postoji fundamentalna razlika, a to je da kod paklara ne nalazimo čeljusti i parne peraje (Marsh – Matthews 2009). Razdvajanje čeljustousta (Gnathostomata) i besčeljusnjača (Agnatha) započelo je prije 500 milijuna godina, a ubrzo nakon tog razdvajanja (ne zna se točno kada), razdvajaju se linije paklara i sljepulja (Kuraku i Kuratani 2006). Sljepulje (Myxinidae) su primitivniji organizmi od paklara iako se radi o međusobno srodstveno najbližim skupinama (Norris i Carr 2013). Za razliku od paklara, sljepulje su isključivo morski organizmi koji ne toleriraju niske salinitete te se razvijaju bez ličinačkog stadija (Gorbman 1997). Još neke od značajki koje nalazimo kod sljepulja, a izostaju kod paklara su sposobnost proizvodnje sluzi, postojanje samo jedne neprekinute repne peraje, izostanak funkcionalnog oka i pinealnog organa, a broj škržnih otvora u sljepulja varira od jedan do petnaest. Sve navedene razlike između paklara i sljepulja ukazuju nam na njihovo odvojeno podrijetlo. Premda ne postoji direktna veza mnogi autori pretpostavljaju da su se moderne paklare razvile iz razreda Cephalaspidomorphi, a moderne sljepulje iz razreda Pteraspidomorphi, iako su to manje sigurni podaci (Young 1985, Pough i sur. 2013). Prema recentnoj taksonomiji, paklare svrstavamo u razred Petromyzonti (Ćaleta i sur. 2019).



**Slika 1.** Vanjski izgled paklare (dunavska paklara *Eudontomyzon danfordi* Regan, 1911; preuzeto iz Holčik 1986), preuzeto iz Crvene knjige slatkovodnih riba Hrvatske (Mrakovčić i sur. 2006)

Izduženog oblika tijela (**Slika 1**) i bez ljusaka paklare su organizmi koji su široko rasprostranjeni po cijelom svijetu, a posebno u vodama umjerenog pojasa. Ne naseljavaju tropska i polarna područja, a neke vrste paklara su anadromne što znači da migriraju iz mora u slatke vode za potrebe reprodukcije. Mogućnost prelaska iz morskog okoliša s višim

salinitetom u slatkovodni okoliš podržana je dobro razvijenim ekskrecijskim sustavom i osmoregulacijom koji reguliraju koncentraciju soli u krvi paklara (u moru je manja koncentracija soli u krvi u odnosu na okolnu vodu, a u slatkim vodama je obrnuta situacija). U tim reproduktivnim migracijama mogu prijeći i po tisuće kilometara te se radi o nokturalnim migracijama (Kottelat i Freyhof 2007). Kretanje se zasniva na sukcesivnim kontrakcijama mišića raspoređenih u miotome. Kreću se tj. plivaju anguiliformno (više od polovice tijela stvara sinusoidni val) i to prilično sporo. U plivanju im pomažu leđna peraja podijeljena na dva dijela (anteriornu i posteriornu leđnu peraju) te repna peraja (**Slika 1**). Odrasle jedinke paklara prosječno narastu do 30 cm, ali mogu narasti do 1 m. Takve veće jedinke obično nalazimo među vrstama koje dio svog života provode u morskom okolišu (Young 1985, Pough i sur. 2013).

Paklare imaju relativno kratak embrionalni razvoj nakon kojeg slijedi dugačak ličinački period koji može trajati i do preko 5 godina (3-7 godina), a to čini čak 60-80% njihovog cijelog života. U ličinačkoj fazi života jedinke paklara nazivaju se pokače (Ammocoetes), te se razlikuju od svojeg adultnog stadija (**Slika 2**). Odmah vidljive morfološke razlike su neprekinuti leđni nabor, jednostavne oči sakrivene ispod kože (slijepe su) i gornja usna polumjesečastog oblika bez rožnatih zubića u usnom lijevku.



**Slika 2.** Morfološke razlike između pokače (a) i odrasle paklare (b) (preuzeto iz Tutman i sur. 2020)

Imaju veći mozak u odnosu na odrasle jedinke te imaju žučni mjehur i žučovod. Nemaju dišnu cijev, već im se škržne vrećice otvaraju u šupljinu ždrijela, a na dnu ždrijela postoji trepetljikava brazda koja podsjeća na endostil. Mlade jedinke nakon desetak dana napuštaju gnijezdo te ih struje vode nose nizvodno. Običavaju u muljevitom dijelu toka i često se zakopavaju. Tijekom čitavog ličinačkog stadija paklare tj. pokače su sedentarni filtratori koji se hrane detritusom. Kada dostignu veličinu od 12 do 15 cm, ulaze u proces drastične metamorfoze koji naspram ličinačkog stadija traje puno kraće – 3 do 6 mjeseci te postaju mlade odrasle jedinke. Ponekad taj stadij može trajati i dulje, ali odrasle jedinke ne žive dulje od dvije godine. Proces metamorfoze događa se u periodu od završetka ljeta do početka zime. Informacija o životnom ciklusu neke vrste paklare jedna je od ključnih determinacijskih značajki, ali nije nužno najjednostavnija s obzirom na količinu vremena koja je potrebna za dobivanje te informacije (Kottelat i Freyhof 2007). Kod nekih vrsta u adultnom stadiju jedinke se više ne hrane; vrlo brzo dostižu spolnu zrelost, mriju se i ugibaju ubrzo nakon. U tom slučaju izostaje prelazak na parazitski način života u adultnom stadiju (Young 1985, Pough i sur. 2013). Ostale vrste su paraziti koji se hrane krvlju i mišićnim tkivom živog plijena (**Slika 3**), najčešće riba u rijekama, jezerima i morima, ali napadaju i kitove i dupine.

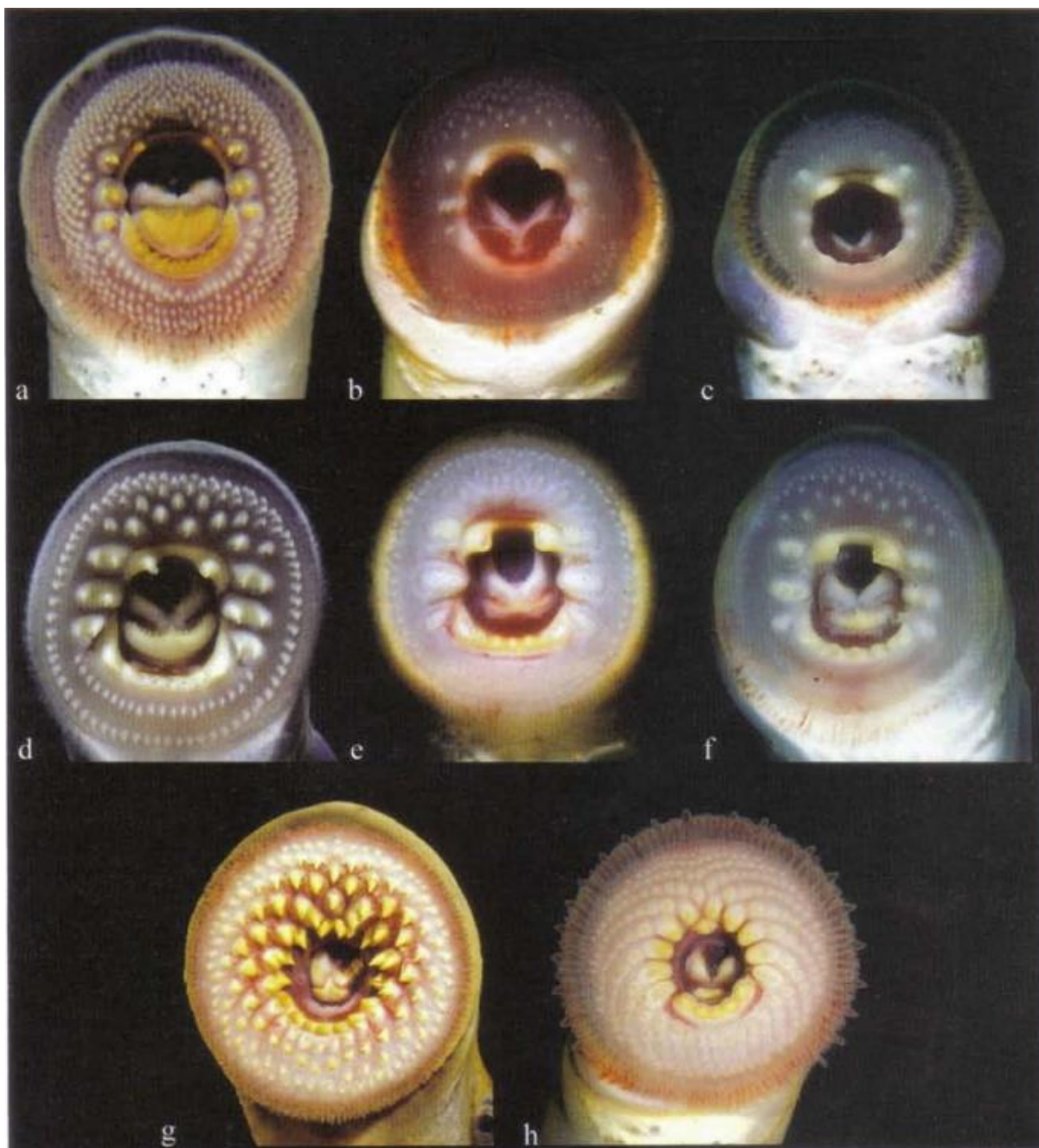


**Slika 3.** Parazitizam morskih paklara *Petromyzon marinus* Linnaeus, 1758 na vrsti *Salvelinus namaycush* (Walbaum, 1792) (preuzeto s: [https://en.wikipedia.org/wiki/Lamprey#/media/File:Sea\\_Lamprey\\_fish.jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/Lamprey#/media/File:Sea_Lamprey_fish.jpg), pristupljeno 21.5.2021.)

Takav način života može trajati nekoliko mjeseci do nekoliko godina (Pombal i Megias 2017). Kao prilagodba na ovakav tip prehrane, probavni sustav paklara je reduciran (krv i druge tjelesne tekućine su lako probavljive). Ribe kao domaćini u ovom obliku životne zajednice uglavnom preživljavaju parazitizam paklara, iako mlade, nedovoljno razvijene i/ili bolesne jedinke mogu uginuti. Razlozi ugibanja domadara su iscrpljenost i velike ulazne rane na mjestu gdje se paklara pričvrstila pomoću usnog lijevka. Unutar usnog lijevka, okruženog osjetnim pipalima, nalaze se obično kružno poredani rožnati zubići. Iako ih nazivamo zubićima zapravo nisu usporedivi s pravim zubima ostalih kralješnjaka. Radi se o rožnatim tvorevinama podloženim hrskavicom čiji su vrhovi građeni od keratina. Sami vrhovi omogućuju oštrinu zuba za vrijeme parazitske faze te se periodično mijenjaju (postaju tupi prije mrijesta). Broj i položaj rožnatih zubića su jedna od glavnih determinacijskih značajki (**Slika 4**) kod paklara (Kottelat i Freyhof 2007). Na dnu usnog lijevka nalazi se mali usni otvor. Nemaju razvijene čeljusti te su im usta stalno otvorena. Usni otvor vodi u usnu šupljinu u kojoj se djelomično nalazi jezik (on ispunjava i prednji dio ždrijela) koji nije istog porijekla kao jezik čeljustoustitih. Sam jezik vrlo je snažan upravo zato da bi se paklare mogle pričvrstiti za domadara, a na njegovom vrhu također nalazimo zubiće. Ostale značajke probavnog sustava paklara su ne postojanje pravog želuca (jednjak ulazi direktno u crijevo i tu se odvija glavnina probave), ali postojanje jetre, gušterače i spiralnog zaliska (*typhlosolis*) koji povećava površinu crijeva. Paklarama su za prehranu bitne i slinske žlijezde (izvodne cjevčice otvaraju se ispod jezika) čiji sekret sprječava koagulaciju krvi domaćina (Young 1985, Pough i sur. 2013).

Dišni sustav paklara temeljen je na prolasku vode od usta do ždrijela i dišne cijevi pa do škržnih vrećica gdje se odvija izmjena plinova do sedam vanjskih škržnih otvora (**Slika 1**) sa svake strane tijela. U parazitskoj fazi mišićnom aktivnošću stvara se podtlak i voda ulazi kroz vanjske škržne otvore. Paralelno hranjenje i disanje omogućava nabor (*velum*) ispred ulaza u dišnu cijev koji odvaja jednjak od dišne cijevi. Paklare imaju dobro razvijeno vensko srce koje je građeno od tri komorice: venskog zatona (*sinus venosus*), pretkljetke (*atrium*) i kljetke (*ventriculus*). Imaju razvijene i zaliske koji sprečavaju vraćanje krvi u suprotnom smjeru (Young 1985, Pough i sur. 2013).

Živčani sustav je tipičan za kralješnjake i predstavlja ishodišni tip živčanog sustava kralješnjaka. Imaju razvijen mozak i leđnu moždinu te velike mirisne reznjeve (to je značajka koju kasnije uočavamo kod hrskavičnjača). Leđna moždina je dorzalno spljoštena radi lakše opskrbe kisikom, a dorzalni i ventralni korijeni leđnomoždinskih živaca se ne ujedinjuju.



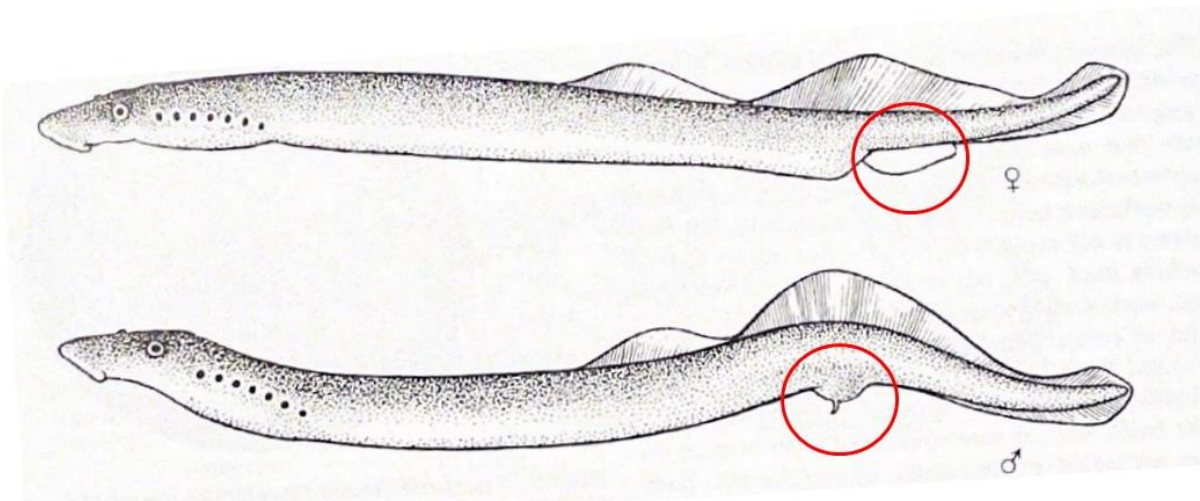
**Slika 4.** Usni otvori različitih vrsta porodice Petromyzontidae: a, *Eudontomyzon danfordi* Regan, 1911; b, *Eudontomyzon mariae* (Berg, 1931); c, *Eudontomyzon vladykovi* Oliva i Zanandrea, 1959; d, *Letentheron camtschaticum* (Tilesius, 1811); e, *Lampetra fluviatilis* Linnaeus, 1758; f, *Lampetra planeri* (Bloch, 1784); g, *Petromyzon marinus* Linnaeus, 1758; h, *Caspiomyzon wagneri* (Kessler, 1870)

(preuzeto iz Handbook of European freshwater fishes (Kottelat i Freyhof, 2007))

Ventralni korijeni imaju motoričku ulogu, a dorzalni senzornu ulogu. Velika razlika između živčanog sustava paklara (tj. paklara i sljepulja) i ostalih kralješnjaka je što živčana vlakna paklara nemaju mijelinsku ovojnici (omogućava brži prijenos živčanog impulsa). U sklopu živčanog sustava kod paklara nalazimo i pinealni organ koji je se sastoji od dvije parne vrećice koje nastaju invaginacijom međumozga. Najbolje je razvijen kod paklara i sljepulja te kod primitivnih gmazova. Uloga pinealnog organa je regulacija promjene boje i utjecaj na metamorfozu i reprodukciju. Od osjetila kod paklara nalazimo dobro razvijene oči (u adultnom stadiju), mirisni organ, slušni aparat te receptore u koži. Oči su dobro pokretljive pomoću parnih očnih mišića te imaju sposobnost akomodacije pomoću mišića rožnice. Većina zjenice je stalna, a očni kapci ne postoje. U ličinačkom stadiju oči nisu funkcionalne. Mirisni organ sastoji se od neparne vrećice s neparnim nosnim otvorom, a vrećicu inerviraju parni mirisni živci što znači da je neparnost mirisnog organa sekundarna. Njuh je paklarama najbolji alat za orijentaciju. Uz njuh za bolju orijentaciju pomažu im fotoreceptorne stanice u koži i bočna pruga. Uloga bočne pruge najviše je vezana za ravnotežu uz slušni organ koji isključivo služi za ravnotežu te zasad nema dokaza da paklare razlikuju zvučne signale. Osjećaju vibracije koje primaju i registriraju pomoću trepetljivikavih stanica. Unutar slušnog aparata postoji opneni labirint u kojem se nalaze samo dva polukružna kanalića (prednji i stražnji), a veliko predvorje (*vestibulum*) je podijeljeno na dijelove koji odgovaraju građi unutarnjeg uha viših kralješnjaka (Young 1985, Pough i sur. 2013).

Paklare su odvojenog spola te su primarno poliginični organizmi što znači da se više mužjaka pari s više ženki. Imaju neparne gonade i vanjsku oplodnju. Parenje započinje tako da mužjak odabere prikladno mjesto i zatim privlači ženku mirisom. Mužjak se svojim usnim otvorom pričvrsti na leđnu stranu ženke glave, a ženka se pričvrsti ustima za kamen. Dolazi do međusobnog ispreplitanja muške i ženske jedinke te istovremenog izbacivanja gameta i vanjske oplodnje. Oplodena jajašca polažu se u gnijezda koja su jedinke unaprijed izgradile u plitkoj vodi na najčešće šljunčanom i pjeskovitom dnu. Pri izgradnji gnijezda služe se usnim otvorom kako bi pomicale kamenje, a repom za razbacivanje taloga iz gnijezda. Razmnožavanje se odvija u proljeće te je uvelike uvjetovano temperaturom vode, a do razvoja sekundarnih spolnih značajka dolazi u zimi u zimi (**Slika 5**). Kod ženke je to podrepna peraja, a kod mužjaka organ u obliku penisa. Te značajke mogu biti od velike koristi pri razlikovanju spola paklara. Parenje se ponavlja nekoliko puta, a za vrijeme mrijesta odrasle jedinke se ne hrane, već žive od rezerva masti (Young 1985, Pough i sur. 2013).

U ekosustavima zabilježeni su slučajevi da više vrsta paklara živi skupa u istom okolišu, ali u različitim ekološkim nišama. Najčešće imamo zabilježeno da skupa obitavaju predatorske i ne predatorske populacije. Najproučavaniji takav slučaj je veza između anadromne, predatorske populacije *Lampetra fluviatilis* Linnaeus, 1758 i sedentarne, ne predatorske populacije *Lampetra planeri* (Bloch, 1784). Obje vrste imaju sličnu generalnu morfologiju što ne čudi s obzirom na to da žive u istom okruženju (Kottelat i Freyhof 2007). Bitno je uočiti suživot dviju vrsta na istom području te sagledati njihove sličnosti i razlike. Sva uočena saznanja mogu biti od koristi za daljnja istraživanja srodnosti vrsta koje žive na istom staništu i mogu potencijalno dati početni uvid u filogeniju.



**Slika 5.** Sekundarne reproduktivne značajke paklara označene crvenim krugom (preuzeto iz *The Life of Vertebrates* (Young J. Z., 1985))



## 1.2. Taksonomski položaj i odnosi paklara

Taksonomski položaj porodice Petromyzontidae (paklare) prema Čaleta i sur. (2019):

**CARSTVO** Animalia (životinje)

**KOLJENO** Chordata (svitkovci)

**POTKOLJENO** Vertebrata (kralješnjaci)

**NADRAZRED** Agnatha (besčeljusnjače)

**RAZRED** Petromyzonti

**RED** Petromyzontiformes

**PORODICA** Petromyzontidae (paklare)

Unutar porodice Petromyzontidae nalazimo 10 rodova s ukupno 40 opisanih vrsta.

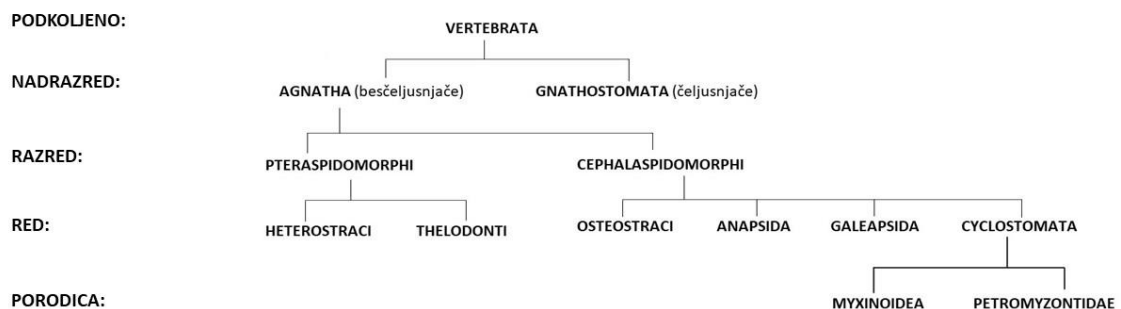
(<https://www.ucl.ac.uk/museums-static/obl4he/vertebratediversity/lamphreys.html>)

Potkoljeno Vertebrata (**Slika 6**) dijeli se na dva nadrazreda s obzirom na prisutnost čeljusti kod jednog nadrazreda (Gnathostomata - čeljusnjače) i izostanak istog kod drugog nadrazreda (Agnatha - besčeljusnjače). Kod besčeljusnjača također ne uočavamo parne peraje iako su kod izumrlih vrsta bile prisutne pektoralne bodlje ili peraje. Još neke od značajki prema kojima prepoznavamo besčeljusnjače su prisutnost sedam ili više škržnih otvora, središnje pinealno tijelo osjetljivo na svjetlo te unutarnje uho bez horizontalnog polukružnog kanala što zapravo znači da organizmi koji pripadaju ovom nadrazredu ne mogu čuti već samo osjećaju vibracije (Young 1985). Daljnje podjele unutar nadrazreda besčeljusnjača mogu varirati ovisno o autorima. Dva razreda koja sigurno nalazimo unutar nadrazreda Agnatha su razred Pteraspidomorphi bez prisutnih recentnih vrsta i razred Cephalaspidomorphi (Pough i sur. 2013), a u novijim istraživanjima možemo sve češće umjesto razreda Cephalaspidomorphi uočiti razred Petromyzonti kojem pripadaju paklare (Čaleta i sur. 2019). Prije ih se svrstavalo u red Cyclostomata koji pripada razredu Cephalaspidomorphi (Nelson 2006).

Unutar razreda Pteraspidomorphi (**Slika 6**) postoje dva podrazreda i to su podrazred Heterostraci i podrazred Thelodonti koje zajedničkim imenom nazivamo Ostracodermi što je termin koji se koristi za sve izumrle besčeljusnjače. Taj naziv dolazi od riječi Ostracon čiji je prijevod ljuska (ovisno o kontekstu), a ima smisla jer je jedna od glavnih značajki Ostracoderma bila prisutnost oklopa odnosno štita ili ljuske. Upravo nalazi ljusaka koji datiraju

iz kambrija (prije 542 mil. god. do prije 488 mil. god.) ukazuju nam na starost kralješnjaka kao skupine tj. dokazuju da su kralješnjaci jednako stara skupina kao i beskralješnjaci (treba uzeti u obzir da su kralješnjaci taksonomska kategorija, a beskralješnjaci nisu). Također nalazi ljusaka Ostracoderma pokazuju da su se kralješnjaci prvo razvili u oceanu. Cijeli fosili najčešće datiraju iz prijelaza silura u devon (prije 416 mil. god.) te su nađeni na područjima gdje su nekad bila ili su i danas slatkovodna vodena tijela (Pough i sur. 2013).

Cephalaspidomorphi su razred unutar kojeg smještamo redove Osteostraci, Anapsida, Galeapsida i Cyclostomata (**Slika 6**). Jedino red Cyclostomata ima recente predstavnike, a smatra se da preci paklara potječu iz reda Galeapsida. Unutar reda Cyclostomata postoje dvije porodice: Petromyzontidae (paklare) i Myxinoidea (sljepulje). Novija istraživanja ukazuju na to da je skupina Cephalaspidomorphi bliža skupini čeljusnjačama (Gnathostomata) nego besčeljusnjačama (Agnatha). Za skupinu Cephalaspidomorphi, pa tako i za skupinu Cyclostomata, se smatra kako imaju parafiletičko porijeklo. Parafiletička grupa tj. skupina koja ima parafiletičko porijeklo je skupina koja se ne sastoji od svih potomaka njihovog najrecentnijeg zajedničkog pretka te je prema kladistici (znanost koja grupira organizme prema njihovim zajedničkim izvedenim značajkama) umjetna skupina jer ne pokazuje evolucijske veze između organizama (Young 1985, Pough i sur. 2013).

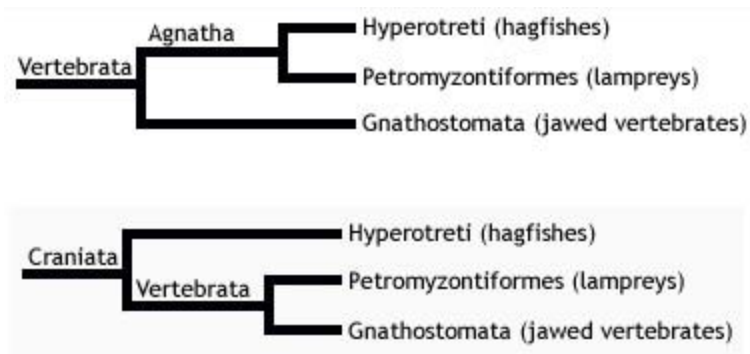


**Slika 6.** Prijašnji taksonomski položaj porodice Petromyzontidae

Problematika svrstavanja paklara unutar reda Cyclostomata i uopće upotreba naziva kružnoustu za paklare i sljepulje započinje već s hipotezom o kralješnjacima. Smatra se da je najtočnija hipoteza o sestrinskom odnosu čeljusnjača (Gnathostomata) i kružnostih (samo paklare, bez sljepulja) i prema toj sistematici sljepulje su sestrinska grupa čeljusnjačama i kružnoustim jer obilježje koje je svrstavalo sljepulje zajedno s paklarama (ne postojanje čeljusti) nije bitno za određivanje srodstvenih odnosa. Prema toj hipotezi sličnosti paklara i sljepulja su posljedica konvergentne evolucija tj. proizlaze iz prilagođavanja na slične životne uvjete (Forey i Janvier 2000, Janvier 2008). Sve sličnosti, uključujući biokemijske i fiziološke značajke ukazuju na postojanje zajedničkog pretka sljepulja i paklara, međutim točno vrijeme razdvajanja ove dvije skupine ostaje zasad nepoznato (Young 1985). Stoga nije čudno da autori sve češće porodicu Petromyzontidae umjesto u red Cyclostomata svrstavaju pod red Petromyzontiformes te umjesto u razred Cephalaspidomorpha, u razred Petromyzonti.

Konačno prema podacima IUCN-a možemo reći da su Petromyzontiformes nekad bile grupirane u takson Agnatha (besčeljusnjače) koji je sadržavao i sljepulje. Besčeljusnjače tradicionalno formiraju jednu od dvije glavne sestrinske linije kralješnjaka. Drugu liniju čine Gnathostomata (čeljusnjače). Međutim, u međuvremenu je otkriveno da su paklare srodnije čeljusnjačama nego sljepuljama i to nam govori da su besčeljusnjače parafiletička skupina. Treba naglasiti da se sljepulje više ne smatraju kralješnjacima u strogo smislu jer nemaju kralješnjački element koji okružuje dorzalnu živčanu vrpcu. Umjesto u kralješnjake sada ih se svrstava u monofiletičku skupinu Craniata koja je definirana postojanjem odvojene i definirane regije glave s mozgom i parnim senzornim organima (<https://www.ucl.ac.uk/museum-static/obl4he/vertebratediversity/lamphreys.html>).

S obzirom na to da su nepredatorske vrste paklara morfološki teške za identificirati, broj vrsta i njihova distribucija nisu razjašnjeni. Podaci dosadašnjih molekularnih analiza sugeriraju da sadašnja klasifikacija rodova nije odraz filogenetičkih odnosa europskih paklara (Kottelat i Freyhof 2007).



**Slika 7.** Kladogram netočne tradicionalne filogenije kralješnjaka (gore) i kladogram točne filogenija Craniata (dolje)

(preuzeto s: <https://www.ucl.ac.uk/museums-static/obl4he/vertebratediversity/lamphreys.html>)

### 1.3. Raznolikost paklara u Europi

Prema Kottelat i Freyhof (2007) na području Europe obitava 13 vrsta paklara od čega je 5 vrsta anadromno, a jedna od tih anadromni vrsta je izumrla (**Tablica 1**).

**Tablica 1.** Popis prisutnih paklara u Europi i njihov stupanj ugroženosti (Kottelat i Freyhof 2007)

Ime vrste	Engleski naziv	Hrvatski naziv	Status ugroženosti prema IUCN-u
<i>Caspiomyzon wagneri</i> (Kessler, 1870)	Caspian lamprey	kaspijska paklara	gotovo ugrožena vrsta (NT)
<i>Eudontomyzon danfordi</i> Regan, 1911	Carpathian lamprey	dunavska paklara	najmanje zabrinjavajuća vrsta (LC)
<i>Eudontomyzon hellenicus</i> (Vladykov, Renaud, Kott i Economidis, 1982)	Greek brook lamprey	grčka paklara	kritično ugrožena vrsta (CR)
<i>Eudontomyzon mariae</i> (Berg, 1931)	Ukrainian brook lamprey	ukrajinska paklara	najmanje zabrinjavajuća vrsta (LC)
<i>Eudontomyzon stankokaramani</i>	Drin brook lamprey	drinska potočna paklara	najmanje zabrinjavajuća vrsta (LC)

<i>Eudontomyzon vladykovi</i> Oliva i Zanandrea, 1959	Danubian brook lamprey	dunavska paklara	najamnje zabrinjavajuća vrsta (LC)
<i>Eudontomyzon sp. migratory</i>	Ukrainian migratory lamprey	ukrajinska migratorna paklara	izumrla vrsta (EX)
<i>Lampetra fluviatilis</i> Linnaeus, 1758	European river lamprey	riječna paklara	najmanje zabrinjavajuća vrsta (LC)
<i>Lampetra planeri</i> (Bloch, 1784)	European brook lamprey	potočna paklara	najmanje zabrinjavajuća vrsta (LC)
<i>Lampetra zanandreaei</i> (Vladykov, 1955)	Adriatic brook lamprey	primorska paklara	najmanje zabrinjavajuća vrsta (LC)
<i>Lethenteron camtschaticum</i> (Tilesius, 1811)	Arctic lamprey	arktička paklara	najmanje zabrinjavajuća vrsta (LC)
<i>Lethenteron reissneri</i> (Dybowski, 1869)	Siberian lamprey	sibirska paklara	najmanje zabrinjavajuća vrsta (LC)
<i>Petromyzon marinus</i> Linnaeus, 1758	Atlantic sea lamprey	morska paklara	najmanje zabrinjavajuća vrsta (LC)

Od svih 13 navedenih vrsta autori navode prisutnost na području Republike Hrvatske samo za tri slatkovodne vrste paklara. To su *Eudontomyzon vladykovi*, *Lampetra zanandreaei* i *Petromyzon marinus*. Te vrste se poklapaju s vrstama koje nalazimo na popisu vrsta slatkovodne ihtiofaune iz 2019. godine (Ćaleta i sur. 2019), ali se ne poklapaju s vrstama na popisu iz Crvene knjige slatkovodne ihtiofaune iz 2006. godine (Mrakovčić i sur. 2006). Ne poklapanje vrsta iz sva tri spomenuta izvora ukazuje na potrebu za detaljnijim istraživanjem filogenetskih odnosa između pronađenih vrsta, ali i na potrebu za detaljnijim terenskim istraživanjima.

Pregledavanjem rasprostranjenosti paklara u Europi može se uočiti praznina na području jugoistočne Europe što naizgled ukazuje na to kako tamo ne nalazimo paklare. S obzirom na to da ipak znamo da paklare obitavaju i na prosotru Hrvatske (Ćaleta i sur. 2019) i na prostoru Bosne i Hercegovine (Tutman i sur. 2020) ta informacija je još jedan pokazatelj kako su daljnja istraživanja potrebna.

### **1.3.1. Paklare u Hrvatskoj – prisutnost, ugroženost i zaštita**

Broj navedenih vrsta paklara na području Republike Hrvatske prema Crvenoj knjizi slatkovodne ihtiofaune iz 2006. godine je pet, od čega jedna vrsta obitava u morskom okolišu, a preostale četiri vrste nalazimo u slatkim vodama odnosno potocima, rijekama i jezerima. Treba napomenuti da je 2006. godine Crvena knjiga slatkovodne ihtiofaune Republike Hrvatske bila prva publikacija koja je povezala i sustavno obradila podatke o ugroženoj ihtiofauni Republike Hrvatske. Obradene su vrste s Crvenog popisa, procijenjena je ugroženost vrsta prema IUCN-u te su napisani prijedlozi konkretnih mjera zaštite. Uz te podatke za svaku vrstu navodi se i sistematski položaj (razred, red, porodica), *locus typicus*, podrijetlo, uzroci ugroženosti, rasprostranjenost, učestalost, kratak opis i biologija vrste, stanište vrste te sinonimi i stari nazivi vrste. Za paklare su vrlo bitni upravo sinonimi i stari nazivi jer postoje mnoga preklapanja, ali i razlike između podataka iz 2006. godine i novijih podataka. Popis paklara prisutnih na području Hrvatske u 2006. godini i njihov status ugroženosti prema IUCN-u prikazan je u **Tablici 2** (Mrakovčić i sur. 2006). Sinonimi za vrste navedene u tablici su mnogobrojni, ali niti jedan se ne poklapa sa sinonimima odnosno nazivima pod kojim su vrste spomenute u istraživanjima prema najnovijem popisu vrsta paklara iz 2019. godini za područje Republike Hrvatske (Ćaleta i sur. 2019). No, zato možemo uočiti preklapanja između navedenih latinskih imena i navedenih sinonima u novijem istraživanju.

**Tablica 2.** Popis prisutnih vrsta paklara prema Crvenoj knjizi slatkovodne ihtiofaune Republike Hrvatske uz njihov status ugroženosti prema IUCN-u (Mrakovčić i sur. 2006)

<b>Naziv vrste (lat.)</b>	<i>Lethenteron zanandreaei</i> (Vladykov, 1955)	<i>Petromyzon marinus</i> Linnaeus, 1758	<i>Eudontomyzon danfordi</i> Regan, 1911	<i>Eudontomyzon mariae</i> (Berg, 1931)	<i>Lampetra planeri</i> (Bloch, 1784)
<b>Naziv vrste (hrv.)</b>	primorska paklara	morska paklara	dunavska paklara	ukrajinska paklara	potočna paklara
<b>IUCN status ugroženosti u RH</b>	Ugrožena (EN)	Nedovoljno poznata (DD)	Gotovo ugrožena (NT)	Gotovo ugrožena (NT)	Gotovo ugrožena (NT)

Prema podacima iz 2019. godine na području Republike Hrvatske nalazimo tri vrste paklara. To su dunavska paklara (*Eudontomyzon vladykovi*, Oliva i Zanandrea, 1959) koja je endem dunavskog slijeva, primorska paklara (*Lampetra soljani*, Tutman, Freyhof, Dulčić, Glamuzina i Geiger, 2017) koja je endem neretvanskog slijeva i jadranskog bazena te ju uz rijeke Neretvu i Norin nalazimo i u Baćinskim jezerima i u jezeru Desne te morska paklara (*Petromyzon marinus*, Linnaeus, 1759) koja obitava na području Jadranskog bazena i rijeke Neretve. Postoje izvješća da su primorska paklara i morska paklara nađene i na području Istre, međutim ti podaci nisu potvrđeni (Ćaleta i sur. 2019). U **Tablici 3** napisani su svi sinonimi za ove tri vrste.

Možemo uočiti da se broj navedenih vrsta ne poklapa se s prijašnjim podacima iz 2006. godine kada se u Crvenoj knjizi slatkovodne ihtiofaune navodi pet vrsta paklara na području Republike Hrvatske. Proučavanjem sinonima vidi se da prethodno navedenih pet vrsta možemo svesti na tri navedene vrste prema podacima iz 2019. godine. Primorska paklara – *Lethenteron zanandreaei* (Vladykov, 1955) i potočna paklara – *Lampetra planeri* (Bloch, 1784) odgovaraju vrsti *Lampetra soljani* Tutman, Freyhof, Dulčić, Glamuzina i Geiger, 2017; dunavska paklara - *Eudontomyzon danfordi* Regan, 1911 i ukrajinska paklara – *Eudontomyzon mariae* (Berg, 1931) odgovaraju vrsti *Eudontomyzon vladykovi* Oliva i Zanandrea, 1959; a morska paklara – *Petromyzon marinus* Linnaeus, 1758 ostaje *Petromyzon marinus* Linnaeus, 1758. Razlog što nije bilo nikakve promjene ili drugog

**Tablica 3.** Popis prisutnih vrsta paklara u Republici Hrvatskoj i njihovi sinonimi prema Čaleta i sur. 2019

<b>Naziv vrste (lat.)</b>	<i>Eudontomyzon vladykovi</i> Oliva i Znanandrea, 1959	<i>Lampetra soljani</i> Tutman, Freyhof, Dulčić, Glamuzina i Geiger, 2017	<i>Petromyzon marinus</i> Linnaeus, 1758
<b>Naziv vrste (hrv.)</b>	dunavska paklara	primorska paklara	morska paklara
<b>Sinonimi</b>	<i>Ammocoetes branchialis</i> Cuvier; <i>Eudontomyzon danfordi</i> Regan, 1911; <i>Eudontomyzon danfordi vladykovi</i> Oliva & Znanandrea, 1959; <i>Eudontomyzon mariae</i> Oliva & Znanandrea, 1959; <i>Lampetra fluviatilis</i> Berg, 1931; <i>Lampetra planeri</i> (Bloch, 1784); <i>Petromyzon fluviatilis</i> Linnaeus, 1758; <i>Petromyzon planeri</i> Bloch, 1784	<i>Eudontomyzon mariae</i> Oliva & Znanandrea, 1959; <i>Lampetra fluviatilis</i> Berg, 1931; <i>Lampetra planeri</i> (Bloch, 1784); <i>Lampetra znanandreae</i> Vladykov, 1955; <i>Lethenteron znanandreae</i> (Vladykov, 1955); <i>Petromyzon fluviatilis</i> Linnaeus, 1758	<i>Petromyzon fluviatilis</i> Linnaeus, 1758

nazivlja kod morske paklare je možda to što se nisu proučavale dovoljno. No, da bismo bili sigurni u prisutnost vrsta na području naše države potrebno ih je bolje proučiti i pomoću modernih genetičkih metoda, molekularnih analiza i filogenetskih rekonstrukcija utvrditi o kojim se vrstama stvarno radi. Jednom kada smo sigurni u to koje vrste su prisutne i kada njihovu prisutnost stavimo u okvire geoloških i geomorfoloških procesa koji su se događali na



području na kojem obitavaju možemo procjenjivati njihovu ugroženost i zatim otkloniti prijetnje te prema potrebi zaštititi ugrožene vrste i očuvati bioraznolikost Republike Hrvatske. Svi navedeni podaci ukazuju kako je potrebno napraviti reviziju Crvene knjige slatkovodne ihtiofaune Republike Hrvatske jer nema smisla voditi se starim podacima, ako su dobivene nove i točnije spoznaje. Revizija i pojava novih saznanja se smisleno nameću s obzirom da je između pojave starih i novih podataka prošlo 13 godina, a do danas i 15 godina unutar kojih je znanost napredovala i unutar kojih su provedena nova istraživanja koja su uključivala metode identifikacija vrsta koje se prije možda nisu koristile koliko su se trebale koristiti.

#### **1.4. Uloga i primjena suvremenih metoda filogeografije i molekularne filogenije te genskih markera za potrebe filogenetske rekonstrukcije**

Metode filogenetske rekonstrukcije omogućavaju nam izradu filogenetskih stabala i mreža te su upravo ta stabla i mreže vizualno najjednostavniji i najprikladniji način prikazivanja evolucije nekog organizma. Da bismo razjasnili i razumjeli važnost upotrebe filogenetske rekonstrukcije i nju samu, moramo se prvo osvrnuti na pojmove i definicije filogeografije, molekularne filogenije, populacijske genetike i molekularnih genskih markera.

Znanstvena disciplina koja se bavi proučavanjem principa i procesa geografske raspodjele genealoških linija, naziva se filogeografija (Avice 1998, Hewitt 2001, Emerson i Hewitt 2005). Usporedbe filogeografskih analiza omogućuju nam uvid u širenje vrsta u prostoru, specijaciju, adaptivnu radijaciju, izumiranje te evoluciju okoliša. To znači da kombiniranjem podataka filogeografskih analiza možemo istraživati veze između procesa unutar populacija i evoluciju određenih taksonomskih jedinica na nekom prostoru (Bermingham i Moritz 1998).

Molekularna filogenija je znanstvena disciplina koja se bavi rekonstrukcijom i opisivanjem srodstvenih veza između vrsta i/ili viših taksonomskih jedinica (Lipscomb 1998). Razvila se na temelju metoda koje su se krenule koristiti 80-ih godina koje su utvrđivale varijabilnost DNA sekvenci. Te metode omogućile su uvid u genealogiju gena (Emerson i Hewitt 2005).

Za potrebe filogenetskih analiza korisni podaci dobivaju se i iz područja populacijske genetike s obzirom na to da ta grana genetike proučava genetičku strukturu populacija. To uključuje analizu učestalosti gena i genotipova te čimbenika koji ih uzrokuju u prirodnim

populacijama, određivanje distribucije genskih polimorfizama i uočavanje mutacija, migracija, selekcije i drifta (Pavlica 2012).

Filogeografska i filogenetska istraživanja nezamisliva su bez genskih markera. Za istraživanje struktura populacija kod viših životinja najprikladniji markeri su oni koje nalazimo unutar mitohondrijske DNA (mtDNA). Prednosti mtDNA su njena prisutnost u velikom broju kopija unutar stanice, nasljeđivanje majčinskom linijom bez rekombinacija uz visoki stupanj mutacija te jednostavnost izolacije čistih homolognih sekvenci (Zhang i Hewitt 1996, Avise 1998, Emerson i Hewitt 2005). Treba uzeti u obzir da je DNA podložna mutacijama pa i unutar jedinki istih vrsta možemo uočiti manje promjene u slijedu dušičnih baza (Keat-Chuan i sur. 2017). Genski markeri koji se u moderno doba najčešće koriste u filogenetskim istraživanjima su mitohondrijski geni citokrom *b* (cyt *b*), kontrolna regija (CR) i citokrom oksidaza I/II (CO I/II) (Patwardham 2014). Od navedenih markera najkorisniji za istraživanje strukture i porijekla ribljih populacija te opisivanje filogenetskih veza između bliskih taksonomskih jedina je citokrom *b* (cyt *b*). Razlog tome je uloga cyt *b* u kodiranju proteina bitnih u procesu disanja kod staničnog disanja (Buj i sur. 2014, Buj i sur. 2017, Schenekar i sur. 2014). Zbog pojava horizontalnog prijenosa gena, selekcija i hibridizacije, nije dovoljno koristiti samo jedan genski marker prilikom filogenetskih istraživanja (Bermingham i Moritz 1998). Problem donošenja krivih zaključaka prilikom istraživanja filogenije vrsta ili taksonomske jedinice rješava se paralelnom upotrebom više genskih markera na većem broju različitih sekvenci (Emerson i Hewitt 2005).

Kao što je već spomenuto, rezultat filogenetske rekonstrukcije su filogenetska stabla i filogenetske mreže nastale upotrebom neke od filogenetskih metoda. Najčešće korištene su metoda najveće parsimonije, metoda najveće vjerojatnosti, Bayesove metode i metode susjednog povezivanja. Ulazni podaci za izradu filogenetskih stabala i mreža su obično haplotipovi sekvenci organizma čiju evolucijsku povijest želimo proučiti. Glavna razlika između filogenetskih mreža i stabala je u tome što filogenetskom mrežom možemo prikazati pojave koje u filogenetskim stablima ne možemo. Filogenetske mreže ne isključuju rekombinaciju, lateralni prijenos gena i hibridizaciju zato što dopušta poprečne veze između vrsta koje su u direktnom srodstvu. Kod filogenetskih stabala to nije moguće, ali zato nam prikazuju precizniju evolucijsku povijest organizma i odnose između organizama.

## 1.5. Ciljevi istraživanja

Biologija porodice Petromyzontidae na području Republike Hrvatske nije dovoljno istražena, a to predstavlja problem u zaštiti pojedinih vrsta (Mrakovčić i sur. 2006). Kako bi se neka vrsta mogla pravilno zaštititi potrebno je ustanoviti njenu točnu rasprostranjenost, odnosno istražiti koje su točno vrste prisutne na nekom području te kakva je raznolikost skupine na molekularnoj razini. Dobivanje uvida u filogeniju i rasprostranjenost skupine prvi je korak za daljnja istraživanja koja na kraju dovode do adekvatne zaštite vrsta (De Cahsan i sur. 2020). Ovaj diplomski rad predstavlja prvo istraživanje o raznolikosti paklara u kontinentalnoj Hrvatskoj potkrijepljeno molekularnim analizama i modernim genetičkim metodama. Naglasak je upravo na genetici koja može potvrditi već postojeća znanja, ali i dati potpuno novi uvid u filogeniju proučavane skupine. To je ujedno i potvrda važnosti provedbe genetičkih analiza za potencijalna daljnja istraživanja. Osnovni ciljevi ovog istraživanja su:

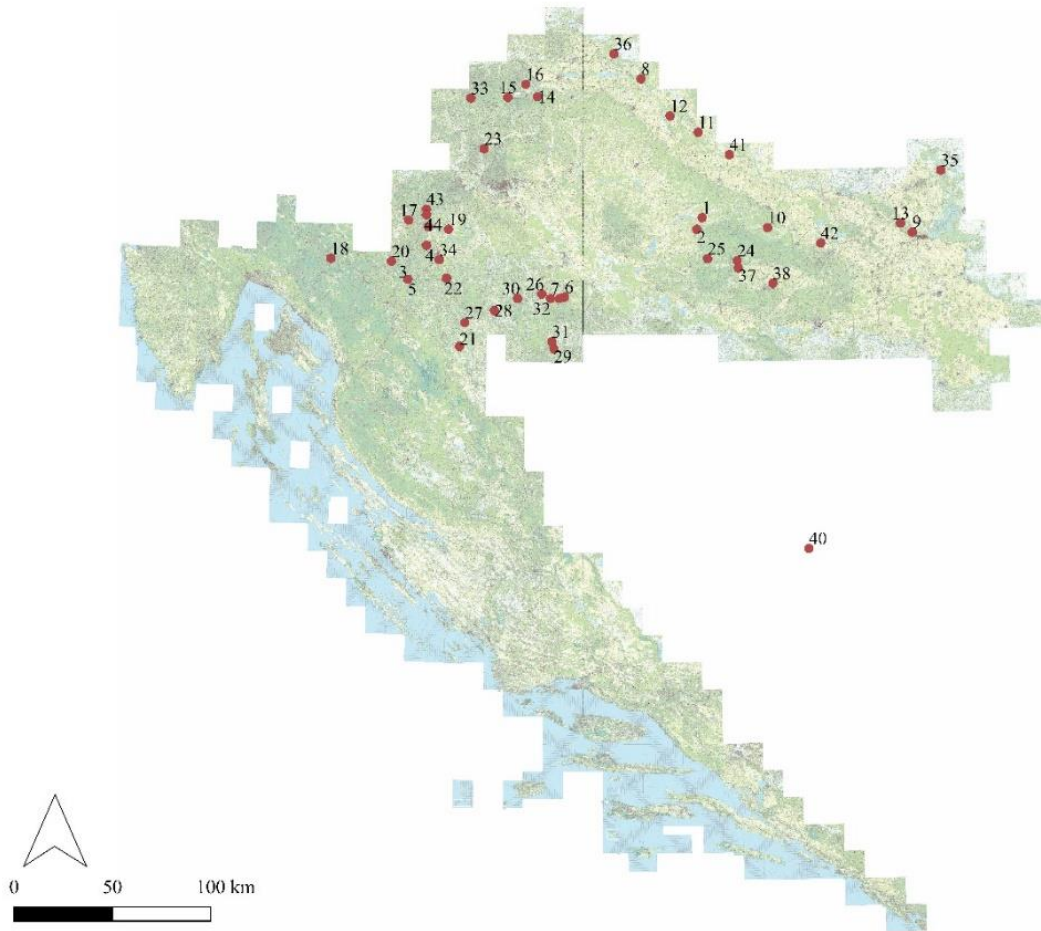
1. Utvrditi srodstvene odnose proučavane porodice
2. Odrediti točan taksonomski položaj vrsta unutar porodice
3. Napraviti filogenetsku rekonstrukciju skupine na proučavanom području
4. Procijeniti gensku raznolikost i strukturu pojedinih utvrđenih vrsta i linija

## 2. PODRUČJE ISTRAŽIVANJA – dunavski slijev Republike Hrvatske

Rijeka Dunav izvire na prostoru jugozapadne Njemačke u Schwarzwald, a tok joj završava deltastim ušćem na obali Crnog mora. To znači da Dunav skupa sa svim svojim pritocima pripada Crnomorskom slijevu koji zauzima 62% (35-132 km<sup>2</sup>) površine kopnenih voda Republike Hrvatske. Kao dominantne rijeke crnomorskog slijeva s područja Hrvatske, uz Dunav možemo izdvojiti Savu i Dravu (<https://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=16593>).

Zbog svojih geomorfoloških i hidroloških značajki ove rijeke i njihovi pritoci stanište su 81 vrste slatkovodnih riba (19 od tih vrsta nalazimo i u jadranskom slijevu). Prema Crvenoj knjizi slatkovodne ihtiofaune Hrvatske u tih 81 vrsta riba uključene su i 4 vrste paklara kojima stanište čine rijeke crnomorskog slijeva (Mrakovčić i sur. 2006). Broj vrsta ihtiofaune ovog područja nije konačan te se pretpostavlja da će rasti s obzirom na to da neke skupine i područja nisu dovoljno dobro istraženi.

Porječje Dunava u Hrvatskoj odlikuje dobro razvijena i pretežno povezana riječna mreža. Iznimku čini njen zapadni dio gdje je zbog karbonatnih stijena i krškog reljefa površinsko otjecanje smanjeno, a tekućice slabije povezane. Bogatstvo vrsta ovog područja rezultat je biogeografske podjele hrvatskih kopnenih voda te evolucijskih procesa koji su nastali kao posljedica geoloških procesa na ovom području. To su uzdizanje Dinarida prije 12-8,5 milijuna godina, izražena tektonska aktivnost na području dinarskog krša, razvoj središnjeg Paratethys bazena, razvoj sustava neogenskih bazena u Dinaridima (od paleogena do donjeg miocen/pliocena), Mesinijska kriza saliniteta prije 6,1-5,3 milijuna godina (to nije bila jedina kriza saliniteta) te izmjena glacijala i interglacijala. Dokazano je na nekoliko skupina riba kako su rijeke Sava i Kupa bile refugiji u koje su se povlačile populacije više skupina riba za vrijeme glacijalnih razdoblja iz kojih je nakon kraja posljednje glacijacije krenulo ponovno širenje nazad u rijeke srednje i sjeverne Europe. To je bilo moguće jer Sava i Kupa nisu bile toliko pod utjecajem ledenjaka kao rijeke u Alpama ili ostalom dijelu srednje i sjeverne Europe. Naravno, došlo je do pada temperature vode, ali to su i dalje bili dovoljno dobri uvjeti za opstanak vrsta iako su gustoće populacija bile smanjene. Sve navedeno su razlozi koji nam ukazuju zašto bi na području dunavskog slijeva Republike Hrvatske mogli otkriti nove vrste riba, ali i paklara (Buj 2020).



**Slika 8.** Karta istraživanog područja s lokalitetima uzorkovanja označenim brojevima od 1 do 44 (crvene točke)

Terenski dio istraživanja provodio se na tekućicama dunavskog slijeva Republike Hrvatske i njihovim pritocima, uz iznimku rijeke Bosne koja pripada istom slijevu, ali ne spada pod teritorij iste države. Jedinke paklara i pokača uzorkovane se iz 19 tekućica, tj. sveukupno s 45 različita lokaliteta (**Slika 8**): Bednja, Mura, Drava, Krapina, Sutla, Mrežnica, Dobra, Kupa, Korana, Una, Sunja, Glina, Ilova, Česma, Sava, Pakra, Dunav, Orpljava i Bosna. Cilj je bio obuhvatiti što veći dio područja dunavskog slijeva kako bi rezultati bili sveobuhvatniji i reprezentativniji.

Jedini lokalitet koji se ne nalazi na području Hrvatske je lokalitet na rijeci Bosni kod ušća rijeke Lašve.

**Tablica 4.** Popis lokaliteta uzorkovanja s njihovim koordinatama

Broj lokaliteta (Slika 7)	Lokalitet	Tekućica	Koordinate	
			x	y
1	Maslenjača	Ilova	560197	5058070
2	Toplica, Daruvar	Ilova	557500	5052094
3	Dobra	Dobra	410463	50267595
4	Tomašnica	Dobra	420006	5043915
5	Lešće	Dobra	410471,813	5026750,625
6	Borojevići	Sunja	490301,52	5017717,5
7	Sunja	Sava	487634,2822	5016840,699
8	Legrad	Drava	529130	5128672
9	Osijek	Drava	667133,452	5050785,294
10	Voćin	Voćinska rijeka	593536	5052992
11	Štorgač	Drava	558222,131	5101477,577
12	Repaški most	Drava	543888	5109834
13	Petrijevci	Drava	661185,317	5055300
14	Ivanečka Željeznica	Bednja	476508	5119574
15	Bednja	Bednja	461409	5119244
16	Voća	Bednja	470571,589	5125898,095
17	Bubnjarci	Kupa	410917	5056804
18	Brod na Kupi	Kupa	371380	5037351
19	Lazina	Kupčina	431217	5052080
20	Pribanjci	Kupa	402180	5035850
21	Furjašnica	Korana	436778	4992504
22	Brezova Glava	Radonja	430246	5027233
23	Stubička Slatina	Krapina	449351,164	5093119,276
24	Brzaja	Česma	578056,266	5036136,904
25	Pakra	Pakra	562958,456	5037184,593
26	Bručina	Glina	478654	5019125
27	Ruševnica	Glina	439468,613	5004550,843

28	Glinica	Glina	454568	5010761
29	Čemernica	Glina	484835,4097	4991163,31
30	Buzeta, Šibine	Glina	466336,537	5016957,44
31	Žirovnica	Una	483788,159	4994947,75
32	Petrinjčica	Kupa	483119,669	5016839,651
33	Kupinjak	Sutla	442599	5118875
34	Mostanje	Mrežnica	426482	5036651
35	Batina	Dunav	681655	5082248
36	Goričan	Mura	515342	5141418
37	Orljava	Orljava	578633,526	5032450,053
38	Kaptolka	Orljava	596235,439	5024620,295
39	Živković kosa	Radonja	430246	5027233
40	Ušće Lašve	Bosna	614594	4889755
41	Terezino polje	Drava	574068,5	5090106
42	Bukvik	Drava	620585,726	5045134,223
43	Jaševnica	Kupa	419942	5062352
44	Bukovica	Kupa	420029	5059470
45	Ozalj	Kupa	420956	5053477

Uzorci su prikupljeni iz brojnih pritoka Save i Drave koje predstavljaju dva najveća pritoka rijeke Dunav na području Hrvatske (**Tablica 4**). Općenito paklare obitavaju u čistim tokovima, bogatim kisikom dok ličinke uvijek nalazimo na detritusom bogatim pješčanim ili glinenim podlogama slatkovodnih tokova. Također odraslim jedinkama je bitno da na staništu na kojem obitavaju postoji i određena količina šljunka koji im je bitan za izgradnju gnijezda u koja polažu jajašaca (Kottelat i Freyhof 2007).

Na samom Dunavu uzorkovalo se na jednoj postaji (Batina), na Dravi na 11 postaja uz još tri postaje na Dravinim pritocima Bednji i Muri. Lokaliteti su se međusobno razlikovali, ali povezuju ih sličnosti u tipu dna. Na svakom lokalitetu je dno prekriveno sitnim i srednje krupnim sedimentom, većinom pijeskom, a u par slučajeva je prevladavao šljunak. Uzorci nisu bili ulovljeni na mjestima gdje je dno neke rijeke ili potoka većinski prekriveno kamenjem ili bez prisustva pijeska i/ili šljunka.

Na Savinim pritocima uzorkovanje se odvijalo na 33 različite postaje. Na svim postajama, bilo da se radilo direktno o Savinim pritocima ili o pritocima Kupe ili Lonje, je bila slična situacija kao i na Dravinim postajama. Različiti lokaliteti ujedinjeni su prevladavajućim tipom dna vodotoka. Za razliku od postaja na Dravinim pritocima, na Savinim postajama u skoro svim slučajevima prevladava šljunčano dno za razliku od pješčanog ili muljevitog. Iznimka je lokalitet Pribanjci na rijeci Kupi gdje je na dnu prevladavalo kamenje uz nešto malo mulja.

Uzorkovanje je proveo ihtiološki tim Zoologijskog zavoda Biološkog odsjeka. Uzorci su prikupljeni od 2015. godine.



### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Popis korištenih kemikalija, opreme i računalnih programa**

##### **3.1.1. Terenska oprema za sakupljanje uzoraka**

- Škare s tupim vrhom
- Eppendorf tubice volumena 0,5 ml
- 96 % - tni etanol

##### **3.1.2 Laboratorijska oprema i kemikalije**

- PCR uređaj (eppendorf nexus GX2)
- Centrifuga (eppendorf Centrifuge 5424)
- Vodena kupelj (SHEL LAB model no: 1225)
- Dneasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN): ATL pufer, AL pufer, AW1 i AW2 koncentrirani pufer (prema uputama treba dodati 96-100 % -tni etanol), AE elucijski pufer, proteinaza K
- HotStarTaq Plus Master Mix Kit (QIAGEN)
- Agarozna (Thermo Scientific TopVision Agarose Tablets)
- TAE pufer
- Boja za agarozni gel (invitrogen SYBR Safe DNA gel stain)
- Oprema za elektroforezu (BIO RAD SUB-CELL GT i BIO RAD POWER PAC 300)
- Vorteks miješalica (BIO RAD BR-2000 Vortexer)
- Mikropipete (eppendorf Research plus)
- Stroj za slikanje s UV svjetlom (FastGene GelPic LED Box)

##### **3.1.3. Računalni programi**

- BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2.5 (Hall 1999)
- DnaSP 5.10 (Librado i Rozas 2009)
- Network 4.5.1.6. (Fluxus Technology Ltd.)
- MEGA 6.06 (Tamura i sur. 2007)
- PAUP 4.0b10 (Swofford 2002)
- QGIS 3.20.2
- SITES (Hey i Wakeley 1997)

### **3.2. Sakupljanje uzoraka**

Jedinke paklara i njihovih ličinki lovljene su nasumično rukom te im se pomoću škara rezao mali dio (najčešće) leđne peraje, a zatim ih se puštalo nazad u vodu. Ovakvom metodom se nije remetila ravnoteža ekosustava u kojem jedinke žive te ih se nije ubijalo. Uz činjenicu da se ovom metodom vršio najmanji utjecaj na same jedinke, ovakav način uzorkovanja omogućava i neselektivnost pri ulovu. Sakupljeni uzorci peraja zatim su bili pohranjeni u tubice marke Eppendorf, volumena 0,5 ml napunjene etanolom uz pripadajuće informacije o lokaciji, datumu i kodu uzorka. Kod uzorka određivala sam prema vrsti životinje koju se uzorkovalo te prema lokaciji uzorkovanja; npr. ako je neka jedinka paklare ili pokače bila uzorkovana u rijeci Dravi, dobila bi kod PKDR (PK – paklara, DR – Drava). Uz ta četiri slova koda zapisivala sam i broj uzorka s obzirom na to da je više jedinki moglo biti ulovljeno u istoj rijeci, ali ne nužno u istom dijelu rijeke ili pritoka. Tako pohranjeni uzorci spremljeni su nakon terena u zamrzivač na temperaturu od -20°C kako ne bi došlo do raspadanja DNA uzorka.

### **3.3. Postupci u laboratoriju (izolacija DNA, umnažanje gena lančanom reakcijom polimeraze (PCR), sekvenciranje)**

Prethodno pravilno pohranjeni uzorci tkiva prolaze kroz niz radnji od kojih je prva izolacija DNA. Da bi se izolacija mogla pravilno provesti, sve uzorke sam usitnila pomoću škara na komadiće veličine cca 0,5 cm (u slučaju da su bili veći) te sam ih zatim premještala u novo pripremljene Eppendorf tubice (0,5 ml) od kojih je svaka na poklopcu bila označena brojem (1 – n, ovisno o broju uzoraka). Daljnji koraci izolacije odvijali su se pomoću DNeasy Blood & Tissue kompleta kemikalija prema protokolu proizvođača kompleta, QIAGEN-a. U novo pripremljene eppendorf tubice s uzorcima, prvo sam dodala 180 µl ATL pufera i zatim još 20 µL proteinaze K. ATL pufer služi za razaranje tkiva uzorka, a proteinaza K za razaranje staničnih membrana. Nakon dodavanja ovih kemikalija uzorke u tubicama stavljala sam na vorteks miješalicu kako bi se njihov sadržaj ravnomjerno izmiješao. U idućem koraku uzorke u tubicama stavljala sam u vodenu kupelj na temperaturu od 56°C u trajanju od 24 sata. Idući dan ponovno ih stavljam na vorteks miješalicu (u trajanju 10-ak sekundi). Uzorcima sam zatim dodala 200 µl AL pufera. Zatim je opet slijedilo miješanje na vorteks miješalici nakon kojeg sam uzorcima dodala 200 µl 96%-tnog etanola. Ponovno je uslijedilo miješanje na vorteks miješalici nakon kojeg sam iz tubica otpipetirala 650 µl uzorka te sam taj volumen prebacila u tubice s kolonom. Tubice s kolonom također sam prethodno označila brojevima tako da se poklapaju s brojevima na običnim tubicama. Uzorke u novim tubicama stavljala sam na centrifugu 8000 rpm na 1 minutu. Nakon centrifuge, kolone tubica prenosila sam u nove tubice

u koje sam zatim dodala 500  $\mu$ l AW1 pufera te sam ih ponovno stavila na centrifugu 8000 rpm na 1 minutu. Kolonu sam ponovo prenosila u novu tubicu u koju sam dodala 500  $\mu$ l AW2 pufera. Pri svakom prenošenju kolone u novu tubicu, donji dio tubice s membranom sam odlijevala. Zatim je uslijedila centrifuga uzoraka na 14000 rpm u trajanju od 3 minute. Nakon centrifuge donji dio tubice s kolonom sam odlila, a kolone se prenosila u Eppendorf tubicu s prethodno označenim pripadajućim kodom. U svaku tubicu dodala sam 150  $\mu$ l elucijskog AE pufera i tubice s uzorcima se ostavila 2-3 minute na sobnoj temperaturi da pufer može djelovati. Uslijedila je zadnja centrifuga (8000 rpm na 1 minutu) nakon koje sam kolone bacile, a u Eppendorf tubicama su preostali DNA izolati.

Dobivene DNA izolate sam umnožila lančanom reakcijom polimerazom (PCR reakcijom). Prije stavljanja u PCR uređaj, uzorke sam pripremila s obzirom na genski marker koji se trebao analizirati. Željeni genski markeri su gen za citokrom *b* (*cyt b*) i gen za citokrom oksidazu (CO I) koji su kodirajući gen unutar mitohondrijske DNA (mtDNA). Uzorke sam pripremila pomoću seta kemikalija HotStarTaq Plus Master Mix Kit (QIAGEN) te početnica sintetiziranih u MacrogenEurope servisu. Sam protokol je optimiziran kako bi dao najbolje produkte, a PCR uvjeti i početnice navedeni su u **Tablici 4**.

Rezultat i uspješnost PCR reakcija provjerila sam elektroforezom na agaroznom gelu. Gel sam pripremila pomoću 1 g agaroze koju sam stavila u 100 ml TAE (1%) pufera koji je po svom sastavu tris (2-amino-2-hidroksimetilpropan-1,3-diol), octena kiselina i EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina). Također da bi gel kasnije bilo moguće slikati pod UV svjetlom dodala sam u mješavinu za gel i 8  $\mu$ l SYBR Safe boje. Uzorke sam mikropipetom stavila na gel koji se zatim stavlja u kadicu za elektroforezu te se provodi elektroforeza na 120 V, 30 minuta. Nakon pola sata gel sam stavljala u stroj za slikanje s UV svjetlom. Dobiveni i elektroforezom provjereni PCR produkti poslani su u Macrogen na određivanje primarne strukture nukleotida (sekvenciranje), a dobivene sekvence sravnila sam pomoću računalnog programa BioEdit. Prilikom sravnjivanja, kromatograme svih dobivenih sekvenci vizualno sam provjerila.

**Tablica 4.** Laboratorijski protokol za PCR i početnice za analizirane genske markere citokrom b (*cyt b*) i citokrom oksidazu (COI)

gen	<i>cyt b</i>	COI
<b>PCR uvjeti</b>	10 min 95,0 °C 35x 00:45 92,0 °C 01:30 48,0 °C 01:45 72,0 °C 7 min 72,0 °C	10 min 95,0 °C 35x 00:40 94,0 °C 35x 00:40 50,0 °C 35x 00:40 72,0 °C 10 min 72,0 °C
<b>Počtnice za PCR</b>	ProK: TTATTTAATGTTAAGATR CTAGCTTTGG Pak- Glu F: CACCGTTGTAGAATTCAA CTATAAG	PAKCOIF1: GGCTTCGGAAATTGACTT GTACCAAT

### 3.4. Filogenetska rekonstrukcija

Za potrebe utvrđivanja srodstvenih odnosa između jedinki paklara ulovljenih na području dunavskog slijeva Republike Hrvatske napravila sam filogenetsku rekonstrukciju koristeći sljedeće metode: metodu najveće parsimonije (MP), metodu najveće vjerojatnosti (ML) i metodu susjednog povezivanja (MJ). Prve dvije metode za rezultat daju filogenetska stabla, a metoda susjednog povezivanja (MJ) daje filogenetsku mrežu.

MP i ML analize provodila sam pomoću programa PAUP 4.0b10 (Swofford 2002). Sve MP i ML analize provodila sam pod heurističkim modelom uz 100 ponavljanja, a redosljed unošenja taksa bio je nasumičan. Svi kodoni i sve nukleotidne supstitucije imale su jednaku težinu. Podržanost grananja utvrdila sam analizom samopodržanja (eng. Bootstrap analysis – BS) uz 1000 BS ponavljanja za MP analize, a kod ML analiza sam podržanost grananja utvrdila analizom samopodržanja uz 200 ponavljanja. Uz haplotipove kao ulazne sekvence za izradu filogenetskih stabala i mreže koristila sam i sekvence paklara iz Banke gena (**Tablica 5 i 6**). Sekvence paklara iz Banke gena isključivo su s europskih lokaliteta, a koristila sam ih radi dobivanja jasnijeg uvida u filogenetski položaj paklara s proučavanog područja u odnosu na europske srodnike.

Filogenetsku mrežu izradila sam metodom susjednog sparivanja (MJ) pomoću računalnog programa Network 4.5.1.6. (Fluxus Technology Ltd.) koristeći haplotipove dobivene pomoću programa DnaSP 5.10. (Librado i Rozas 2009) i sekvence iz Banke gena (Tablica 5 i 6).

**Tablica 5.** Sekvence paklara iz Banke gena (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) koje su uključene u filogenetsku rekonstrukciju na temelju *cyt b* gena

ime sekvence	pristupni kod	referenca	lokalitet
Eudontomyzon danfordi	GQ206158.1	Lang i sur. 2009	Slovačka (rijeka Zdychava )
Eudontomyzon mariae	GQ206162.1	Lang i sur. 2009	Ukrajina (rijeka Ivianka)
Eudontomyzon stankokaramani	GQ206189.1	Lang i sur. 2009	Crna Gora (rijeka Zeta)
Eudontomyzon vladykovi	GQ206161.1	Lang i sur. 2009	Slovačka (potok Studenec)
Lampetra fluviatilis	NC001131.1	Delarbre i sur. 2000	Francuska (Estuarij Garonne)
Eudontomyzon lanceolata	GQ206176.1	Lang i sur. 2009	Rusija (rijeka Chakhtsutsyr)
Lampetra planeri	GQ206149.1	Lang i sur. 2009	Njemačka (Kalte Moldau)
Lethenteron zanandreaei	GQ206184.1	Lang i sur. 2009	Slovenija (Vipava)
Eudontomyzon stankokaramani	KX787432.1	Fox 2016	Slovenija
Eudontomyzon lanceolata	KX787431.1	Fox 2016	Turska
Eudontomyzon sp. Dnieper	KP135487.1	Levin i sur. 2014	Rusija (rijeka Ugra)
Eudontomyzon sp. Dnieper	KP135483.1	Levin i sur. 2014	Rusija (rijeka Rudyanka)

Eudontomyzon sp. Dnieper	KP135485.1	Levin i sur. 2014	Rusija (rijeka Sigosa)
Eudontomyzon sp. Dnieper	KP135482.1	Levin i sur. 2014	Rusija (rijeka Vyazma)
Eudontomyzon hellenicus	GQ206160.1	Lang i sur. 2009	Grčka (rijeka Strymon)
Lampetra fluviatilis	GQ206175.1	Lang i sur. 2009	Rusija (rijeka Luga)

**Tablica 6.** Sekvence paklara iz Banke gena (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) koje su uključene u filogenetsku rekonstrukciju na temelju COI gena

Ime sekvence	Pristupni kod	referenca	lokalitet
Eudontomyzon sp.	HQ955752	International Barcode of Life (iBOL)	Njemačka
Eudontomyzon lanceolata	JN026955	April i sur. 2011	Turska (potok Iyidere)
Eudontomyzon stankokaramani	JN026607	April i sur. 2011	Crna Gora (rijeka Zeta)
Eudontomyzon hellenicus	JN026602	April i sur. 2011	Grčka (rijeka Louros)
Lampetra planeri	MF544130	Arsenato i sur. 2018	Francuska (rijeka Tet)
Lampetra sp.	MF040891	Tutman i sur. 2017	Njemačka (rijeka Dunav)
Lampetra planeri	MF040890	Tutman i sur. 2017	Češka (rijeka Vltava)
Lampetra fluviatilis	MF040889	Tutman i sur. 2017	Rusija (rijeka Neva)

### 3.5. Analize molekularne dijagnostike

Za određivanje razlika između linija paklara na razini nukleotida provela sam četiri analize pomoću programa SITES (Hey 2002) i MEGA 6.06 (Tamura i sur. 2007). Haplotipovi dobiveni pomoću programa DnaSP 5.10. (Librado i Rozas 2009) koristili su mi kao ulazni podaci prilikom određivanja dijagnostičkih mjesta (određene baze na određenom nukleotidnom mjestu), p-udaljenosti (postotak udaljenosti između linija), fiksnih razlika (razlike u nukleotidima između linija) i dijeljenih polimorfizama (mutacije baza koje su se dogodile prije nego su se linije granale).

### 3.6. Genska raznolikost i genska različitost

Gensku raznolikost unutar svih linija i vrsta procjenjivala sam tako da sam odredila mjere DNK polimorfizama sekvenci pomoću programa DnaSP 5.10. (Librado i Rozas 2009). Mjere koje sam odredila su:

- Broj haplotipova ( $h$ )
- Broj polimorfnih mjesta ( $S$ )
- Raznolikost haplotipova ( $Hd$ )
- Prosječan broj razlika nukleotida ( $k$ )
- Nukleotidna raznolikost ( $\pi$ )
- Ukupan broj mutacija ( $\eta$ )

Uz određene mjere DNK polimorfizama, izradila sam i statističke testove genske različitosti ( $\chi^2$ ,  $Hst$ ,  $Kst$ ,  $Kst^*$ ,  $Z$ ,  $Z^*$  i  $Snn$ ) linija i njihovu podržanost kako bi dobila uvid u protok gena i u gensku uniformnost linija. Kao ulazne podatke za statističke testove genske raznolikosti koristila sam sekvence dobivene iz uloveljnih jedinki paklara. Za dobivanje dodatnih informacija o protoku gena izračunala pomoću programa DnaSP 5.10. (Librado i Rozas 2009) i broj migranata po generaciji koji također za ulazne podatke koristi sekvence.

Za razlikovanje između i unutar linija napravila sam permutacijske testove kojima sam došla do p- vrijednosti koje daju uvid o genskoj raznolikosti s obzirom na razlike nukleotida unutar sekvenci.

## 4. REZULTATI

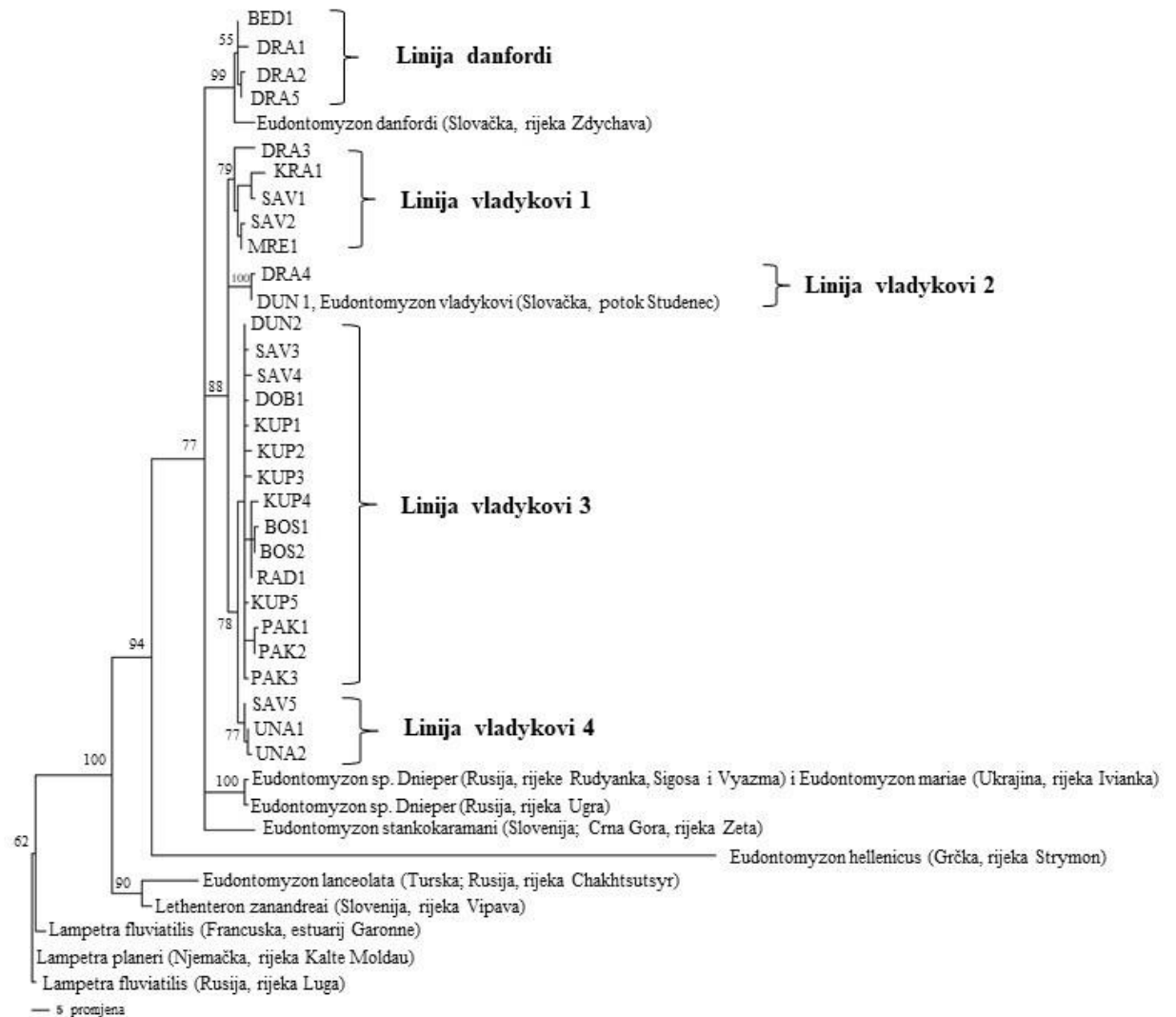
### 4.1. Filogenetski položaj vrsta unutar porodice Petromyzontidae

Filogenetska rekonstrukcija porodice Petromyzontidae na području dunavskog slijeva Hrvatske temeljena je na sekvencama gena za citokrom *b* (*cyt b*) i gena za citokrom oksidazu (COI) ulovljenih paklara te su korištene još neke sekvence iz banke gena (**Tablica 5 i Tablica 6**). Ulazni podaci za dobivanje filogenetskih stabala temeljenih na genu za *cyt b* bile su sekvence duge 1191 parova baza, a od tih 1191 parova baza, 1123 su konstantna mjesta, a varijabilnih mjesta je 68. Parsimonijski značajnih mjesta (mjesta koja imaju bar dva nukleotida koja se pojavljuju bar dva puta) je 46, a ostala 22 varijabilna mjesta nisu nositelji filogenetskog signala. Analize su provedene na 103 sekvence paklara iz jedinki ulovljenih na navedenom području. Uz te 103 sekvence u analizama su radi točnijeg pozicioniranja vrsta s istraživanog područja, uključene još i sekvence iz Banke gena isključivo s područja Europe (**Tablica 5**). U ukupnom uzorku utvrđeno je 29 haplotipova koji su se grupirali u pet odvojenih linija. Dobivena stabla (**Slika 9 i Slika 10**) pokazuju jednaku topologiju te su se haplotipovi grupirali na isti način. Unutar linije danfordi se skupa s haplotipovima s lokaliteta na Bednji i Dravi grupirala i sekvenca iz Slovačke, koja pripada jedinici determiniranoj kao *Eudontomyzon danfordi*, zbog čega je linija nazvana danfordi. S obzirom da se skupa s ostalim haplotipovima koji tvore linije vladykovi grupirala sekvenca iz Banke gena *Eudontomyzon vladykovi*, po istom principu te linije dobivaju naziv vladykovi. Linija danfordi zapravo predstavlja vrstu *E. danfordi*, čija je prisutnost u Hrvatskoj neočekivana, dok izrazita strukturiranost vrste *E. vladykovi* (prisutne su čak četiri linije unutar ove vrste) naglašava taksonomsku problematiku roda *Eudontomyzon*. Filogenetska mreža dobivena metodom susjednog povezivanja (MJ) pokazuje odvajanje vrsta i linija unutar vrsta za sekvence haplotipova temeljenih na genu za *cyt b*.

Ulazni podaci za dobivanje filogenetskih stabala temeljenih na genu za COI bile su sekvence duge 392 parova baza, od kojih je 337 konstantnih, a 55 varijabilnih. Parsimonijski značajnih mjesta je 26, a ostalih 29 varijabilnih mjesta nisu nositelji filogenetskog signala. Analize su provedene na 94 sekvence s proučavanog područja te su uz njih uključene još i sekvence iz Banke gena radi dobivanja točnijih podataka i preciznije pozicioniranja vrsta. U ukupnom uzorku utvrđeno je 35 haplotipova, međutim na dobivenim stablima (**Slika 12 i Slika 13**) vidimo da haplotipove nije bilo moguće grupirati u odvojene linije, već je prisutna meka politomija. Iz tog razloga su daljnje analize genske raznolikosti i genske različitosti te analize molekularne dijagnostike provedene samo na sekvencama gena za *cyt b*.



Osnovni podaci o filogenetskim stablima dobivenim metodom najveće parsimonije (MP) nalaze se u **Tablici 7** i **Tablici 8**



**Slika 9.** Filogenetsko stablo dobiveno metodom najveće parsimonije (MP) na temelju *cyt b* gena; brojevi pored grananja označavaju podržanost u postocima. Haplotipovi dobiveni ovim istraživanjem grupirali su se u pet linija koje su označene vitičastim zagradama.

**Tablica 7.** Podaci o filogenetskom stablu prikazanom na **Slici 9**

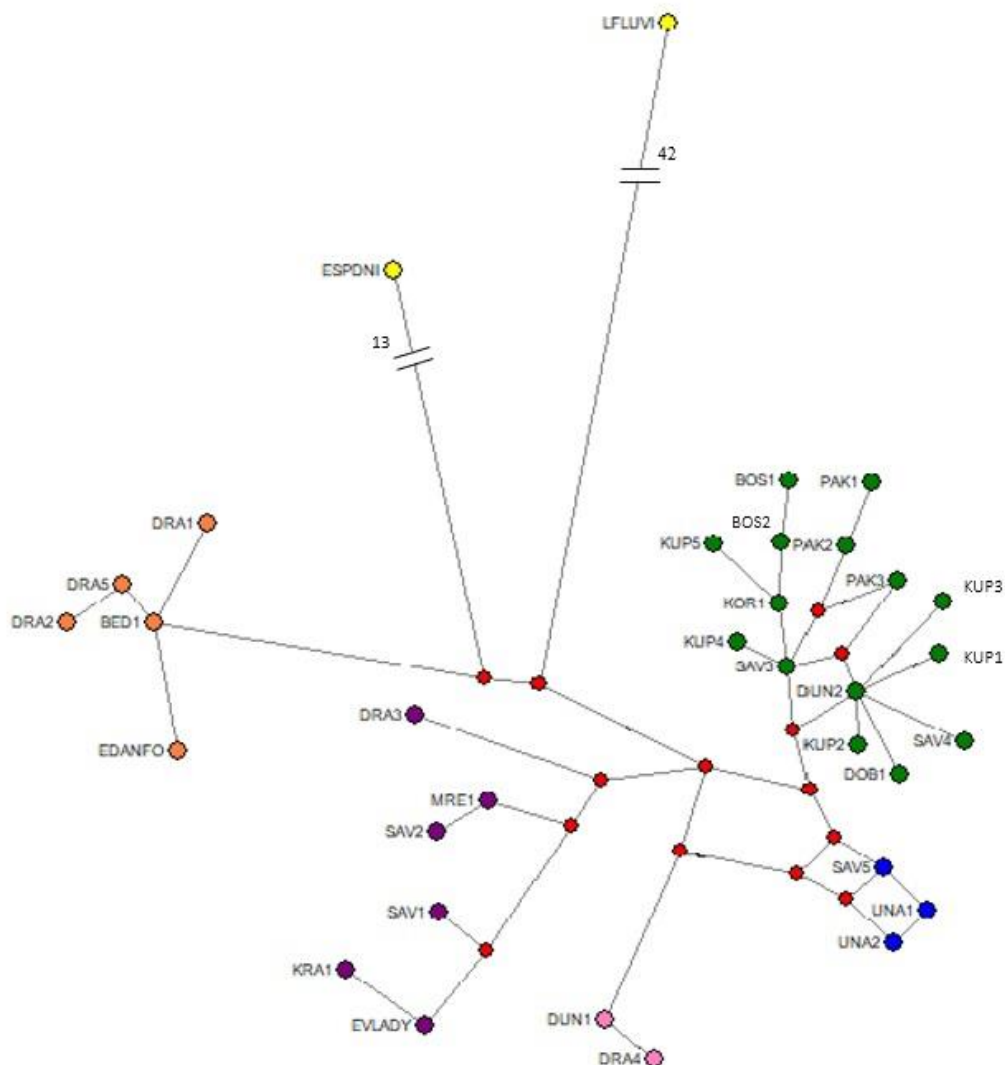
<b>Duljina stabla</b>	370
<b>Indeks konzistencije (CI)</b>	0,7486
<b>Indeks homoplazije (HI)</b>	0,2514

CI bez neinformativnih mjesta	0,5811
HI bez neinformativnih mjesta	0,4189
Indeks retencije	0,7956
Indeks reskalirane konzistencije (RC)	0,5956



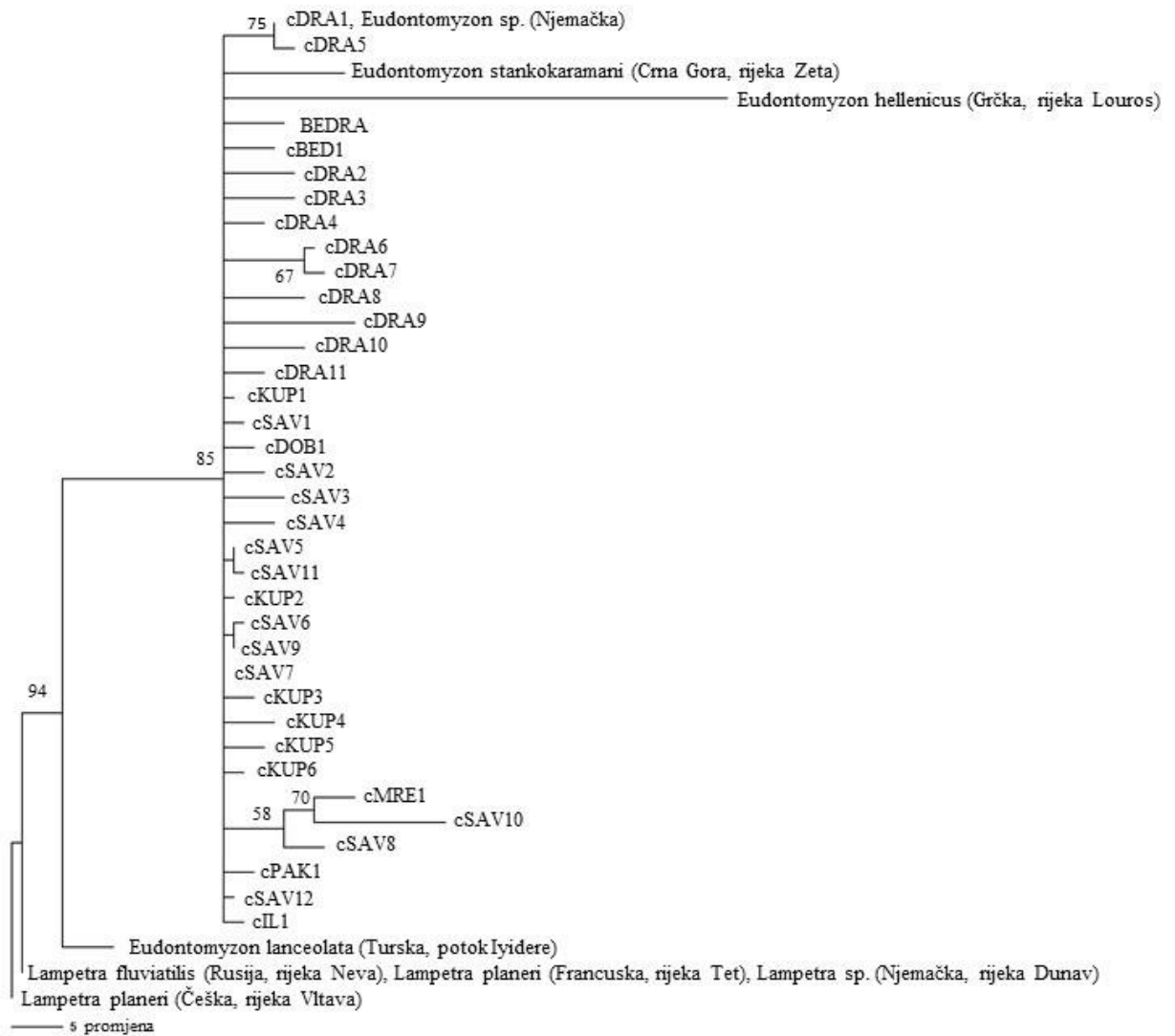
**Slika 10.** Filogenetsko stablo dobiveno metodom najveće vjerojatnosti (ML) na temelju cyt *b* gena; brojevi pored grananja označavaju podržanost u postocima. Haplotipovi dobiveni ovim istraživanjem grupirali su se u pet linija koje su označene vitičastim zagradama.

Jedinke iz linije vladykovi 2 ulovljene su na četiri lokaliteta: Štorgač (Drava, lokalitet 11 na **Slici 8**), Repaški most (Drava, lokalitet 12 na **Slici 8**), Goričan (Mura, lokalitet 36 na **Slici 8**) i Batina (Dunav, lokalitet 35 na **Slici 8**).



**Slika 11.** Filogenetska mreža dobivena metodom susjednog povezivanja (MJ), različitim bojama su označene različite linije: narančasto – linija danfordi, ljubičasto – linija vladykovi 1, ružičasto – linija vladykovi 2, zeleno – linija vladykovi 3, plavo – linija vladykovi 4. Duljine linija proporcionalne su broju mutacija, a crvene točke označavaju haplotipove koji nisu primijećeni u ovom istraživanju. Žutom bojom označene su sekvence iz Banke gena (*Lampetra fluviatilis* i *E.sp. Dnieper*). Brojevi 13 i 42 označavaju broj mutacija koji se dogodio između haplotipova.

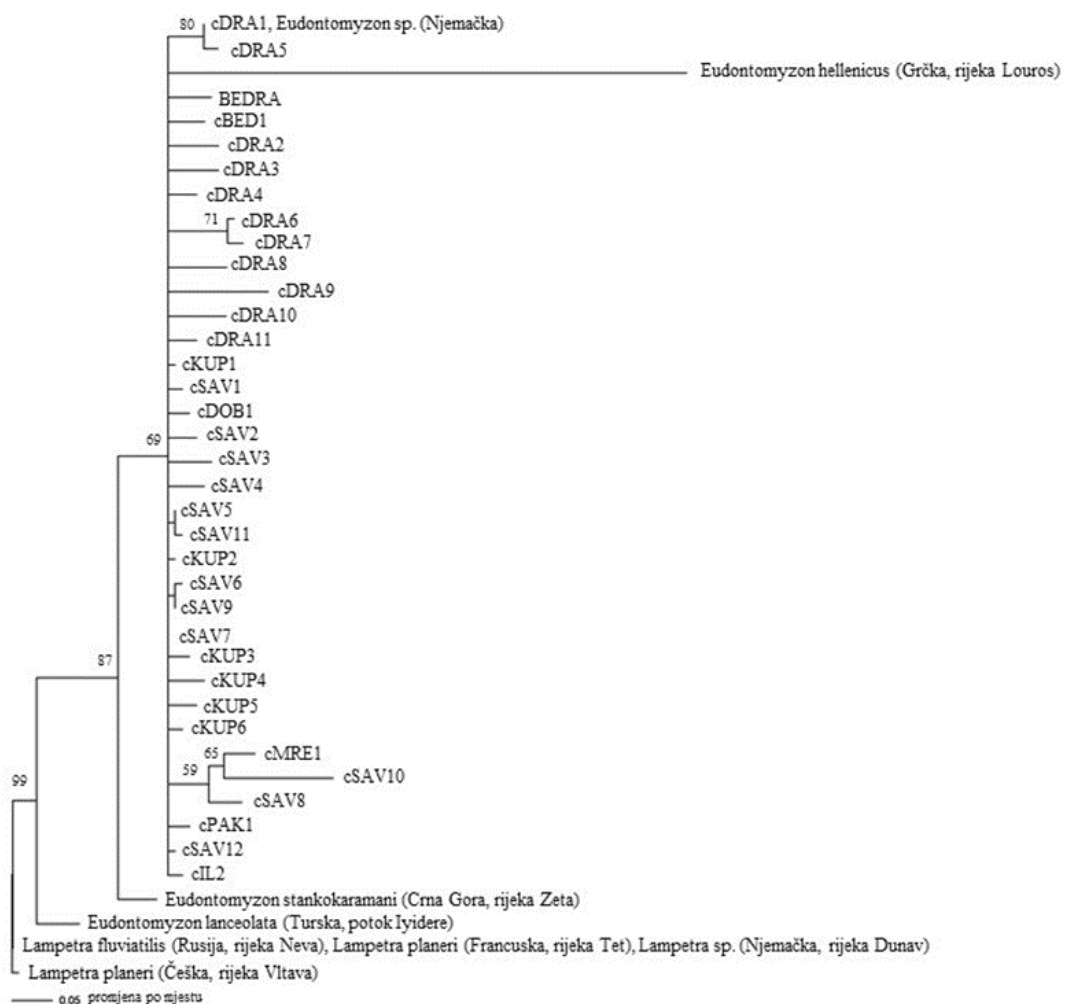
Treba uočiti kako se na filogenetskim stablima dobivenima na temelju *cyt b* gena, sekvenca iz Banke gena determinirana kao *Lethenteron zanandreaei* grupira skupa sa sekvencama *Eudontomyzon lanceolata* što ostavlja mogućnost da je vrsta *Eudontomyzon lanceolata* svrstana u krivi rod.



**Slika 12.** Filogenetsko stablo dobiveno metodom najjeće parsimonije (MP) na temelju COI gena; brojevi pored grananja označavaju podržanost u postocima.

**Tablica 8.** Podaci o filogenetskom stablu na **Slici 11**

<b>Duljina stabla</b>	163
<b>Indeks konzistencije (CI)</b>	0,6994
<b>Indeks homoplazije (HI)</b>	0,3006
<b>CI bez neinformativnih mjesta</b>	0,5196
<b>HI bez neinformativnih mjesta</b>	0,4804
<b>Indeks retencije</b>	0,7461
<b>Indeks reskalirane konzistencije (RC)</b>	0,5218



**Slika 13.** Filogenetsko stablo dobiveno metodom najveće vjerojatnosti (ML) na temelju COI gena; brojevi pored grananja označavaju podržanost u postocima.

## 4.2. Genska raznolikost i genska različitost utvrđenih vrsta i filogenetskih linija

**Tablica 9.** Mjere genskog polimorfizma vrsta i linija paklara dunavskog slijeva Hrvatske na temelju cyt *b* gena. N – broj sekvenci, h – broj haplotipova, S – broj polimorfnih mjesta, Hd – raznolikost haplotipova, k – prosječan broj razlika nukleotida,  $\pi$ - nukleotidna raznolikost,  $\eta$ - ukupan broj mutacija

vrsta/linija	N	h	S	Hd	k	$\pi$	$\eta$
<i>E. danfordi</i>	15	5	6	0,752	1,524	0,00128	6
<i>E. vladykovi</i>	88	30	53	0,895	7,158	0,00601	54
vladykovi 1	16	5	19	0,667	6,983	0,00586	19
vladykovi 2	4	2	1	0,5	0,5	0,00042	1
vladykovi 3	59	20	23	0,8	2,414	0,00203	23
vladykovi 4	9	3	2	0,556	0,722	0,00061	2
Sve sekvence skupa	103	35	72	0,919	11,485	0,00964	73

Gledajući cjelokupan uzorak (**Tablica 9**) možemo reći da je genska raznolikost vrsta/linija umjerena do visoka. Utvrđen je veliki broj haplotipova, ali i njihova velika raznolikost. Nadalje, prosječan broj razlika nukleotida za vrstu *Eutontomyzon vladykovi* i liniju vladykovi 1 je izrazito visok što upućuje na dublju strukturiranost i na mogućnost da se ovdje ne radi o samo jednoj vrsti.

Početna hipoteza kod provedbe statističkih testova genske različitosti ( $\chi^2$ , Hst, Kst, Kst\*, Z, Z\* i Snn) i njihove podržanosti bila je da nema genske različitosti između dva seta podataka koje uspoređujem. S obzirom na to da su dobivene p vrijednosti za sve statističke testove bile manje od 0,05 početna hipoteza se odbacuje te zaključujem kako genska različitost između svaka dva uspoređivana seta podataka postoji.

## 4.3. Analize molekularne dijagnostike dobivenih linija paklara

**Tablica 10.** Fiksne razlike na cyt *b* genu između linija.

VRSTA / LINIJA	vladykovi 1	vladykovi 2	vladykovi 3	vladykovi 4
<i>E. danfordi</i>	19	24	21	21
vladykovi 1	-	9	6	6
vladykovi 2	-	-	12	10
vladykovi 3	-	-	-	3

Više fiksnih razlika (**Tablica 10**) znači da su se vrste/linije ranije razdvojile i ukazuju na veliku gensku razliku između vrsta/linija. Očekivano, najviše fiksnih razlika primijećeno je između vrste *E. danfordi* i filogenetskih linija vrste *E. vladykovi*. Međutim, fiksne su razlike

prisutne i između svih filogenetskih linija vrste *E. vladykovi*. Tablica dijagnostičkih mjesta (**Tablica 11**) prikazuje o kojim se točno mjestima radi.

**Tablica 11.** Fiksne razlike na cyt *b* genu s navedenim nukleotidnim mjestima fiksnih razlika i bazama prisutnim kod pojedine linije. Dijagnostička mjesta za pojedinu liniju predstavljaju nukleotidi u ljubičastim poljima.

NUKLEOTIDNO MJESTO	VRSTA / LINIJA				
	<i>E. danfordi</i>	vladykovi 1	vladykovi 2	vladykovi 3	vladykovi 4
36	T	C	C	C	C
57	C	T	T	T	T
72	C	T	T	T	T
156	G	A	A	A	A
157	C	T	T	T	T
162	T	C	C	C	C
312	A	G	A	A	A
378	A	A	G	A	A
390	T	T	C	T	T
480	A	G	G	G	G
483	A	G	G	G	G
531	C	C	C	C	T
588	A	A	G	A	A
630	T	T	C	T	T
639	G	A	A	A	A
675	T	C	C	C	C
726	C	T	T	T	T
771	A	C	C	C	C
807	G	A	G	G	G
813	C	C	C	T	C
909	G	A	A	A	A
1155	G	G	A	G	G

**Tablica 12.** Dijeljeni polimorfizmi na cyt *b* genu između linija

VRSTA / LINIJA	vladykovi 1	vladykovi 2	vladykovi 3	vladykovi 4
<i>E. danfordi</i>	0	0	1	0
vladykovi 1	-	0	3	0
vladykovi 2	-	-	1	0
vladykovi 3	-	-	-	0

Iz **Tablice 12** vidimo da dijeljenih polimorfizama ima vrlo malo. U slučaju kad bi ih bilo više to bi nam ukazivalo na sestrinski položaj vrsta/linija, ali s obzirom na to da ovdje to

nije slučaj to čini ovaj rezultat još jednim u nizu koji potvrđuje ostale rezultate i nužnost taksonomske revizije paklara u dunavskom slijevu Hrvatske.

#### 4.4. Intraspecijska struktura linija

**Tablica 13.** Procjena broja migranata po generaciji između linija paklara dunavskog slijeva Hrvatske prema Nei 1873, Nei 1982, Lynch i Crease 1990 i Hudson, Slatkin i Maddison 1992.

VRSTA / LINIJE	Nm (Nei 1973)	Nm (Nei 1982)	Nm (Lynch i Crease 1990)	Nm (Hudson i sur. 1992)
<i>E. danfordi</i> : <i>E. vladykovi</i>	8,34	0,61	0,1	0,11
vladykovi1:vladykovi2	2,1	0,67	0,15	0,15
vladykovi1:vladykovi3	4,08	0,53	0,26	0,26
vladykovi1:vladykovi4	1,73	0,51	0,21	0,21
vladykovi2:vladykovi3	4,8	0,74	0,6	0,6
vladykovi2:vladykovi4	1,29	0,06	0,03	0,03
vladykovi3:vladykovi4	4,4	1,19	0,2	0,2

Iz Tablice 13 vidi se da protoka gena između vrsta i linija nema što nam ukazuje kako se jedinke unutar iste vrste, ali iz različitih linija ne razmnožavaju. Jedini rezultat koji odskaka od ostatka je Nm = 8,34 (prema Nei-u 1973) za *E.danfordi:vladykovi*, ali treba naglasiti da je to manje osjetljiv test od ostalih, a ni ta vrijednost nije visoka.

#### 4.5. Genska udaljenost između i unutar linija

P – vrijednosti dobivene permutacijskim testovima statistički su značajne što potvrđuje da se vrsta *E. danfordi* i linije unutar vrste *E. vladykovi* genski razlikuju. U **Tablici 14** iznad dijagonale vidimo izražene srednje vrijednosti p - udaljenosti, a ispod dijagonale su iste vrijednosti izražene preko minimalne i maksimalne vrijednosti p – udaljenosti.

U **Tablici 15** također vidimo srednje vrijednosti p – udaljenosti te njihove minimume (min) i maksimume (max), ali u ovom slučaju te vrijednosti se odnose za svaku vrstu/liniju zasebno, dok su u **Tablici 14** rezultati p – vrijednosti rezultat međusobnog uspoređivanja svih nukleotida svake sekvence sa svakom sekvencom za određena dva seta podataka.



**Tablica 14. P– vrijednost između linija (izražene u postocima)**

<b>VRSTA / LINIJA</b>	<i>E. danfordi</i>	<b>vladykovi 1</b>	<b>vladykovi 2</b>	<b>vladykovi 3</b>	<b>vladykovi 4</b>
<i>E. danfordi</i>		2,2	2,17	2,14	1,98
<b>vladykovi 1</b>	1,84 - 2,68		1,31	1,18	1,10
<b>vladykovi 2</b>	2,01 - 2,35	1,09 - 1,51		1,25	0,99
<b>vladykovi 3</b>	1,93 - 2,35	0,83 - 1,59	1,09 - 1,42		0,56
<b>vladykovi 4</b>	1,84 - 2,09	0,83 - 1,34	0,92 - 1,09	0,33 - 0,75	

**Tablica 15. P – vrijednost unutar linija (izražene u postocima)**

<b>VRSTA / LINIJA</b>	<b>p – udaljenost srednja vrijednost</b>	<b>p – udaljenost (min i max)</b>
<i>E. danfordi</i>	0,2	0,08 - 0,41
<b>vladykovi 1</b>	0,7	0,08 – 1,25
<b>vladykovi 2</b>	0,1	/
<b>vladykovi 3</b>	0,3	0,08 – 0,58
<b>vladykovi 4</b>	0,1	0,08 – 0,16

## 5. RASPRAVA

Dobiveni rezultati i proučavanje literature bacaju novo svjetlo na taksonomiju porodice Petromyzontidae na području dunavskog slijeva Hrvatske. Usporedbom popisa vrsta iz Crvene knjige slatkovodne ihtiofaune iz 2006. godine (Mrakovčić i sur. 2006) i popisa prisutnih vrsta ihtiofaune iz 2019. godine (Ćaleta i sur. 2019) u Hrvatskoj vidimo koliko pri stvaranju takvih popisa nedostaje podloga koja uključuje analize na molekularnoj razini koje bi potvrdile stvarnu prisutnost navedenih vrsta. Dobivena filogenetska stabla temeljena na *cyt b* genu (MP i ML stablo imaju istu topologiju) jasno pokazuju odvajanje dvije vrste: *E. danfordi* i *E. vladykovi*. Ovaj rezultat dokaz je prisutnosti vrste *E. danfordi* na području Hrvatske iako je prema popisu vrsta iz 2019. godine na području dunavskog slijeva zabilježena samo jedna vrsta paklare – *E. vladykovi*. Jedinke čiji se haplotipovi odvajaju kao vrsta *E. danfordi* ulovljene su na sljedećim lokalitetima: Bednja, Voća i Ivanečka Željeznica (lokaliteti na području rijeke Bednje), na lokalitetima rijeke Drave u blizini Osijeka (Osijek i Petrijevcu) i na izoliranom lokalitetu Voćinske rijeke (**Slika 8**). Stoga možemo zaključiti kako i vrsta *E. danfordi* nastanjuje hrvatske vodotoke i to porječje Drave. Općenito vrsta *E. danfordi* nastanjuje područje dunavskog slijeva Rumunjske (rijeka Tamiš), Slovačke, Mađarske (rijeka Tisa) i Ukrajine (Kottelat i Freyhof 2007) što su sve područja sjeveroistočno od lokaliteta na kojima je kod nas zabilježena, pa možemo pretpostaviti da su jedinice mogle migrirati nizvodno iz npr. vodotokova Slovačke i Mađarske kroz povijest. IUCN-ova lista ugroženih vrsta iz 2008. kao područje gdje obitava *E. danfordi* navodi još Srbiju i Poljsku, a postoje indicije i da je naseljavala neka rijeke u Austriji, konkretno rijeku Inn, međutim u vrijeme kada je uzorkovana pogrešno ju se determiniralo kao vrstu *Lampetra planeri* ili *Lampetra fluviatilis* (Zanandrea 1959). Zanimljivo je da je 2017. godine vrsta *E. danfordi* zabilježena i u Bosni i Hercegovini (Tutman i sur. 2020) i to u rijeci Savi (granica Hrvatske i Bosne i Hercegovine), a to je područje na kojem se prema Mrakovčić i sur. 2006. ova vrsta i povijesno pojavljivala. Također treba naglasiti da jedinice nađene u Savi nisu adultnog stadija (Tutman i sur. 2020). Bez da znamo za rasprostranjenost *E. danfordi* po ostalim europskim vodotocima možda bi se izvodio zaključak o potencijalnim povijesnim i/ili glacijalnim migracijama koje bi objasnile prisutnost ove vrste samo u rijeci Dravi i njenim pritocima. Bez podataka o rasprostranjenosti mogli su se izvoditi i detaljniji zaključci o razlikama između tipova staništa u Savi i Dravi. Međutim, s obzirom na to da je relativno nedavno nađena i u rijeci Savi (Tutman i sur. 2020), taj nalaz upućuje na njenu prisutnost i u Savinim pritocima što nam upućuje na potrebu za daljnjim terenskim istraživanjem kako bismo saznali točnije gdje sve obitava vrsta *E. danfordi* u Hrvatskoj.

Gledajući već prije spomenuta filogenetska stabla možemo unutar vrste *E. vladkovi* razaznati četiri odvojene linije. Općenito ovakva velika strukturiranost unutar jedne vrste ukazuje na potrebe daljnjeg istraživanja ove vrste, a u prilog nužnosti sistematskog istraživanja vrste *E. vladkovi* govore i ostali dobiveni rezultati. Treba uzeti u obzir da su ovi rezultati dobiveni na temelju jednog genskog markera. Filogenetska stabla dobivena na temelju gena za citokrom oksidazu (COI) nažalost ne daju rezultate koji se poklapaju s rezultatima koje dobivamo filogenetskom rekonstrukcijom na temelju gena za *cyt b*, već kod njih dobivamo politomiju. Gen za citokrom oksidazu (COI) korišten je kao genski marker zbog njegovog učestalog korištenja u barkodiranju pa je pretpostavka bila da će dati najbolje rezultate. Nadalje gen za citokrom oksidazu (COI) korišten je i pri opisivanju *Lampetre soljani* kao nove vrste paklare koja obitava u donjem dijelu toka Neretve (Tutman i sur. 2017). Sekvence gena za citokrom oksidazu koje su korištene u ovom istraživanju nešto su kraće nego što bi potencijalno mogle biti (392 pb), a možda za paklare roda *Eudontomyzon* to jednostavno nije najbolji izbor genskog markera što ne znači da rezultati temeljeni na nekom drugom genskom markeru ne bi potvrdili rezultate filogenetske rekonstrukcije dobivene ovim istraživanjem temeljenim na genu za *cyt b*. S obzirom na dobivenu politomiju pri filogenetskoj rekonstrukciji temeljenoj na genu za citokrom oksidazu, daljnje analize provedene su samo na temelju gena za *cyt b*. Filogenetska mreža dobivena metodom susjednog povezivanja potvrđuje rezultate vidljive iz filogenetskih stabala te jasno prikazuje odvajanje vrsta i linija unutar vrsta. Provedene analize za gensku raznolikost i gensku različitost ukazuju na potrebu za sistematskom i taksonomskom revizijom vrste *E. vladkovi* na području Hrvatske. Veliki broj haplotipova (h) i velika raznolikost haplotipova (Hd) uz ostale parametre navedene u **Tablici 9** govore nam o umjerenoj do visokoj genskoj raznolikosti unutar svake vrste/linije. Treba uočiti da je *k* (prosječan broj razlika nukleotida) veći kod uzoraka vrste *E. vladkovi* što ukazuje na dublju strukturiranost. Kada gledamo cjelokupni uzorak raznolikost je umjerena do visoka što je stvarno posebno jer ako uzmemo u obzir ekologiju i ponašanje paklara vjerojatno se radi o malim populacijama koje žive na skrovitim mjestima, ali unatoč tome populacije su im stabilne gledajući gensku raznolikost na molekularnoj razini. Primjeri populacija paklara koje imaju veliku i drugačiju gensku raznolikost koju treba sačuvati nalazimo i na lokalitetima u Italiji, Irskoj i Španjolskoj (De Cahsan i sur. 2020). Ovakvi rezultati čak i ne čude s obzirom na to da novija istraživanja ribljih populacija na području dunavskog slijeva Hrvatske otkrivaju veliku strukturiranost i visoku raznolikost određenih vrsta riba (Buj i sur. 2014, Raguž i sur. 2021). Analize molekularne dijagnostike također daju rezultate koji prate prethodno dobivene rezultate. Velik broj fiksnih razlika i dijagnostički mjesta ukazuju na ranije odvajanje vrsta, ali i na odvajanje

linija. S obzirom na to da svaka linija ima barem jedno dijagnostičko mjesto možemo govoriti o jasnoj odvojenosti na razini nukleotida. Kada gledamo broj dijagnostičkih mjesta između vrsta *E. danfordi* i *E. vladykovi* vidimo da ih je mnogo što nam indicira da su se te dvije vrste odvojile davno. Gledajući broj dijagnostičkih mjesta između linija vladykovi vidimo da je takvih mjesta manje, što znači da su se linije međusobno odvojile u ranijoj prošlosti. Posebno je zanimljiva linija vladykovi 2 koja sadrži samo dva različita haplotipa, ali čak pet dijagnostičkih mjesta. Od četiri lokaliteta na kojima su ulovljene jedinke iz linije vladykovi 2 jedini koji malo odskače je Batina, jer se nalazi nizvodnije, ali to možda samo znači da je ova linija prisutna na cijelom potezu granice Hrvatska – Mađarska te da je na tom području kroz povijest bilo protoka gena koji bi doveo do genske raznolikosti koju uočavamo danas. Na području srednje Europe provedena su slična istraživanja koja su preko varijacija mitohondrijske DNA dolazila do objašnjenja evolucijske povijesti i potvrde postojanja zajedničkog pretka za paklare roda *Lampetra* (Caputo i sur. 2009). Što se tiče protoka gena, podaci iz **Tablice 13** jasno pokazuju kako protoka između linija nema što je zanimljivo jer ako pogledamo kartu lokaliteta (**Slika 8**) možemo vidjeti da se ne radi o nužno izoliranim lokalitetima koji između sebe imaju barijere koje bi spriječile reproduktivne migracije i samu migraciju. To nam govori da su populacije imale mogućnost biti u međusobnom kontaktu i da dođe do razmnožavanja, međutim to se nije dogodilo pa to možemo smatrati još jednim dokazom za postojanje više vrsta ili podvrsta vrste *E. vladykovi*. Da bismo saznali koliko dugo su linije unutar vrste vladykovi reproduktivno odvojene moramo napraviti analize vezane uz evolucijsku povijest koje će nam prikazati bar približno kada u prošlosti je došlo do odvajanja linija te će se na temelju te informacije lakše konstruirati daljnje hipoteze. Iako svi dobiveni rezultati podupiru jedni druge, potrebno ih je još utvrditi provedbom istih analiza, ali s drugim genskim markerom. To ne isključuje i ponavljanje analiza s genskim markerom za citokrom oksidazu (COI).

Svi navedeni rezultati zapravo stvaraju podlogu za daljnja istraživanja kojima bi se do kraja riješila taksonomska problematika vezana uz rodove i vrste porodice Petromyzontidae. Da bismo mogli opisati novu vrstu potrebno je još usporediti i proučiti morfologiju sve četiri linije utvrđene u filogenetskoj rekonstrukciji i potencijalno produbiti analize temeljene na mitohondrijskoj DNA (Tutman i sur. 2017). Uz morfologiju potrebno je proučiti i ponašanje i ekološku nišu koju pojedine populacije zauzimaju u ekosustavima u kojima obitavaju. Za bolji uvid u geografsku rasprostranjenost i odvojenost vrsta *E. danfordi* i *E. vladykovi* trebalo bi proučiti njihovu evolucijsku povijest (De Cahsan i sur. 2020) te bi nam rezultati tih analiza dali

neke odgovore pomoću kojih bi se mogla dobiti potpunija slika evolucije roda *Eudontomyzon* na području Hrvatske.

Kao najveći uzrok ugroženosti lokaliteta na kojima su ulovljene jedinke ističe se kanaliziranje vodotoka. Da bi se sačuvale ove populacije koje u sebi nose ovakvu razinu genske raznolikosti i tako pridonose bioraznolikosti Hrvatske i stabilnosti ekosustava potrebno je te lokalitete sačuvati, potencijalno zaštititi i spriječiti njihovu daljnju ugrozu; a nema razloga da se mjere zaštite ne počnu provoditi i prije nego se taksonomska problematika riješi. Lokaliteti koji se posebno ističu u ovom istraživanju kao posebni te kao lokaliteti koje treba sačuvati radi njihovog prirodnog bogatstva su lokaliteti na kojima obitavaju populacije linije danfordi, dakle područje rijeke Bednje te lokaliteti na kojima nalazimo liniju vladykovi 2, dakle područje Mure i ušća Mure u rijeku Dravu. Osim što se jedinke na ovim područjima ističu svojom genskom raznolikošću, na ovim lokalitetima je sveukupno ulovljeno najmanje jedinki što ukazuje na to da ovdje možda obitavaju manje populacije koje je zbog njihove veličine (koju zasad ne možemo procijeniti) lakše ugroziti za razliku od nekih populacija koje nalazimo u savskim pritocima. Također jedinke linije vladykovi 2 pokazuju kako bi populacije u kojima žive mogle biti ključne za razotkrivanje evolucijsku povijest vrste *E. vladykovi* na području Hrvatske.

## 6. ZAKLJUČCI

Iz provedenog istraživanja i svih dobivenih rezultat može se zaključiti slijedeće:

- Na području dunavskog slijeva Republike Hrvatske uz vrstu *Eudontomyzon vladykovi*, obitava i vrsta *Eudontomyzon danfordi*, ali potrebno je provesti dodatna terenska istraživanja za dobivanje točnije informacije o njenoj rasprostranjenosti u Hrvatskoj
- Za bolje razumijevanje evolucijske povijesti roda *Eudontomyzon* na području Hrvatske potrebno je provesti analize evolucijske prošlosti, ali utvrđena umjerena do visoka genska raznolikost ukazuje na dugotrajnu evolucijsku povijest paklara u ovim krajevima
- Duboka strukturiranost unutar vrste *Eudontomyzon vladykovi* uz sve dobivene parametre ukazuje na postojanje više vrsta ili podvrsta umjesto samo jedne na području Republike Hrvatske
- Dobiveni rezultati ukazuju na postojanje kriptičke raznolikosti paklara dunavskog slijeva te nužnost taksonomske revizije vrste *Eudontomyzon vladykovi* na području Republike Hrvatske (potencijalno i na širem području)
- S obzirom na to da uočavamo ovakvu veliku gensku raznolikost treba razmisliti o očuvanju i zaštiti područja na kojima ove vrste žive u svrhu očuvanja biološke raznolikosti, a po mogućnosti i predložiti konkretne mjere zaštite

## 7. LITERATURA

Avise, J.C. (1998): The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology* 7: 371–379.

Buj I. (2020): Raznolikost faune RH: Kralješnjaci. Interna skripta.

Buj I., Marčić Z., Čaleta M., Šanda R., Geiger M.F., Freyhof J. et al. (2017): Ancient connections among the European rivers and watersheds revealed from the evolutionary history of the genus *Telestes* (Actinopterygii; Cypriniformes). *PLoS ONE* 12 (12): e0187366.

Buj I., Šanda R., Marčić Z., Čaleta M., Mrakovčić M. (2014): Combining Morphology and Genetics in Resolving Taxonomy—A Systematic Revision of Spined Loaches (Genus *Cobitis*; Cypriniformes, Actinopterygii) in the Adriatic Watershed. *PLoS ONE* 9 (6): e99833.

Bermingham E., Moritz C. (1998): Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology* 7: 367–369.

Caputo V., Giovannotti M., Nisi Cerioni P., Splendiani A., Marconi M., Tagliavini J. (2009): Mitochondrial DNA variation of an isolated population of the Adriatic brook lamprey *Lampetra zanandreae* (Agnatha: Petromyzontidae): phylogeographic and phylogenetic inferences. *Journal of Fish Biology* 96 (4): 905–912.

Čaleta, M., Marčić, Z., Buj, I., Zanella, D., Mustafić, P., Duplić, A. i Horvatić, S. (2019): PREGLED POSTOJEĆIH HRVATSKIH SLATKOVODNIH RIBA I PAKLARA Popis i rasprostranjenost s komentarima. *Croatian Journal of Fisheries*, 77(3): 137–234.

De Cahsan B., Nagel R., Schedina I.M., King J.J., Bianco P.G., Tiedemann R., Ketmaier V. (2020): Phylogeography of the European brook lamprey (*Lampetra planeri*) and the European river lamprey (*Lampetra fluviatilis*) species pair based on mitochondrial data. *Journal of Fish Biology*, 1–8 (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfb.14279>).

Emerson B., Hewitt G. (2005): Phylogeography. *Current Biology* 15 (10): 367–371.

Forey P., Janvier P. (2000): Agnathans and the origin of jawed vertebrates. *Shaking the tree: readings from Nature in the history of life*. USA: University of Chicago Press. *Nature/Macmillan Magazines*: 251–266.

Gorbman A. (1997): Hagfish development. *Zoological Science*, 14(3): 375–390.

Hewitt, G.M. (2001): Speciation, hybrid zones and phylogeography or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology* 10: 537–549.

Hey J., Wakeley J. (1997): A coalescent estimator of the population recombination rate. *GENETICS* 145: 833–846.

Janvier, P. (2008): Early Jawless Vertebrates and Cyclostome Origins. *Zoological Science*. 25 (10): 1045–1056.

Keat-Chuan N. C., Aun-Chuan O. P., Wong W. L., Khoo G. (2017): A review of fish taxonomy conventions and species identification techniques. *Journal of Survey in Fisheries Sciences* 4 (1): 54–93.

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

Kuraku S., Kuratani S. (2006): Time scale for cyclostome evolution inferred with a phylogenetic diagnosis of hagfish and lamprey cDNA sequences. *Zoolog Sci* (23) :1053–1064.

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

Likens G. E. (2009): *Encyclopedia of Inland Waters*. Elsevier, Amsterdam.



Lipscomb D. (1998): Basics of Cladistic Analysis. George Washington University, Washington D.C.

Mrakovčić M., Brigić A., Buj I., Čaleta M., Mustafić P., Zanella D. (2006): Crvena knjiga slatkovodnih riba Hrvatske. Ministarstvo kulture, Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb.

Nakhleh L., Guohua J., Fengmei Z., Mellor-Crummey J. (2005): Reconstructing Phylogenetic Networks Using Maximum Parsimony. IEEE Computational Systems Bioinformatics Conference (CSB'05).

Nelson, J. S. (2006): Fishes of the World (4th edition.). New York: John Wiley and Sons, Inc. : 601

Norris D., Carr J. (2013): Vertebrate Endocrinology. Academic Press (5th edition).

Patwardhan A., Ray S., Roy A. (2014): Molecular Markers in Phylogenetic Studies – A Review. Journal of Phylogenetics and Evolutionary Biology 2: 131 doi:10.4172/2329-9002.1000131.

Pavlica M. (2012): Mrežni udžbenik iz genetike. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Udžbenici zagrebačkog sveučilišta, elektronička izdanja, I izdanje, Zagreb.

Pombal M. A i Megias M. (2019): Development and Functional Organization of the Cranial Nerves in Lampreys. The Anatomical Record (302): 512–539

Pough, F. H., Janis C.H, Heiser J.B. (2013): Vertebrate Life. Prentice Hall (9th edition): 1–69.

Posada D., Crandall K.A. (2001): Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. Trends in Ecology & Evolution 16 (1): 37–45.

Raguž L., Buj I., Marčić Z., Veble V., Ivić L., Zanella D., Horvatić S., Mustafić P., Čaleta M., Sabolić M.. (2021): First look into the evolutionary history, phylogeographic and

population genetic structure of the Danube barbel in Croatia. *Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst.* 422: 13.

Swofford D.L. (2002): PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods), Version 4 [Computer software and manual]. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. (2007): MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24 (8): 1596–1599.

Tutman P., Freyhof J., Dulčić J., Glamuzina B., Geiger M. (2017): *Lampetra soljani*, a new brook lamprey from the southern Adriatic Sea basin (Petromyzontiformes: Petromyzontidae). *Zootaxa* 4273 (4): 531–548.

Tutman P., Buj I., Čaleta M., Marčić Z., Hamzić A., Adrović A. (2020): Review of the lampreys (Petromyzontidae) in Bosnia and Herzegovina: a current status and geographic distribution. *Journal of Vertebrate Biology*, 69 (1): 1–13.

Young, J.Z. (1985): *The Life of Vertebrates*. Clarendon Press, Oxford (3rd edition): 76–109.

Zanandrea G. I. S. (1959): Recenti ricerche sulle forme appaiate di Lamprede dell'Italia e del Danubio. *Bolletino di zoologia* 26 (2): 545–554.

Zhang D.X., Hewitt G.M. (1996): Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends in Ecology & Evolution* 11 (6): 247–251.

Internetski izvori:

<https://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=16593>

pristupljeno: 8.4.2021

<https://www.ucl.ac.uk/museums-static/obl4he/vertebratediversity/lamphreys.html>

pristupljeno: 23.8.2021

## **8. ŽIVOTOPIS**

### **Osobni podaci**

Ime i prezime: Sara Pleše

Datum rođenja: 7. listopada 1996.

e-mail adresa: splese@stud.biol.pmf.hr

Nacionalnost: Hrvatica

Mjesto rođenja: Koprivnica

### **Obrazovanje**

2018.- DIPLOMSKI STUDIJ – Diplomski sveučilišni studij znanosti o okolišu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Horvatovac 102a, 100000 Zagreb

2015.-2018. PREDDIPLOMSKI STUDIJ – Preddiplomski sveučilišni studij znanosti o okolišu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Horvatovac 102a, 10000 Zagreb. Naziv teze: Ugroženost i zaštita vodozemaca u Republici Hrvatskoj.

2011.-2015. SREDNJA ŠKOLA – Opća gimnazija XI., Savska cesta 77, 10000 Zagreb

2003.-2011. OSNOVNA ŠKOLA – Osnovna škola Davorina Trstenjaka, Krčka ulica 3, 100000 Zagreb

### **Radno iskustvo**

2020./2021. – rad preko Student Servisa na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, Biološki odsjek (rad u laboratoriju), Prirodoslovno-matematički fakultet, Horvatovac 102a, 100000 Zagreb

2017. – 2019. demonstratura na Zoologijskom zavodu, kolegij Kralješnjaci

## **Profesionalna aktivnost**

2021. – moderator u sklopu radionice Mjere ublažavanja – mogućnosti i izazovi

2019. – moderator na završnoj dioničkoj radionici projekta Izrada prijedloga planova upravljanja strogo zaštićenim vrstama (s akcijskim planovima) za rod *Salmo*

2019./2020. – sudjelovanje u projektu U društvu mikroba (izrada prvog virtualnog muzeja mikroba Microseum te edukator na radionici u sklopu udruge Bioteka)

2019. – edukator na znanstveno-popularnoj manifestaciji Dan i noć na PMF-u u sklopu projekta U društvu mikroba

2019. – stručna laboratorijska praksa u laboratoriju za mikrobiologiju na Zavodu za mikrobiologiju

2018./2019. – član udruge BIUS, pisanje znanstveno-edukativnih članaka za časopis InVivo

2018. – speleološki pripravnik u Speleološkom odsjeku Hrvatskog planinarskog društva Željezničar

2018. – edukator na znanstveno-popularnoj manifestaciji Otvoreni dan kemije

2017. – edukator na znanstveno – popularnoj manifestaciji Otvoreni dan kemije

## **Volonterski rad**

2018/2019. – prepariranje kornjaša u Udruzi Hyla

## **Vještine**

- Rad na računalu (Windows, Office, Statistica, QGIS)
- Jezici: engleski (aktivno), njemački (pasivno)
- Vozačka dozvola za B kategoriju vozila