Filogenija najčešćih jadranskih riba hrskavičnjača (razred chondrichthyes) temeljena na strukturi citrokom oksidaze I

Benussi, Matteo

Undergraduate thesis / Završni rad

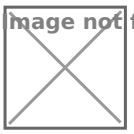
2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Pula / Sveučilište Jurja Dobrile u Puli**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:137:408638

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Digital Repository Juraj Dobrila University of Pula





Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

Odjel za prirodne i zdravstvene studije

MATTEO BENUSSI

FILOGENIJA NAJČEŠĆIH JADRANSKIH RIBA HRSKAVIČNJAČA (RAZRED CHONDRICHTHYES) TEMELJENA NA STRUKTURI CITOKROM OKSIDAZE I

Završni rad

Pula, rujan, 2017. godine

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

Odjel za prirodne i zdravstvene studije

MATTEO BENUSSI

FILOGENIJA NAJČEŠĆIH JADRANSKIH RIBA HRSKAVIČNJAČA (RAZRED CHONDRICHTHYES) TEMELJENA NA STRUKTURI CITOKROM OKSIDAZE I

Završni rad

JMBAG: 0303053795, redoviti student

Studijski smjer: Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru

Predmet: Genetika i evolucija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

Znanstvena grana: Genetika, evolucija i filogenija

Mentor: doc. dr. sc. Mauro Štifanić

Pula, rujan, 2017. godine

IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, dolje potpisani Matteo Benussi, kandidat za prvostupnika znanosti o moru ovime izjavljujem da je ovaj Završni rad rezultat isključivo mojega vlastitog rada, da se temelji na mojim istraživanjima te da se oslanja na objavljenu literaturu kao što to pokazuju korištene bilješke i bibliografija. Izjavljujem da niti jedan dio Završnog rada nije napisan na nedozvoljen način, odnosno da je prepisan iz kojega necitiranog rada, te da ikoji dio rada krši bilo čija autorska prava. Izjavljujem, također, da nijedan dio rada nije iskorišten za koji drugi rad pri bilo kojoj drugoj visokoškolskoj, znanstvenoj ili radnoj ustanovi.

Student: Matteo Benussi

_____

U Puli, _____, _____ godine

IZJAVA

o korištenju autorskog djela

Ja, Matteo Benussi, dajem odobrenje Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli, kao nositelju prava iskorištavanja, da moj završni rad pod nazivom „**Filogenija najčešćih jadranskih riba hrskavičnjača (razred Chondrichthyes) temeljena na strukturi citokrom oksidaze I**“ koristi na način da gore navedeno autorsko djelo, kao cjeloviti tekst trajno objavi u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli te kopira u javnu internetsku bazu završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice (stavljanje na raspolaganje javnosti), sve u skladu s Zakonom o autorskom pravu i drugim srodnim pravima i dobrom akademskom praksom, a radi promicanja otvorenoga, slobodnoga pristupa znanstvenim informacijama.

Za korištenje autorskog djela na gore navedeni način ne potražujem naknadu.

U Puli, _____ (datum)

Potpis

_____

Sadržaj

1. UVOD 1
1.1. Karakteristike Jadranskog mora 3
1.2. Temelji razumijevanja filogenije 4
1.2.1. Nastanak života i evolucija 5
1.2.2. Struktura i funkcija gena 9
1.2.3. Sistematika i taksonomija 11
1.3. Molekularna filogenija 13
1.3.1. Molekularni markeri 13
1.3.1.1. Citokrom oksidaza podjedinica I 14
1.3.2. Formiranje filogenetskog stabla 16
1.4 Ribe hrskavičnjače (razred Chondrichthyes) 22
1.4.1. Ugroženost hrskavičnih riba 23
1.4.2. Konzervacija riba hrskavičnjača 24
2. CILJ RADA 25
3. MATERIJALI I METODE 26
3.1. Odabir uzoraka 26
3.2. Filogenetska analiza 26
4. REZULTATI 28
4.1. Odabrani uzorci 28
4.2. Filogenetska procjena 29
5. RASPRAVA 31
6. ZAKLJUČAK 32
7. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA 33
8. BASIC DOCUMENTATION CARD 34
9. LITERATURA 35
PRILOZI 39

1. UVOD

Započeto jednostavnim promatranjem, opisom, prenošenjem savjeta i znanja usmenom predajom, čovjek se sa svojim posebnim načinom razmišljanja izdigao što nas je odvojilo od ostalih živih bića na Zemlji i napravilo superiornom vrstom. Razvoj poljoprivrede omogućio je i sam razvoj civilizacije što je zapravo prekretnica i prema ranim razvojem naprednije znanosti upravo zbog veće mogućnosti otkrivanja, dokazivanja i korištenje drugih složenijih metoda osim jednostavnog promatranja kao jedinom metodom kojom su se stjecala prva znanja. Stoga tisuće godina ljudskih dostignuća, izuma, ubrzanog gospodarskog razvitka potaknuto industrijalizacijama došlo se do suvremenog napretka tehnologije, a time i znanosti. Današnja tehnologija dozvolila nam je da sagledamo svijet iz drugačije perspektive i time mijenjamo stara razmišljanja zamijenjena novim, bolje potkrijepljenima.

U svakom znanstvenom istraživanju postoji vrijedan period otkrića velikih umova koji ne smiju biti zaboravljeni. Najznačajniji su početne točke nekog dijela znanosti poput Carl von Linné-a koji je zaslužan za temelje biološke sistematike ili kasnije Charles Darwin za postavljenje teorije o evoluciji živih bića ili otkriće fosila koji su uspjeli potkrijepiti teoriju evolucije, te Watson-ovo i Crick-ovo otkriće strukture DNA. Bilo da se radi o otkrićima iz fizike, kemije, biologije, geologije ili bilo kojeg drugog polja, ona su važna za rađanje i grananje novih područja znanosti, novih znanstvenih disciplina. Zato su prije spomenuta otkrića, uz ostala ne manje vrijedna, stvorila temelj za bolje razumijevanje ekologije, evolucije, genetike i odgovaraju na pitanja o prapovijesnim događanjima, nastanku organizama, podrijetlu vrsta, izumiranju vrsta, njihove međusobne povezanosti i odnosa. Na tim temeljima danas postoje znanja, sredstva i metode, poput poznavanja mitohondrijskog genoma i Citokrom oksidaze I (COI) gena u mitohondriju kao molekularnog markera te stvaranje filogenetskog stabla putem kojeg je moguće lakše otkriti veze između organizama, pratiti tu vezu dalje prema zajedničkome pretku i sagledati evoluciju iz šireg kuta.

Danas se susrećemo s nepoznanicom kao što je broj vrsta. Opisano je oko 1.8 do 2 milijuna vrsta (Anderson i sur., 2015), ali se procjenjuje da je taj broj puno veći, u rasponu od 10 pa do čak 100 milijuna s time da se taj broj smanjuje zbog masovnog izumiranja kojem svjedočimo a uzrok je upravo industrijski napredak koji je usmjeren ka smanjenju ili čak istrebljenju vrsta i bioraznolikosti (theguardian, pristupljeno 9.9.).

Hrskavične ribe (razred Chindrichthyes) svoju prisutnost u vodenom svijetu broje otprilike 400 milijuna godine što ih čini evolucijski jednom od najstarijih skupinama

kralješnjaka na Zemlji. Također oni spadaju među najugroženije morske ribe Sredozemlja čiji su glavni uzroci uglavnom ribolovna djelatnost, a biološki čimbenici kao što su mala stopa reprodukcije , relativno mala gustoća populacije, spori rast, ograničeno rasprostranjenje ne mogu oporaviti nekadašnje stanje. U zapadnom Indijskom oceanu i centralnom Pacifiku te sjeveroistočnom Atlantiku zabilježena je najveća količina ulova te se pretpostavlja da u svijetu godišnje samo ulov morskih pasa premašuje oko 100 milijuna jedinki. Ovaj broj uključuje i desetke milijuna morskih pasa koji se love samo zbog njihovih leđnih peraja pri čemu se peraje odsijecaju a ostatak tijela životinje se uglavnom baca nazad u more te desetke milijuna jedinki stradalih slučajnim ulovom. Stoga je i brojnost hrskavičnjača bila pokazala izraziti negativan trend, kao u svijetu tako i na Jadrana, u razdoblju od 1996. do 2008. godine. (dzzp, pristupljeno 8.9.2017)

1.1. Karakteristike Jadranskog mora

Jadransko more (eng. Adriatic sea) je dio Sredozemnog mora koje se nalazi na umjerenim geografskim širinama i zauzima ukupnu površinu od 138.600 km² i volumen od 35.000 km³. Njegov se oblik može opisati kao pravokutnik koji se proteže 800 km u dužinu i 200 km u širinu. More je omeđeno obalama država Italije, Slovenije, Hrvatske, Bosne i Hercegovine, Crne Gore i Albanije u duljini od 3740 km. Jadransko more je poluzatvoreno i odvojeno Otrantskim vratima širine 75 km (između Italije i Albanije) gdje na jugoistočnom dijelu graniči s Jonskim morem. Jadransko more je podijeljeno na tri dijela: sjeverni Jadran (zračna linija: Pula-Rimini ili Ancona-Zadar), srednji Jadran i južni Jadran (zračna linija: Dubrovnik-Gargano). Sjeverni Jadran čini i najsjeverniju točku Sredozemnog mora. Prosječna dubina Jadranskog mora iznosi 173 m s time da sjeverni Jadran predstavlja najplići dio kontinentalne podine (prosjek 33,5 m), a u južnom Jadranu se nalazi najdublja točka, u Južnojadranskoj kotlini dubine 1233 m (Dulčić, 2005).

Temperatura ljeti iznosi od 22 do 26 °C, dok je zimi 6 do 12 °C na sjevernom Jadranu i 10 do 15 °C na južnom Jadranu. Prosječni salinitet Jadranskog mora iznosi 38 ‰, dok je na sjevernom Jadranu niži zbog utjecaja slatkovodnog donosa iz rijeke Po koja utječe i na samu cirkulaciju u Jadranu. Jadran ima tri glavne velike cjeline morske vode karakterizirane određenom kombinacijom temperature i saliniteta: Sjevernojadranska voda visoke gustoće (SVVG; 11ºC, 38.5), Levantinska intermedijarna voda (LIV; 14ºC, 38.7) i Južnojadranska duboka voda (JDV; 13ºC, 38.6).

Flora i fauna Jadranskog mora rezultat je brojnih geoloških, geografskih, klimatskih i bioloških utjecaja koji su se odvijali tijekom njegova stvaranja (Jardas, 1996). Iako je Jadran dio Sredozemnog mora, on je također i zaseban biogeografska i ekološka jedinica što se može vidjeti prema sastavu i svojstvima prisutne biocenoze (Dulčić, 2005).Riblje vrste i podvrste koje su zapisane u Jadranskom moru su grupirane u dvije klase, 26 redova i 120 familija od čega 21 familija pripada klasi hrskavičnih riba (Chondrichthyes), dok ostatak sapda u koštunjače (Osteichtyes). Konačni broj ribljih vrsta nije moguće u potpunosti odrediti zbog vrsta koje se možda povremeno pojavljuju i pojedinih vrsta koje su ulovljene samo jednom ili nisu ulovljene nikad (Dulčić, 2005).

1.2. Temelji razumijevanja filogenije

Filogenija je znanstvena disciplina koja se bavi proučavanjem evolucijske prošlosti različitih taksonomskih kategorija, a za cilj ima pronalazak evolucijske poveznice između organizama analiziranjem promjena u različitim organizmima tijekom evolucije, pronalazak veze između pretka i potomka i promjena vremena razilaženja (divergencije) između grupa organizama koje ih dijeli od zajedničkog pretka. Korištenjem morfološkim, fiziološkim, embriološkim, genetskim, molekularnim, foslilnim i geografskim homologijama moguće je proučavati tijek evolucijske prošlosti različitih taksonomskih skupina. Homologija je postojanje zajedničkih struktura ili gena, sličnosti između organizama, što može imati za rezultat postojanje različite funkcije (npr. organa) u različitim vrstama organizma, a razvijaju se pod utjecajem istih ili sličnih gena (Jelenić i sur, 2004).

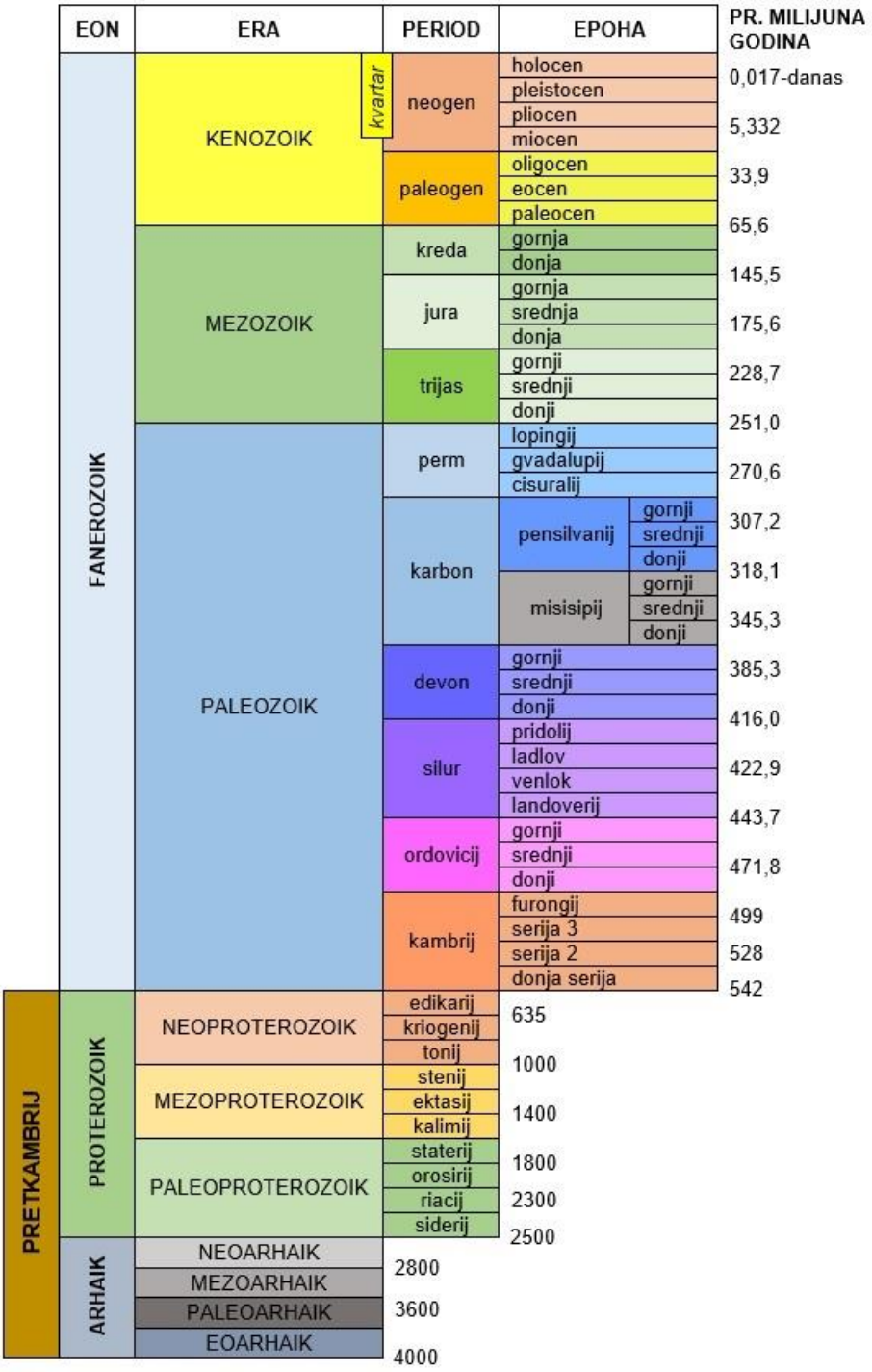
Najbolji način za otkrivanje detalja o životu u davnoj prošlosti su fosilni ostaci. Fosil je ostatak nekoć živućeg organizma sačuvani u stijeni koji mogu biti podijeljeni na tri vrste: tjelesni fosili, fosilni tragovi i kemijski fosili. Tjelesni fosili su obično tvrdi dijelovi poput ljuštura, kosti, zubi. Fosilni tragovi (ihnofosili) su ostaci sačuvani u stvrdnutom sedimentu, poput otiska stopala i posljednji kemijski fosili se sastoje od razgrađenih organskih tvari iz molekula živih bića poput fosilnog DNA izvađenog iz zuba ili kostiju (Palmer i sur., 2009).

Iako se u fosilnim zapisima sačuva samo mali dio života na Zemlji, oni su najzaslužniji za većinu ljudskih spoznaja o prapovijesnom životu i njegovu razliku u promijenjenim uvjetima koji su vladali na Zemlji. Fosilni zapisi pokazuju da se život razvio u moru te kako je izlazio na kopno uspostavili su se prvi ekološki odnosi biljaka i životinja (Palmer i sur., 2009).

Glavni cilj filogenije je rekonstruirati stablo života odnosno filogenetsko stablo gdje se mogu prikazati sve poveznice između grupa organizama (Nei, Kumar, 2000) uz poznavanje evolucijskih bitnih događaja na Zemlji koji sežu natrag milijardama godina.

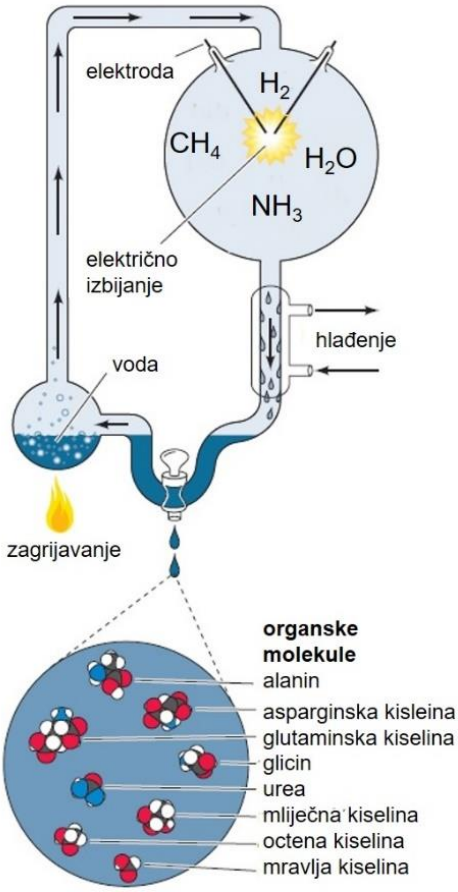
1.2.1. Nastanak života i evolucija

Geološkom kronologijom (slika 1.) mogla se podijeliti Zemljina prošlost pri čemu je takva standardizirana vremenska ljestvica postala pomagalo za razumijevanje glavnih evolucijskih događaja na Zemlji kao što je razvitak života.



Slika 1. **Geološka kronologija.** Sustav najveće dijelove naziva eonima, a pod njima po duljini slijede ere, period**,** epohe (McNamara i sur.,2015).

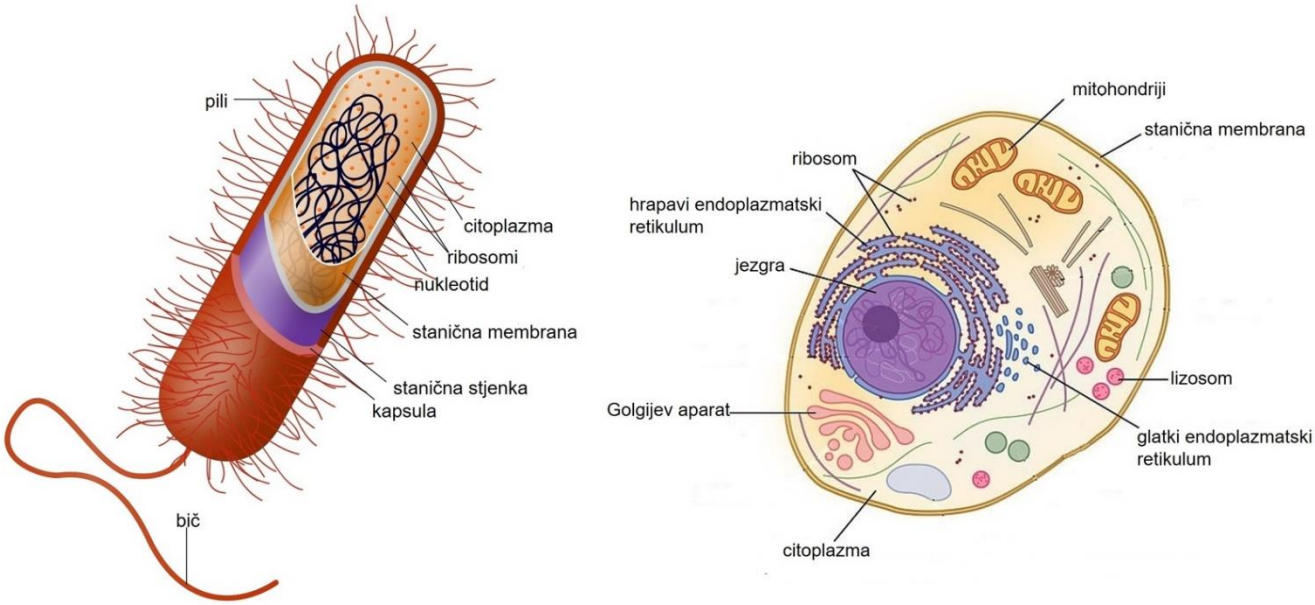
Pretpostavka je da se život razvio, diversificirao i od sitnih oceanskih mikroba pretvorio u milijune vrsta koje danas obitavaju na Zemlju u razdoblju duljem od 3,8 milijardi godina. Iako se nastanak prve stanice u potpunosti nije mogao razumjeti zbog teškog laboratorijskog reproduciranja uvjeta primitivne Zemljine atmosfere kakvi su postojali nekada nakon njenog formiranja, dvadesetih godina prošlog stoljeća po prvi se put predložilo spontano polimeriziranje jednostavnih molekula u makromolekule. Spontano formiranje organskih molekula je dokazano Miller-Uryjevim eksperimentom (slika 2). Iako se putem eksperimenta nisu u potpunosti ponovili uvjeti početne primitivne atmosfere Zemlje, jasno se pokazalo vjerojatnost spontane sinteze organskih molekula kao materijali koji će kasnije služiti za nastanak živih organizama, a bitna osobina makromolekule iz koje se razvio život ja bila njezina sposobnost repliciranja. (Cooper i Hausman, 2004).



Slika 2. Prikaz Miller-Uryjevog eksperimenta spontanog formiranja organskih molekula (Cooper i Hausman, 2004)

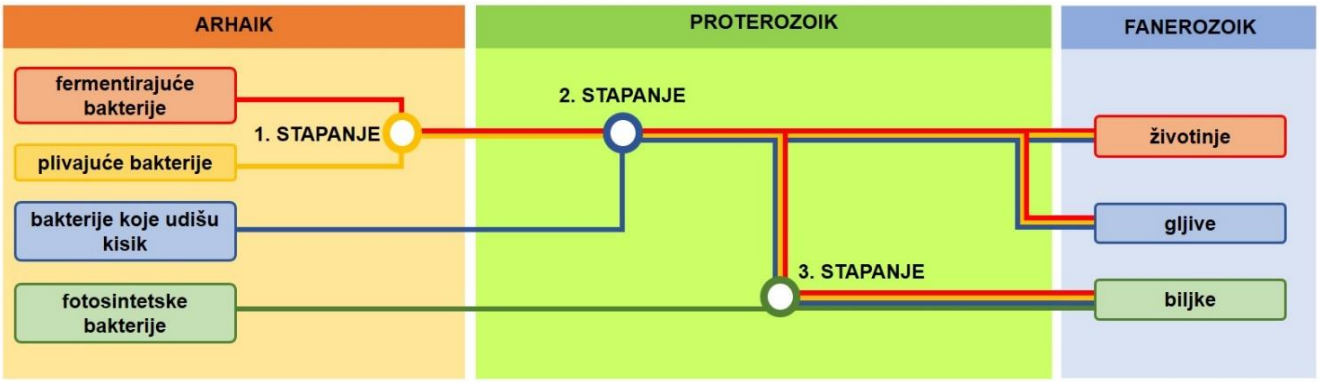
Vjeruje se da je RNA bila prva struktura zaslužna za rane stupnjeve kemijske evolucije temeljena na samoreplicirajućim molekulama RNA koja je evoluirala u današnji genetički kod i bila zamijenjena DNA kao genetičkim materijalom (Cooper i Hausman, 2004).

Okruživanjem molekule RNA membranom građene od amfipatskih molekula i evolucijom metablizma, proizvodnje energije potrebne za replikaciju, razvoja fotosinteze i oksidativnog metabolizma nastala je jednostavna prokariotska stanica cijanobakterija bez stanične jezgre a nakon toga i prvi eukariotski organizam sa jezgrom i drugim organelima što čini prve razlike između ta dva tipa života (slika 3).



Slika 3. Prokariotska ili bakterijska stanica (lijevo) i Eukariotska desno stanica, njihova građa i razlike (Preuzeto sa getmededu 9.9.2017)

Prvi nastanak eukariotskog života još u eonu arhaika moguće da se pojavio postepeno simbiotičkim stapanjem različitih vrsta bakterija koja se zbivalo tijekom više milijardi godina (slika 4.) Pretpstavlja se da je bilo tri glavnih stapanja. U prvom stapanju fermentirajuće arheobakterije s jezgrom za pohranu DNK i nadzor stanične kemije su se stopile sa plivajućim eubakterijama koje imaju bičeve za kretanje. Drugo stapanje koje se desilo u proterozoiku povezuje bakterije koje udišu kisik i primitivne eubakterije čime bakterije koje udišu kisik postaju mitohondriji za pohranu energije. Zadnje, treće, glavno stapanje se odvijalo sa algama i fotosintetskim cijanobakterijama čime one postaju stanični kloroplasti i postaju preci današnjim biljkama (Brasier i sur.; 2009).



Slika 4. Prikaz nastanka složenijih eukariotskih stanica (Braseir i sur.,2009)

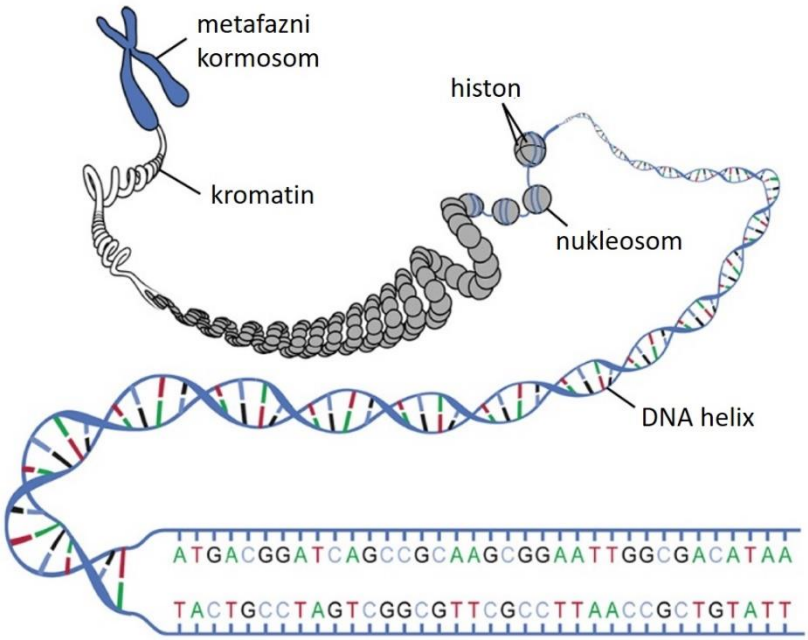
Daljnjim događajima stvarali su se sve složeniji višestanični organizmi, eukarioti, i dovelo do nastanka novih prehrambenih navika i prehrambenih lanaca što je potaknulo proces odabira, prirodne selekcije i natjecanja tj. evoluciju.

Charles Darwin i Alfred Russel Wallace bili su potaknuti mnogim idejama i pitanjima o prirodi života, njegovu početku i povijesti, a 1858. godine su zajedno objavili sažetak o teoriji evolucije (Palmer i sur., 2009). Evolucija je znanstvena teorija koja tvrdi da se geni biljaka i životinja odnosno njihova genetička struktura mijenja prolaskom vremena preoblikujući se i prilagođavajući uvjetima života na Zemlji. A direktan uzrok prilagodbe je zapravo mutacija gena. Stoga imamo mikroevoluciju u kojoj dolazi do genetskih promjena i dovode do nastanka novih vrsta i makroevoluciju koja podrazumijeva promjene u višim sistematičkim skupinama (npr. porodice) (Palmer i sur., 2009).

Nasljedna genetička varijabilnost je osnova Darwinove i Wallaceove teorije evolucije. Većina vrsta koje su živjele na Zemlji do danas su izumrle, ali geni su preživjeli u živućim potomcima. Specijacija je proces u kojim nove vrste nastaju od pretka i odvija se putem fragmentacije populacije, odnosno dolazi do geografske i genetske različitosti skupine iste vrste. Također masovna izumiranja koja su se odvijala su dozvoljavala unutar adaptivne radijacije, napredak i diversifikaciju drugih vrsta i otvaranje novih ekoloških niša (Barnosky i sur 2011).

1.2.2. Struktura i funkcija gena

DNA (eng. Deoxyribonucleic acid) molekula čiju su trodimenzionalnu strukturu otkrili James Watson i Francis Crick je građena od dva polinukleotidna lanca, a svaki od njih je građen od četiri različita nukleotida. Nukleotid grade šećer deoksiriboza, fosfatna skupina i jedna od četiri moguće dušićne baze koje diferenciraju svaki nukleotid. Dušićne baze se dijele na purine poput Adenin [A] i Gvanin [G] te pirimidine poput Timin [T] i Citozin [C]. dvolančana molekula DNA omotana je oko svoje zamišljene osi u uzavojnicu koju se naziva dvostrukim helixom. Polinukleotidne lance vežu vodikove veze između baza te postoji kao što je prije spomenuto specifično sparivanja baza komplementarnih nukleotida tako da se baza adenin jednog lanca sparuje sa timinom drugog lanca dvostrukom vodikovom vezom, a baza gvanin sa bazom citozin trostrukom vodikovom vezom. DNA molekula gradi gen, kodiranu informaciju u obliku nasljednih jedinica, a skupina gena čini genom, ukupnu genetičku informaciju za nasljeđivanje (slika 5.) (Pavlica, 2012).



Slika 5. Prikaz strukture DNA i gena (biology.stackexchange pristupnjeno 12.9.)

Gen se može klasificirati u dvije skupine: protein kodirajući gen i RNA kodirajući gen. Protein kodirajući gen se transkripcijom pretvaraju u messenger RNA (mRNA) koji se potom translatiraju u aminokiselinske sljedove proteina odnosno polipeptide što je i centralna dogma molekularne biologije. RNA kodirajući gen proizvode transfer RNA (tRNA) bitne u prevođenju genetičke informacije mRNA u aminokiselinske sljedove

proteina, ribosomni RNA (rRNA) dio je ribosoma koji imaju ulogu u sintezi proteina i male jezgrene RNA (eng small nuclear RNA; snRNA) koje su zatvorene u jezgri (Nei i Kumar, 2000).

Većina eukariotskih gena sadrži dijelove za kontrolu transkripcije i obradu primarnog transkripta RNA (eng. pre-messenger RNA; pre-mRNA). Primarni transkript sadrži kodirajuće dijelove koje nose informaciju za kodiranje aminokiselina u polipeptidne proizvode gena i nekodirajuće dijelove koji sadrže informaciju za važnu za reguliranje polipeptidnog produkta. Pojedini sljedovi nekodirajućeg dijela se režu u procesu proizvodnje mRNA i ti se sljedovi zovu introni dok ostatak čine egzoni (Nei i Kumar, 2000).

Kako su sve morfološke i fiziološke osobine organizma kontrolirane genetskom informacijom koju nosi DNA bilo kakva mutacija osobina su rezultat promjene u DNA kao što su suptitucije nukleotida s drugim nukleotidom (tranzicija zamjena između dva pirimidina T↔C ili između dva purina A↔G te transverzija zamjena između pirimidina ili purina; T ili C↔A ili G), delecija nukleotida (gubitak jednog ili više nukleotida), insercija nukleotida(umetanje jednog ili više nukleotida) koji zajedno uzrokuju mutaciju pomaka okvira čitanja (engl. frameshift) i inverzija (promjena) nukleotida (Nei i Kumar, 2000).

1.2.3. Sistematika i taksonomija

Taksonomija (sistematika, klasifikacija) je znanstvena disciplina čija je zadaća utvrditi i navesti bitne osobine svih organizama koji danas žive na Zemlji i onih koji su živjeli u njezinoj geološkoj prošlosti (Bačić i sur., 2003).

Prema karakteristikama određenim morfologijom, embriologijom, fiziologijom, ekologijom, geografijom, ponašanjem i u novije vrijeme molekularnim karakteristikama sva se živa bića organiziraju u osam sistematskih kategorija: Nadcarstvo (lat. superregnum), Carstvo (lat. regnum), Koljeno (lat. phylum), Razred (lat. classis), Red (lat. ordo), Porodica (lat. familia), Rod (lat. genus) i Vrsta (lat. species) (Bačić i sur.,2003).

Vrsta je osnovna sistematska jedinica i kategorija koja zaista postoji. Naime hijerarhija može imati jedan dodatni stupanj ili više dodatnih stupnjeva što je rezultat ne pristajanja pojedine životinje u već oformljenu kategoriju. Zato se nadrazredi ili podredovi moraju postaviti kako bi se određena skupina prilagodila (Brock i sur., 2001).

Svaki organizam na Zemlji je srodan drugim organizmima te odlaskom dovoljno daleko u prošlost vidjelo bi se da sva živa bića dijele zajedničkog predaka, organizma od kojeg smo svi evoluirali. Taksonomija predstavlja princip putem kojeg se može shvatiti u kojem dijelu su se organizmi razdvojili unutar evolucijskog stabla i pronaći prikladna poveznica za objašnjavanje odnosa između svih organizama, no ona prvenstveno grupira organizme koji dijele zajedničke karakteristike. Prvi koji je ukazao na važnost sustavnog sistematiziranja živih bića i osmislio jednostavnu podjelu na biljke i životinje bio je grčki filozof Aristotel. Stoljećima kasnije slijedile su se Aristotelove stope i sami nazivi organizama su bili složeniji jer su dobili ime prema polinomnoj nomenklaturi. Naime naziv obične pčele je glasio „*Apis pubescens, torace subgrisea, abdomine fusco, pedibus posticis glabris utrinque margine ciliatis*“ što je više bio opis same vrste. (Girotti, 1994.).

Znanstvenici su koristili polinomnu nomenklaturu mnogo godina jer nisu još shvaćali kolikoj količini organizama treba dati ime sve do perioda otkrića mnogih vrsta kada se uvidjela potreba za novim drugačijim sustavom nazivlja, odnosno binarnom nomenklaturom. Binarnu nomenklaturu i taksonomski sustav u kojem se klasificiraju sva živa bića na Zemlji unutar kategorija postavio je i objavio 1758. godine švedski prirodoslovac Carl von Linné u svom znanstvenom radu „Systema Naturae“ i time

uveo red u svijet prirode. U svom je desetom izdanju opisao 4400 životinjskih i 7700 biljnih vrsta kojima je dao znanstveni naziv vrste putem binarne nomenklature, čime je glomazan naziv obične pčele postao „*Apis mellifera*“. (Baier i sur., 2004)

Linne-ova temeljna klasifikacija koju je osmislio nastavila se koristiti i do današnjeg dana uz ispravke, poboljšanja i preinake koje zbog ograničene tehnologije u ondašnje vrijeme nisu mogle biti otkrivene. U 19. stoljeću važni znanstvenici među kojima su se nalazili i Charles Darwin, Jean-Baptiste Lamarck i Ernest Heackel predstavili su novi sustav klasificiranja osnovan na evolucijskim odnosima što dovodi do drugačijeg sastavljanja filogenetskog stabla. (Quizlet, pristupljeno 8.9.2017.)

Sistematika i taksonomija je bila oduvijek jedna od kontraverznih područja u biologiji. Puno je slučajeva kada se više stručnjaka ne slaže oko opredjeljenja nekog organizma u podvrstu, vrstu, rod, familiju ili bilo koju drugu kategoriju dok je neslaganje u filogeniji manje jer podjela primarno obraća pažnju na evolucijski odnos organizma. Također oba dva područja biologije su usko povezana jer je klasifikacija organizma vođena utjecajem evolucijske povijesti. Stoga filogenetika ima važnu ulogu u otkrivanju znanstvenih osnova sistematike. Mnoge prednosti molekularne filogenije su iskorištene za promjenu određene klasifikacije nekoga organizma (Nei i Kumar, 2000).

1.3. Molekularna filogenija

Kao što je prije spomenuto, idealan pristup evolucijskoj povijesti svih organizama na Zemlji unutar filogenetskog stabla je korištenje fosilnih zapisa. Obzirom da se fosilni zapisi nalaze u fragmentima i nepotpuni su, istraživači su mogli uspoređivati samo morfološki i fiziološki i odgonetnuti evolucijsku povijest nekoga organizma prilikom čega se zbog njihove stalne promjene osobina nije moglo izraditi detaljno i u potpunosti točno filogenetsko stablo a time niti evolucijska povijest. Postignuća u molekularnoj biologiji promijenile su takvu situaciju. Ovaj pristup ima nekoliko prednosti u odnosu na određivanja odnosa putem morfoloških i fizioloških osobina. Prvo, DNA kao što je prije spomenuto sastoji se od četiri tipa nukleotida koji se mogu koristiti u usporedbi pri bilo kojoj grupi organizama. Genomi svih vrsta sadrže duge sljedove nukleotida i sadrži puno veću količinu filogenetskih informacija nego morfološke osobine. Zbog tih razloga se molekularna filogenija koristi za razjašnjavanje mnogih grananja filogenetskog stabla koje je bilo teško odrediti klasičnim putem (Nei i Kumar, 2000).

1.3.1. Molekularni markeri

Molekularni marker je DNA slijed korišten za označavanje ili praćenje određenog područja (lokusa) na određenom kromosomu. Otkrićem DNA strukture i funkcije 1950. omogućilo je daljnje razvijanje u području molekularne genetike. Metode DNA kloniranja, sekvencioniranja i hibridizacije razvijene 70-ih godina te DNA amplificiranje i automatsko sekvencioniranje tijekom 80-ih godina vodilo je ka razvoju različitih vrsta genetičkih markera kada su se pojavila i prva istraživanja populacijske genetike putem mitohondrijske DNA (Collard i sur., 2004).

Molekularni markeri se primjenjuju u istraživanju genetike prirodnih i pripitomljenih popilacija i načine unošenja promjene unutar tih populacija. Također se koristi pri mapiranju gena, označavanju gena, genetske raznolikosti, filogenetske analize, identifikaciju vrsta i dijagnosticiranju autosomalnih recesivnih genetičkih bolseti.

Tri su glavna tipa genetičkih markera: morfološki, biokemijski i DNA (molekularni) marker. Morfološki markeri obično predstavljaju fenotipska svojstva, poput boje, oblika, pigmentacije. Biokemijski markeri su mala količina različitih krvnih grupa i isoenzimi. Oni predstavljaju biokemijsko svojstvo koje se može određivati putem

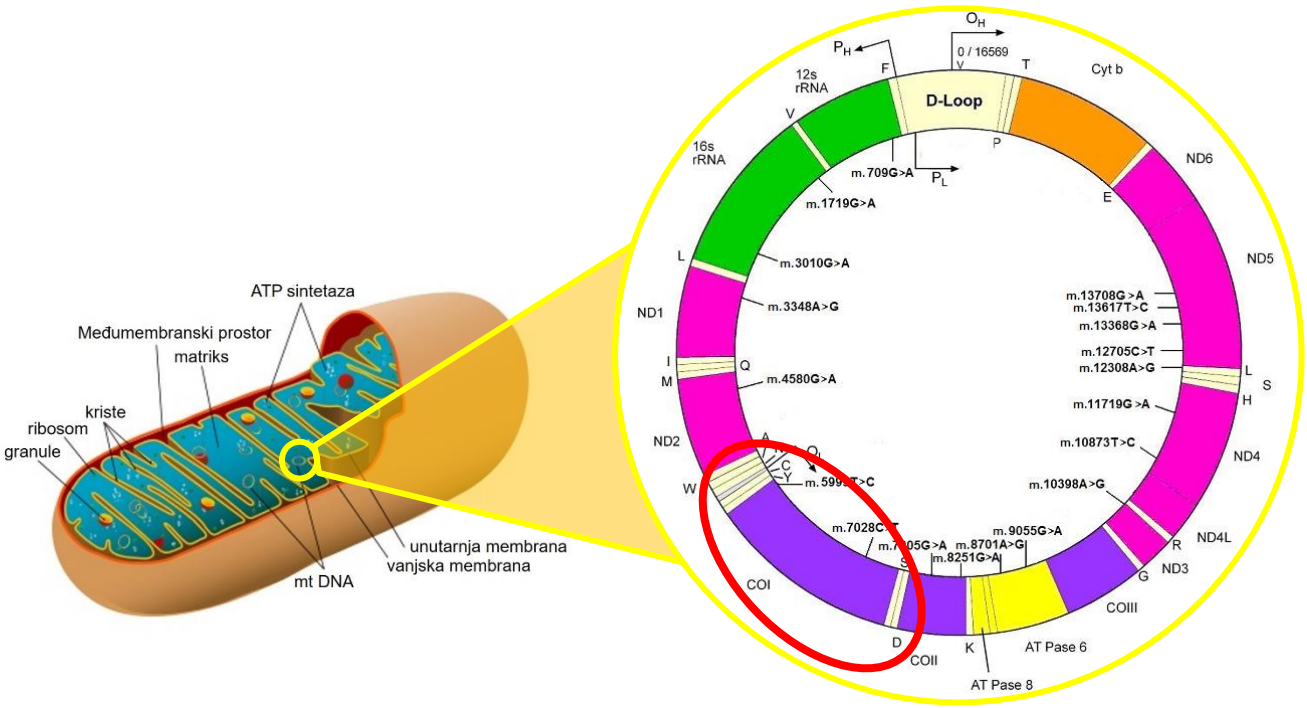
proteinske elektroforeze te se uspoređuju razlike u poretku aminokiselina. Pojedini proteini se koriste za istraživanje genetičke različitosti i određivanja filogenetskog odnosa između vrsta. Ograničenost biokemijskih markera se pojavila kada je utvrđeno da je njihova varijabilnost kod nekih vrsta znatno niska (Odak i sur., 2002). Također često se nalaze u vrlo malom kodirajućem dijelu genoma i teško ih je detektirati elektroforezom i okolišni čimbenici imaju veliki utjecaj na njih pri čemu se degradiraju. (Odak i sur., 2002).

DNA (molekularni) markeri predstavljaju fragmente DNK i omogućavaju razlikovanje pojedinih genotipova na temelju DNK analize.. Ovi markeri su locirani na ne-kodirajućem području DNA i prednost je što okolišni uvjeti ne utječu na njih (Collard i sur., 2004).

1.3.1.1. Citokrom oksidaza podjedinica I

Citokrom oksidaza podjedinica I je protein poznat i kao mitohondrijski kodirana citokrom c oksidaza I (MT-COI). Citokrom c oksidaza i je glavna podjedinica kompleksa citokrom c oksidaze koji ima ulogu u oksidacijskoj fosforilaciji. Također, COI gen se koristi kao DNA barkod za identifikaciju životinjskih vrsta. Povoljan je zbog učestalosti mutacija koje se odvijaju dovoljno brzo za razlikovanje blisko srodnih vrsta.

U eukariotskoj stanici mitohondriji imaju ključnu ulogu u proizvodnji metaboličke energije oslobođene razgradnjom ugljikohidrata i masnih kiselina koja se u procesu oksidativne fosforilacije pretvara u ATP. Mitohondriji su okruženi dvostrukom membranom koju čine unutarnja i vanjska membrana a između međumembranskim prostorom. Unutarnja membrana formira nabore koji se nazivaju kriste (lat. cristae) i protežu se u unutrašnjost mitohondrija ispunjenu matriksom. (Cooper i sur. 2004)



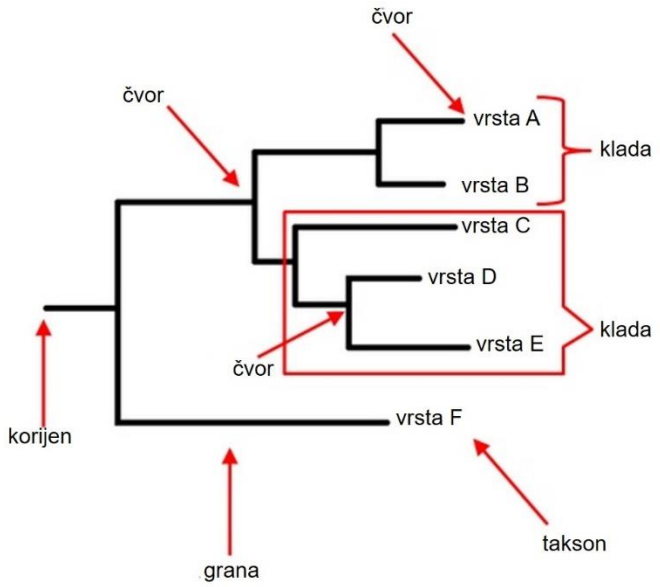
Slika 6. Prikaz građe mitohondrija i mitohondrijskog genoma i položaj COI gena u genomu (medicalexpress pristupnjeno 12.9.)

Smatra se da su se mitohondriji razvili od baketrija koje su uspostavile endosimbiotički odnos unutar većih stanica u kojima su živjele (slika 4.) stoga mitohondriji posjeduju vlastitu DNA koja kodira transportne RNA (tRNA), ribosomalne RNA (rRNA) i proteine. Oni su također izgrađeni dijelom od proteina kodiranih vlastitim genom i sintetizirani unutar organela i dijelom od proteina kodiranih genomom nukleusa (Cooper i sur. 2004).

Genomi mitohondrija su kružne molekule DNA (slika 6.) slične bakterijskim te su prisutne u velikom broju kopija po organelu. Veličina se razlikuje prema vrstama pa je tako ljudski genom kao i genom većine životinja velik oko 16 kb (kilobaza), dok se kod kvasaca kreće oko 80 kb te kod biljaka oko 200 kb, većinom građeni od nekodirajućih DNA ne sadržavajući time genetičke informacije (Cooper i sur. 2004).

1.3.2. Formiranje filogenetskog stabla

Filogenetsko stablo kao završni rezultat filogenetske analize grafički je prikaz evolucijskih odnosa između gena ili organizama putem sljedova proteina ili DNA. Stoga se može i determinirati hijerarhijski odnos između vrsta i procijeniti vrijeme divergencije između vrsta. Svako se stablo sastoji od grana i čvorova (slika 7). Čvorovi mogu biti vanjski i predstavljati sistematske jedinice koje se proučavaju ili unutarnji i predstavljati hipotetske zajedničke pretke proučavanih sistematskih jedinica.



Slika 7. Prikaz kladograma i dijelovi filogenetskog stabla (Lio i Goldman, 1998.)

Filogenetsko stablo može biti formirano kao filogram ili kaldogram. Filogram ja prikaz kod kojeg se evolucijsko vrijeme prikazuje u duljini grane koje je prošlo od odvajanja od zajedničkog pretka. Kaldogram je prikaz u kojem je bit topologija stabla koja prikazuje relativne odnose između različitih vrsta (Xiong, 2006).

Vrijeme razilaženja se može odrediti putem molekularnog sata. Molekularni sat temelji se na zamisli da se evolucijske promjene zbivaju u redovitim vremenskim razmacima. Pretpostavlja se da stopa genetskih promjena u DNA nekog organizma ne mijenja se prolaskom vremena ili se barem uprosječi. No ta brzina se razlikuje kod različitih vrsta organizama zbog više čimbenika pri čemu točni molekularni sat zapravo ne postoji (Wilke i sur.,2009).

Filogenetsko izučavanje podijeljeno je u pet različitih faza:

Faza 1: Odabir sekvenci za analiziranje

Faza 2: Izrada višestrukog poravnavanja (eng. multiple alignment) odabranih homolognih sekvenci

Faza 3: Odabir supstitucijskog modela, statistički model molekularne evolucije, za odgovarajuće sekvence

Faza 4: Izrada filogenetskog stabla zasnovanog na odgovarajućim homolognim sekvencama i supstitucijskim modelima

Faza 5: Statistička procjena filogenetskog stabla

Poredak faza nije organiziran linearnim putem. Čest je slučaj da se mora koji korak odnosno faza vraćati unatrag za pregled podataka i postavljenih parametara prije dolaska na napredniju iduću fazu, kako bi rezultati mogli biti što vjerodostojniji. Različiti rezultati zasebno će biti procijenjeni u posljednjoj fazi i mogu biti zajedno uspoređeni. (Goldman i sur., 1998.)

Odabir homolognih sljedova

Filogenetska analiza se zasniva na usporedbi homolognih bioloških sljedova kao što su npr. Citokrom oksidaza podjedinica I ili NADH dehidrogeneza podjedinica 2. Proučavanje razlike između svih sljedova dopušta da se procjeni evolucijski odnos između odgovarajućih vrsta i njihovog divergencijskog vremena (Goldman i sur., 1998.).

Za prikupljanje homolognih sljedova, koriste se baze nukleotidnih podataka poput Genebank, RefSeq, Uniprot ili HomoloGene, koje mogu biti pretražene putem internetskih stranica poput NCBI (eng. National Center for Biotechnology Information). Drugi način prikupljanja sekvenci je i putem poravnavanja (eng. alignment) u BLAST-u (Goldman i sur., 1998.). Pri odabiru nukleotidnih sljedova potrebno je obratiti pažnju ukoliko se nalazi više mjesta sa neodređenostima (tablica 1) što bi utjecalo na krajnji rezultat.

Tablica 1. Oznake neodređenosti u slijedu nukleotida prema IUPAC-u (bioinformatics.org pristupljeno 12.9.)

KOD	ZNAČENJE	KOMPLEMENTARAN KOD
A	Adenin	T
G	Gvanin	C
C	Citozin	G
T	Timin	A
Y	Pirimidin (C ili T)	R
R	Purin (A ili G)	Y
W	slab (A ili T)	W
S	jak (G ili C)	S
K	keto (T ili G)	M
M	amino (C ili A)	K
D	A, G, T (ne C)	H
V	A, C, G (ne T)	B
H	A, C, T (ne G)	D
B	C, G, T (ne A)	V
X/N	sve baze	X/N
-	praznina	-

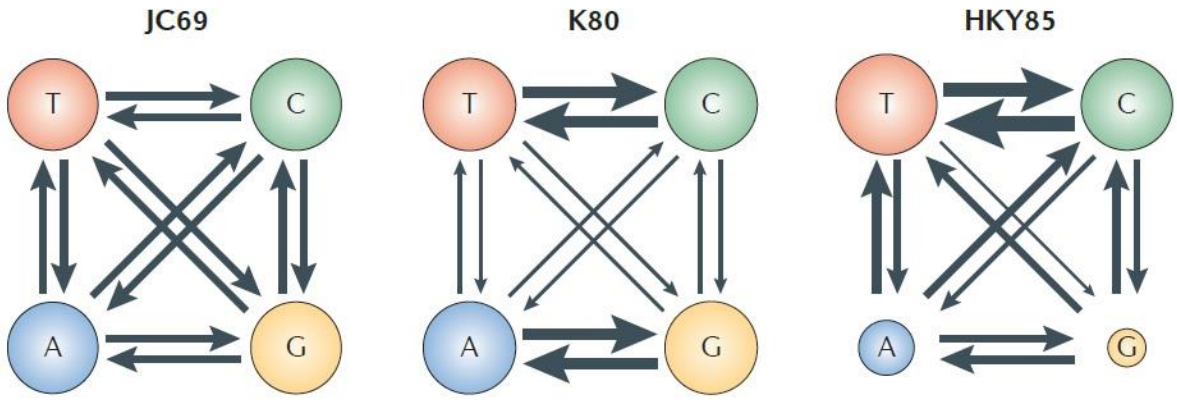
Višestruko poravnavanje (eng. multiple alignment) homolognih sljedova

Poravnavanje analiziranih bioloških sekvenci je važan korak u filogenetskom istraživanju jer uključuje usporedbu različitih homolognih sekvenci. Bitno je stoga odstraniti ne-homologne sekvence (npr. ukoliko među sekvencama imamo i COI i NADH dehidrogeneza potrebno je odstraniti jednu od sekvenci i izraditi poravnanje samo putem jednog tipa gena). (Goldman i sur., 1998).

Postoje mnogi zasebni alati za višestruko poravnanje kao i alati, kao što je npr. MEGA (eng. Molecular Evolutionary Genetic Analysis, http://www.megasoftware.net/), koji sadrže mnoge karakteristike pojedinačnih alata. MEGA računalni program dopušta višestruko poravnanje sekvenci putem Muscle-a (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/) i ClustalW (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) poravnavajućih metoda (Goldman i sur., 1998).

Odabir supstitucijskog modela

Ovaj korak se koristi tijekom izračunavanja vjerojatnosti (eng likelihood) grananja stabala (Bayesian i maksimalna vjerojatnost (maximum likelihood) pristup procjene stabala), odnosno za procjenu vjerojatnosti genetičke udaljenosti između različitih sekvenci. Zapravo se izračunava i opisuje stupanj zamjene nukleotida drugim nukleotidom tijekom evolucije (Slika 8.). Genetska udaljenost između dvije homologne sekvence definirana je kao broj supstitucija (zamjena) akumuliranih između njih od kada su se razišli od zajedničkog pretka. Filogenetska analiza se zasniva za točnog izbora prigodnog supstitucijskog modela kojih ima nekoliko, a najčešći su JC69 model (Jukes i Cantor, 1969), K80 model (Kimura, 1980) i HKY85 model (Hasegawa, Kishino and Yano 1985) (Goldman i sur., 1998).



Slika 8. **Markov model suptitucije nukleotida**. Strelica prikazuje stopu supstitucije od četiri nukleotida (T, C, A, G) i veličina kruga predstavlja ferkvenciju supstitucije nukleotida. Svaka metoda ima različiti stupanj tranzicije (zamjena između dva pirimidina T↔C ili između dva purina A↔G) i transverzije (zamjena između pirimidina ili purina; T ili C↔A ili G) (Yang i sur.,2015).

Izrada filogenetskog stabla

Glavni cilj molekularne filogenije: putem filogenetskog stabla ustanoviti hijerarhijski model između vrsta prema njihovom evolucijskom odnosu i procijeniti vrijeme razilaženja (divergencije) između vrsta.

Postoje dva tipa stabala prema postojanju istaknutog čvorišta (grananja, eng. node) pod nazivom korijen (eng. Root); stablo s korijenom (Rooted tree) i bez korijena (Unrooted tree). Stablo s korijenom ima određeno ishodišno grananje pod nazivom korijen i odgovara zajedničkom pretku svih vrsta. Stablu bez korijena (Unrooted tree) korijen se može determinirati dodavanjem vanjskih grupa (eng outgroup), vrste koja

je poznata po svojoj najudaljenijoj grani, ili određivanjem najduže grane i potom se u oba slučaja pozicionira korijen u središnjoj točki (Goldman i sur., 1998).

Najčešće metode korištene za izradu filogenetskog stabla mogu se klasificirati u dvije kategorije (Goldman i sur., 1998.). Prva kategorija je metoda bazirana na udaljenosti u koju spada (eng.) Neighbor Joining metoda (NJ), minimalna evolucija (eng. Minimum evolution) i UPMGA (eng. unweighted pair group method with arithmetic mean) metoda. U drugu kategoriju spadaju kladističke metode temeljene na karakteristikama, poput metode maksimalne štedljivosti (eng. Maximum Parsimony, MP), maksimalne vjerojatnosti (eng. Maximum Likelihood, ML), i Bayesianova metoda. U prvoj se kategoriji metoda kalkulira udaljenost između svakog para sekvenci što rezultira matricom udaljenosti (eng. distance matrix) koja se koristi za rekonstrukciju puteva i duljine grananja. U metodama baziranim na karakteristikama sve se sekvence u poravnanju istovremeno usporede (Yang i sur., 2012).

UPMGA (eng. unweighted pair group method with arithmetic mean) metoda je među najpopularnijim metodama i prati proceduru grupiranja. Pretpostavlja se da je svaka vrsta zaseban grozd, grupa. Potom se združuju dvije grupe i rekalkulira udaljenost ujedinjenog para uzimanjem srednje vrijednosti i tako se cijeli proces ponavlja dok sve vrste nisu spojene u jednu grupu ili grozd. Algoritam nije usmjeren na utjecaj evolucijskog podrijetla (Goldman i sur., 1998).

Kod maksimalne štedljivosti (eng. Maximum Parsimony) moguća se stabla uspoređuju i daje se bod svakome stablu sa minimalnim brojem karakternih promjena stanja, poput zamjena aminokiselina, kojima treba dugi period evolucijskog vremena kako bi se sekvence uklopile u stablo. Najoptimalnijim stablom smatra se ono s najmanje promjena, najmanje mutacija, odnosno „najštedljivije“ stablo. (Eisen, 1998.)

Miksimalna vjerojatnost (eng. Maximum Likelihood) svoje podrijetlo vuče još iz 1920. godine kada ju se osmislio R.A. Fisher kao statistička metodologija za procjenu nepoznatih parametara u modelu (Yang i sur., 2012.). Metoda je slična prijašnjoj po tome što se koriste sve moguće pozicije u poravnanju i moguća stabla također uspoređuju te boduju. Bodovi su bazirani na vjerojatnosti sekvenci da mogu evoluirati u određenom vremenu dajući modelu mogućnost aminokiselinske ili nukleotidne supstitucije. Najbolje je stablo ono koje ima najveću vjerojatnost stvaranja osmatranih podataka (Eisen, 1998).

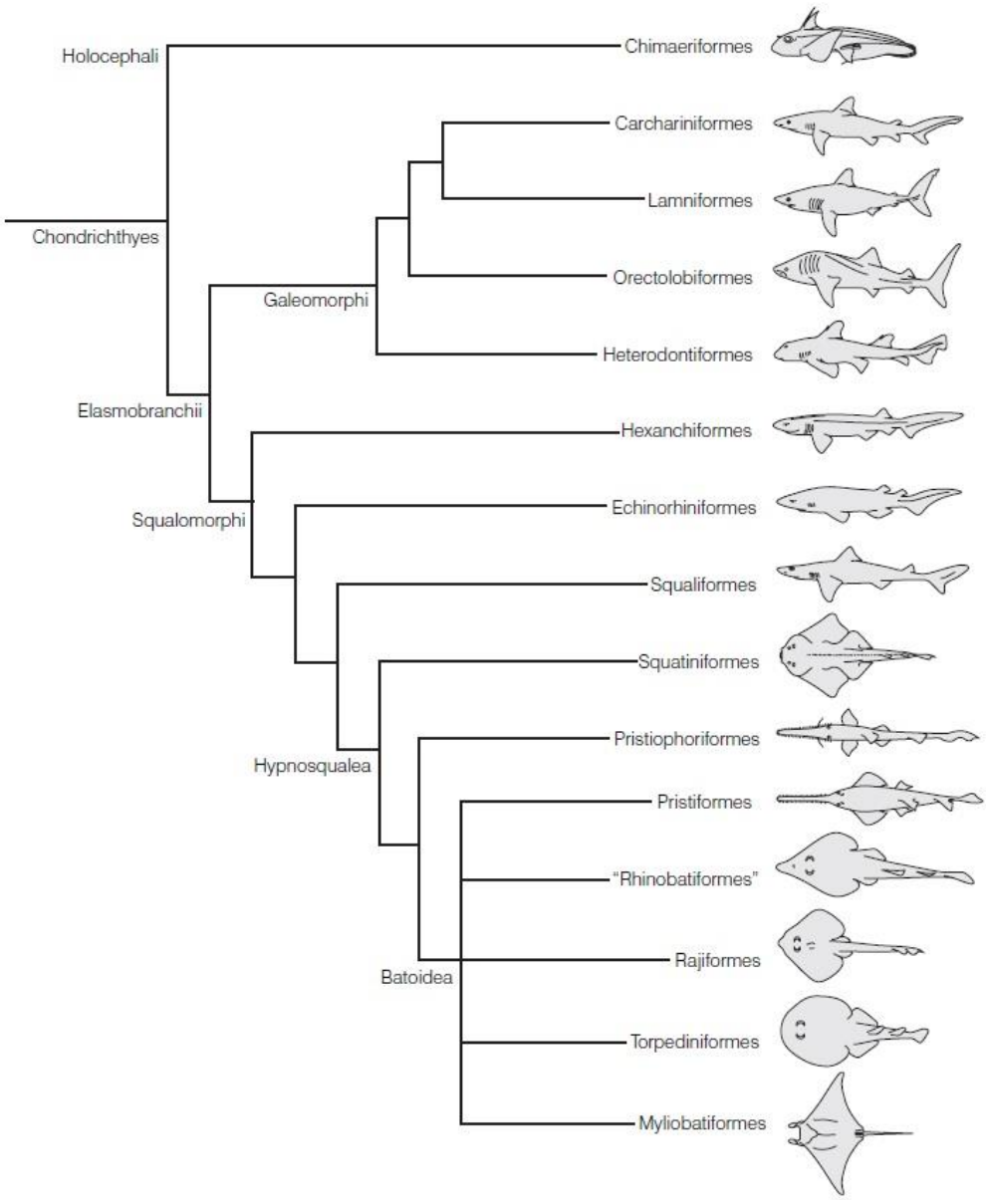
Svaka metoda ima svojih slabosti kao i jakosti i za svaku vrstu podataka jedan od ponuđenih metoda predstavlja dobar izbor.

Statistička procjena filogenetskog stabla

Nakon što se formiralo filogenetsko stablo potrebno je procijeniti njegovu pouzdanost (eng. robustness). Za procjenu stabla se koristi metoda koja se sastoji od eng. Bootstrapping-a. U ovoj se metodi ispituje povjerljivost (eng. confidence) putem stvaranja „pseudo uzoraka“ korištenih sličnih sekvenci kao razmjena sa ponavljajućim višestrukim poravnanjima. Tako se konstruira novo stablo sa novim poravnanjima i taj se proces ponavlja zadani broj iteracija (npr. 100 ili 1000 puta) (Goldman i sur., 1998.)

1.4 Ribe hrskavičnjače (razred Chondrichthyes)

Razred hrskavičnjača (Chondrichthyes) trenutačno spada u carstvo životinja (Animalia), podcarstvu Eumetazoa, natkoljeno Bilateria, koljeno Chordata, potkoljeno Vertebrata i infrakoljeno Gnathostomata (čeljustouste ribe) u čiju skupinu također spadaju i actinopterygii i sarcopterygii. Glavne dvije skupine koje formiraju razred Chondrichthyes su podrazredi Elasmobranchi (morski psi i raže) i holocephali (cjeloglavke) u koje spadaju morski štakori i njihovi srodnici (slika 9) (Opačić i sur., 2006).



Slika 9. Filogenetski odnos između razreda Chondrichthyes (Stiassny i sur., 2004)

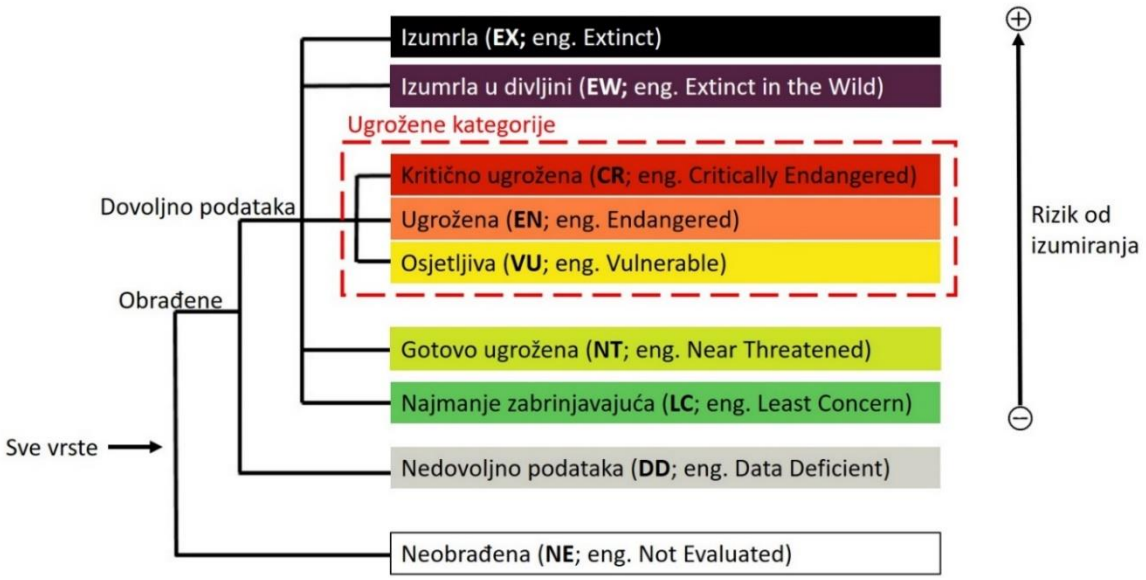
Unutarnji kostur svih riba ove skupine sačinjen je od savitljive hrskavice, a u nekih vrsta dijelovi lubanje i kostura su ojačani ulaganjem minerala. Zubi su prekriveni vrlo tvrdom ostaklicom te iza aktivnih zuba imaju nekoliko redova položenih zuba koji se

postepeno pomiču prema naprijed, a pojedinačni zubi mogu biti u kratkom periodu zamijenjeni (8-15 dana). Hrskavičnjače imaju izričito čvrstu i debelu kožu, pogotovo ženke jer se mužjaci pri parenju zubima pridržavaju za ženke. Koža im je prikrivena sitnim, prema natrag usmjerenim, zubastim strukturama koje se nazivaju plakoidne ljuske ili kožni zubići i na dodir se osjeća poput brusnog papira. Raže imaju razbacane zube te im je nepce prekriveno plosnatim zubima za drobljenje hrane. Neke raže imaju povećane zube koje tvore i bodlje dok cjeloglavke nemaju zuba. Za razliku od koštunjača , hrskavičnjače ne posjeduju plivaći mjehur, a morski psi koji žive u otvorenom oceanu često imaju veliku jetru bogatu uljem koja pomaže održavanju u vodenom stupcu (Helfman i sur., 2009).

Tijelo morskog psa je glatko i hidrodinamično, repna peraja asimetrična te pri kretanju ribe doprinosi sili uzgona, dok su parne trbušne peraje smještene natrag. Usta su smještena sa donje strane i sa svake strane imaju po pet škržnih proreza. Tijelo raže je plosnato s velikim prsnim perajama. Usta su s donje strane, a voda za njihovo disanje povlači se kroz jedan par rupica (štrcala), koja su smještena na gornjoj strani, a potom prolazi preko škrga (Opačić i sur., 2006).

1.4.1. Ugroženost hrskavičnih riba

Svjetska udruga za zaštitu prirode (eng. The World Conservation Union, IUCN) osmislila je određene kriterije putem kojih se vrste svrstavaju u kategorije ugroženosti (Slika 10.) kako bi se upozorilo i poduzelo pravilne mjere za zaštitu vrste.



Slika 10. Kategorizacija putem koje se uvrštava određena vrsta u skupine i prikazuje njezino trenutačno stanje (preuzeto sa IUCN 10.09.)

Populacija morskih pasa globalno se smanjila za oko 50-80% od 1970-ih godina. Nadalje se trend nastavljao osobito kada se ribarstvo ubrzalo i povećala potražnja za njihovim perajama (Rose, 1996.). Danas skupina hrskavičnih riba, pa tako i morski psi, najugroženija su skupina riba u Sredozemlju. Prema IUCN-u 31 vrsta je klasificirana u ugrožene kategorije (CR,EN, VU; slika 7.) od čega je 14 kritično ugroženo (CR). Razlozi koji su doveli k tome su intenzivni ribolov različitim ribolovnim alatima i snazi, a koji se i dalje unaprjeđuju za još bolji ulov željene ribe, pa morski psi mogu biti ulovljeni slučajnim ulovom (eng. bycatch), a njihovi biološki čimbenici poput male stope reprodukcije , relativno male gustoće populacije, spori rast, ograničeno rasprostranjenje niti ne mogu dozvoliti njezin potpuni oporavak u populaciji. Osim ulova prijetnja hrskavičnjačama je i gubitak staništa onečišćavanjem mora, uznemiravanjem, te eutrofikacija područja (dzzp, pristupljeno 8.9.2017).

1.4.2. Konzervacija riba hrskavičnjača

Osim proglašenja određenih hrskavičnih riba zaštićenima i strogo zaštićenima što može utjecati na osviještenje ljudi na kritičnu situaciju u kojoj se nalaze ove vrste, također je potrebno i upravljati ulovljenima ribljim stokovima i stokovima morskih pasa. Upravitelji ribarenja mogu predvidjeti budući oporavak u populaciji osnovano na postojećem reproduktivnom stoku što se koristi za pojedine komercijalne vrste, a hrskavične vrste ostaju jedna od najmanje reguliranih vrsta u komercijalnoj ribolovnoj aktivnosti u svijetu. Planovi upravljanja su predstavljeni mnogim zemljama ali još nisu implementirani. No i s implementacijom, konzervacija i oporavak morskih pasa je izuzetno zahtjevan zbog njihove biologije. Lokalno upravljanje nije dovoljno za njihovu zaštitu i oporavak populacije jer mnoge vrste prelaze velike udaljenosti. (Helfman i sur., 2009).

2. CILJ RADA

- Cilj ovog rada je konstrukcija filogenetskog stabla odabranih najčešćih jadranskih riba hrskavičnjača na osnovu nukleotidnih sljedova molekularnog markera Citokrom oksidaza podjedinica I (COI ili COXI) te evaluacija dobivenih rezultata usporedbom s opće prihvaćenom sistematikom riba hrskavičnjača.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Odabir uzoraka

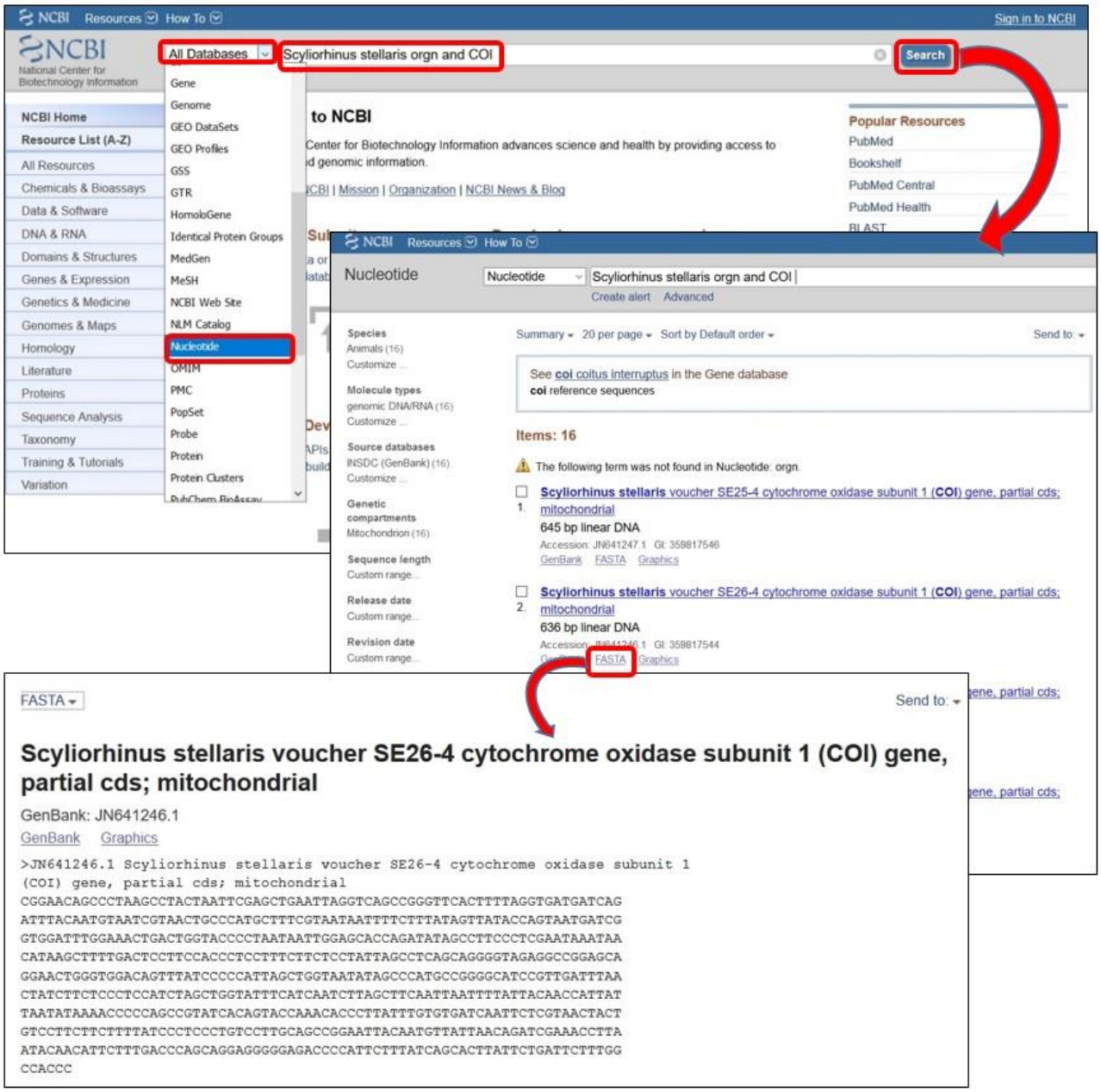
Unutar istraživačkog rada kao uzorak je izabrano 12 vrsta najčešćih riba hrskavičnjača (razred Chondrichthyes) u Jadranskom moru podijeljenih unutar 6 taksonomskih redova Carcharhiniformes, Lamniformes, Rajiformes, Myliobatiformes, Squaliformes, Torpediniformes. Vrste su odabrane iz popisa dviju knjiga: „Pod površinom Mediterana“ i „Nove ribe Jadranskog i Sredozemnog mora“. Za bolje odvajanje hrskavičnih vrsta unutar filogenetskog stabla korištene su tri udaljenije sistematske skupine (*Paracentrotus lividus, Petromyzon marinus, Clavelina lepadiformis*) koje ne spadaju u bliske srodnike predstavljenih riba (eng. outgroup). Internetska stranica WoRMS (eng. World Register of Marine Species) poslužila je pri provjeravanju ispravnosti latinskog naziva vrste i trenutačne sistematike.

Dostupnost COI molekularnih markera 12 najčešćih hrskavičnih vrsta riba i tri udaljene vrste pregledani su na internetskim stranicama nukleotidne banke podataka američkog Nacionalnog centra za biotehnološke informacije (NCBI; eng. National Center for Biotechnology Information) kojoj se pristupilo u periodu od svibnja 2017. do lipnja 2017. godine. Putem iste NCBI internetske stranice također su sakupljeni COI nukleotidni sljedovi (slika 8). Nukleotidni sljedovi su odabrani upisivanjem formule latinski naziv ribe [orgn] and COI u NCBI tražilicu, za svaku vrstu pojedinačno. Primjer: „*Scyliorhinus stellaris [orgn] and COI*“. Prilikom upisivanja formule pretraga je bila ograničena na „*nucleotide“*. Iz dobivenih rezultata odabrani su COI sljedovi sa što manjim ili u potpunosti odsutnim neodređenostima u nukleotidnom slijedu. Nukleotidni slijedovi preuzeti su u FASTA tekstualnom formatu za daljnju obradu.

3.2. Filogenetska analiza

Homologni nukleotidni sljedovi su obrađeni i sravnjeni po parovima (eng. pairwise alignment) i višestruko sravnjeni (multiple alignment) putem ClustalW alata unutar MEGA 7.0.26 verzije programa (eng. Molecular Evolutionary Genetic Analysis) koji sadrži mnoge metode i alate za filogenetske analize. Sravnjeni sljedovi spremljeni su u MEGA formatu zbog mogućnosti daljnje izrade filogenetskog stabla.

Filogenetski odnosi procijenjeni su putem statističke metode susjednog sparivanja (eng. Neighbor Joining method, NJ) baziranom na Kimmura-2 supstitucijskom modelu (Inoue i sur, 2010). Supstitucijski model je postavljen na jednakom broju transverzija i tranzicija. U metodi susjednog sparivanja korišteno je samoučitavanje (eng. bootstrap) od 500 ponavljanja kao podrška grananja unutar stabla izražena u postocima.



Slika 11. Postepeni koraci pri odabiranju COI slijeda putem NCBI nukleotidne baze podataka

4. REZULTATI

4.1. Odabrani uzorci

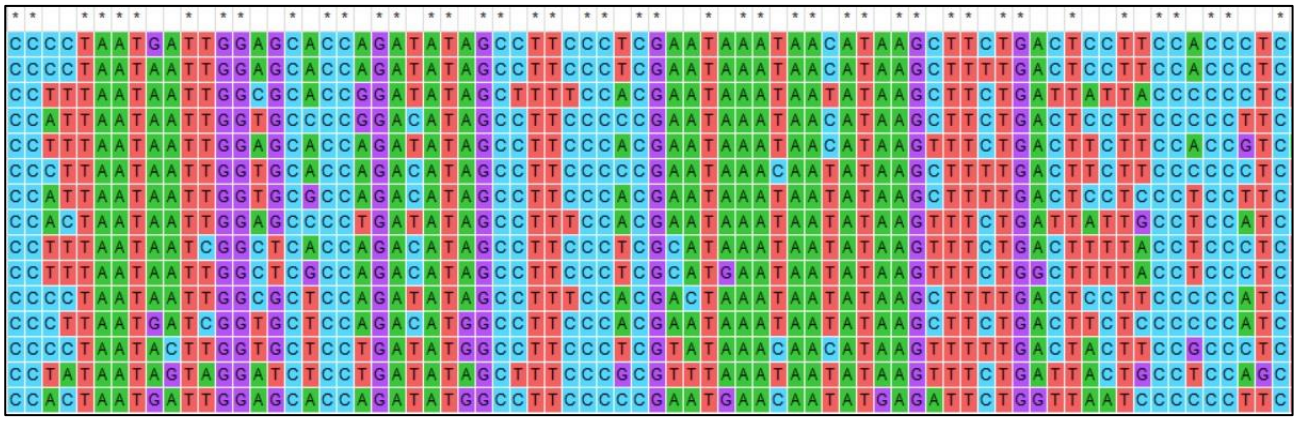
Pretragom NCBI nukleotidne baze podataka odabrani su COI nukleotidni sljedovi vrsta prikazanih u tablici 2. Potpuni nukleotidni sljedovi dostupni su u prilogu 1. Izabrani su COI nukleotidni sljedovi u rasponu od 617 do 675 parova baza, a najčešći su sljedovi duljine 652 parova baza.

Tablica 2. Latinski naziv i hrvatski nazivi odabranih najčešćih hrskavičnih riba u Jadranskom moru podijeljenih u redove i njihov NCBI pristupni kod

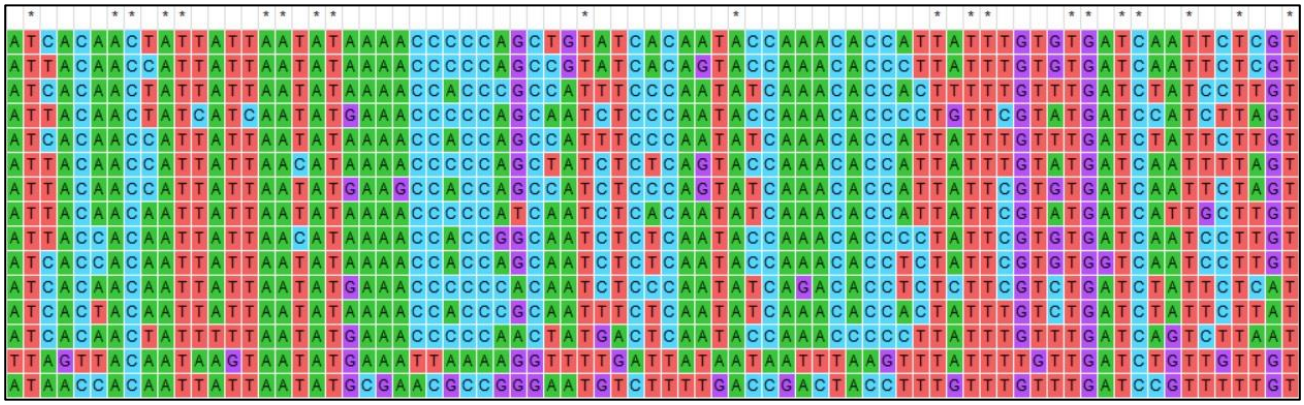
No.	Hrskavične vrste korištene za izradu filogenetskog stabla	Hrvatski naziv	NCBI pristupni kod
	RED Carcharhiniformes		
1	*Scyliorhinus canicula* Linnaeus, 1758	Mačka bljedica	JN641243.1
2	*Scyliorhinus stellaris* Linnaeus, 1758	Mačka mrkulja	JN641247.1
	RED Squaliformes		
3	*Oxynotus centrina* Linnaeus, 1758	Pas prasac	KT307364.1
	RED Lamniformes		
4	*Carcharodon carcharias* Linnaeus, 1758	Velika bijela psina	KM212005.1
5	*Carcharhinus longimanus* Poey, 1861	Pas trupan oblokrilac	GU440259.1
6	*Carcharias taurus* Rafinesque, 1810	Psina zmijozuba, trošiljka	JF493075.1
7	*Cetorhinus maximus* Gunnerus, 1765	Psina golema	KT307170.1
	RED Torpediniformes		
8	*Torpedo marmorata* Risso, 1810	Drhtulja šarulja	KT307466.1
	RED Rajiformes		
9	*Raja clavata* Linnaeus, 1758	Raža kamenica	KJ709867.1
10	*Raja miraletus* Linnaeus, 1758	Raža modropjega	JF494348.1
	RED Myliobatiformes		
11	*Dasyatis pastinaca* Linnaeus, 1758	Šiba žutulja	KT307197.1
12	*Myliobatis aquila* Linnaeus, 1758	Golub kosir	JF493930.1
	Outgroup		
13	*Paracentrotus lividus,* Lamarck, 1816	Crni ježinac	KF369173.1
14	*Petromyzon marinus,* Linnaeus, 1758	Paklara	AY603104.1
15	*Clavelina lepadiformis,* Müller, 1776	Plaštenjak	JN028190.1

4.2. Filogenetska procjena

Višestrukim sravnjivanjem (eng. multiple alignment) COI sljedova u MEGA 7.0.26 računalnom programu putem ClustalW alata dobiveno je sravnjenje u kojem su vidljiva konzervirana područja i varijabilnost trećeg nuklotida prema oznakama(*) u gornjem dijelu slike 12. i područja manje konzerviranosti, odnosno veće raznolikosti nukleotidnog sljeda (slika 13).



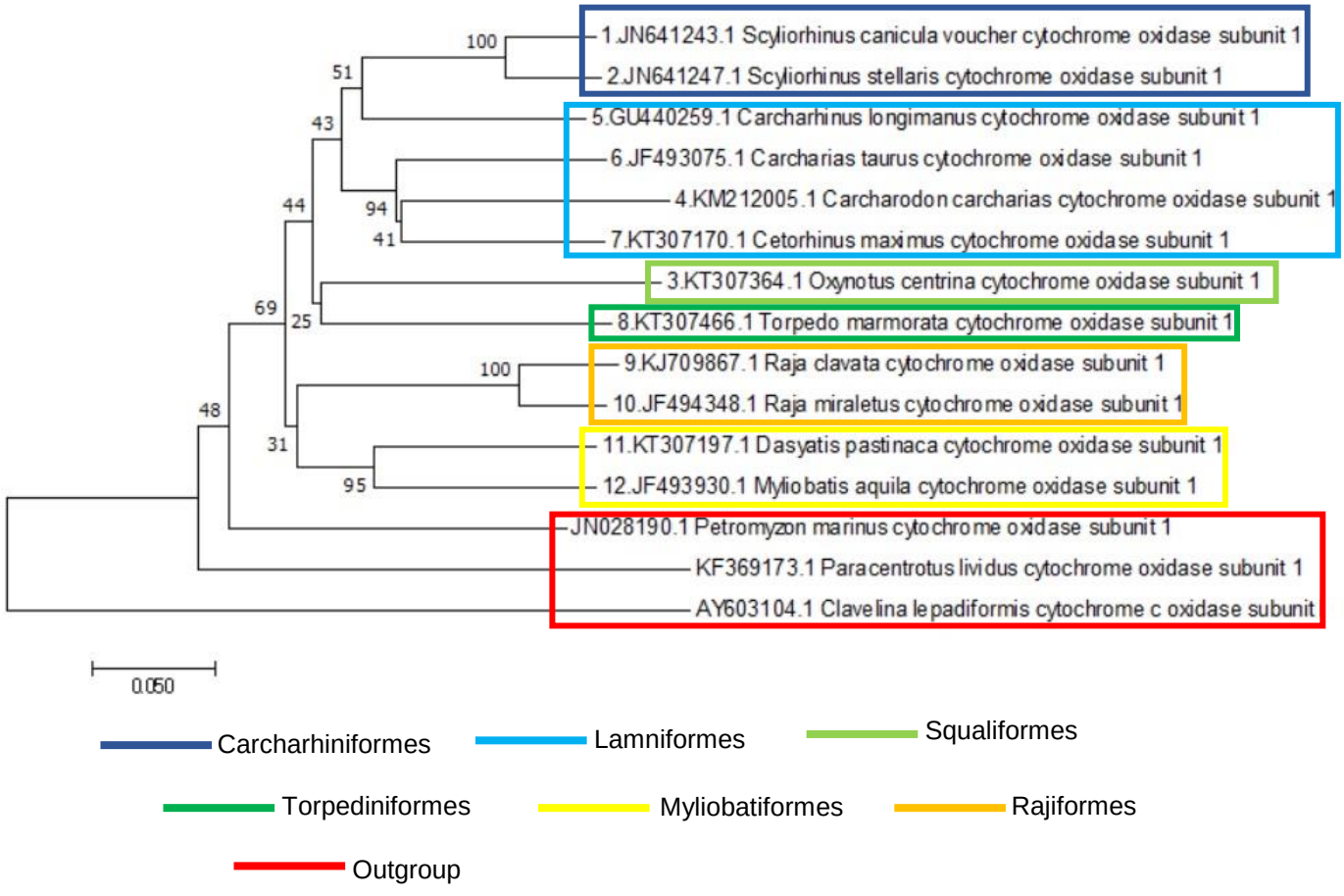
Slika 12. Dio višestruko poravnatih (eng. multiple alignment) COI sljedova određeno pomoću ClustalW alata u MEGA softwareskom programu. Oznake (*) iznad poravnatih sljedova pokazuju mjesta potpune konzerviranosti.



Slika 13. Dio višestruko poravnatih (eng. multiple alignment) COI sljedova određeno putem ClustalW alata u MEGA softwareskom programu. Oznake (*) iznad poravnatih sljedova pokazuju mjesta potpune konzerviranosti.

COI sljedovi hrskavičnih riba grupiraju se u 7 skupina od kojih jedna predstavlja udaljenije srodnike (eng. outgroup), a preostalih 6 skupina označavaju sistematsku podjelu hrskavičnih riba prema redovima. Vrste *Scyliorhinus canicula* i *S. stellaris* zajedno su se odvojile u red Carcharhiniformes kao i vrste *Carcharodon carcharias, Carcharias taurus, Cetorhinus maximus* u red Lamniformes, *Raja clavata* i *R. miraletus* u red Rajiformes te *Dasyatis pastinaca* i *Myliobatis aquila* u red Myliobatiformes. Redovi koju su imali samo jednog predstavnika u svojoj skupinu su Squaliformes sa vrstom *Oxynotus centrina* i Torpediniformes sa vrstom *Torpedo marmorata* (slika 11).

Metodom susjednog sparivanja (NJ) rezultirale su filogenetskim stablom sa bootstrap podrškom većinom od 40%.



Slika 14. Filogenetsko stablo dobiveno metodom susjednog sparivanja (NJ) pomoću COI gena. Na granama su označene bootstrap vrijednosti. Duljina grana je sukladna broju supstitucijskih promjena (mjerilo označava 0,050 supstitucija po nukleotidu).

5. RASPRAVA

Ovim istraživačkim radom korišteni COI sljedovi pokazali su pravilno formiranje filogenetskog stabla procijenjenog putem statističke metode susjednog sparivanja (NJ) baziranom na Kimmura-2 supstitucijskom modelu čija se pouzdanost u identifikaciji bliskih vrsta općenito iskazala učinkovitom (Hebert i sur., 2003).

U sravnjenim sljedovima koji kodiraju za proteinski sljed podjedinice I citokrom oksidaze jasno je vidljiva najveća varijabilnost na svakom trećem mjestu nukleotidnih sljedova, što je posljedica degeneriranosti genetičkog koda. Drugim riječima, velik udio varijabilnosti sravnjenih nukleotidnih sljedova nalazimo na trećem mjestu u kodonima koji kodiraju za istu aminokiselinu što u konačnici ne utječe na funkcionalnost eksprimiranog proteina (Cooper i Hausman, 2004).

Filogenetsko stablo dobiveno metodom susjednog sparivanja (NJ) putem MEGA računalnog programa sa 500 bootstrap ponavljanja formiralo se u očekivane skupine sistematizirane prema redovima. Stablo se većinom slaže sa opće prihvaćenom sistematikom hrskavičnih riba (Stiassny i sur., 2004) osim podrazreda Batoidea gdje su redovi Myliobatiformes, Squaliformes i Torpediniformes u drugačijem poretku od referentne sistematike. Naime postoje drugačije podjele i predstavljanja sistematika podrazreda Batoidea unutar razreda Chondrichthyes (Rocco i sur., 2006). Prema morfološkoj podijeli po Stiassny-u i sur iz 2004 podrazred Batoidea nije u potpunosti definiran čime su razlika i položaj u bilo kojoj drugoj podijeli prihvatljive. Uglavnom se smatra da su vrste iz reda Torpediniformes udaljenije od ostalih vrsta u filogenetskom stablu što je dosljedno ranijim hipotezama i nedavnim prikazima da su Torpediniformes nejvjerojatnije sestrinska skupina ostalih Batoidea (Rocco i sur., 2006)

6. ZAKLJUČAK

- Među najčešćim vrstama riba koje obitavaju u Jadranskom moru vrlo je malo riba hrskavičnjača (razred Chondrichthyes).
- COI molekularni marker pokazao je dobro svojstvo u određivanju filogenetskog odnosa hrskavičnih vrsta.
- Filogenetsko stablo sa uzorcima od 12 vrsta hrskavičnih riba i 3 udaljenije vrste detektiralo je filogenetske odnose koji su u skladu sa opće prihvaćenom sistematikom hrskavičnjača po Stiassny i sur. (2004).

7. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli Završni rad

Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru

Filogenija najčešćih jadranskih riba hrskavičnjača (razred Chondrichthyes) temeljena na strukturi citokrom oksidaze I

Matteo Benussi

SAŽETAK

Molekularna filogenija ima veliki značaj i primjenu u određivanju evolucijskih odnosa između organizama te praćenje zajedničkog pretka što bi svakako promjenilo pojedine podjele unutar sistematike i takonomije kao što se to i zbiva. Mitohondrijska DNA Citokrom oksidaza podjedinica I kao jedan od molekularnih marker koji se koristi u molekularnoj filogeniji za izradu filogenetskog stabla ima veliku važanost u današnje vrijeme za identifikaciju vrsta. Njegova povoljna svojstva pogoduju za određivanje sličnosti i razlika te udaljenosti određenih vrsta. Ribe hrskavičnjače (razred Chondrichthyes) su jedna od rjeđih pojava u Jadranskom moru. Razlog tome stoji u smanjenju populacija vrsta koje se događa globalno. Kako bi se pratio filogenetski odnos hrskavičnih riba uzete su vrste koje najčešće dolaze u Jadransko more. Nukleotidni sljedovi odabranih hrskavičnih vrsta su preuzeti iz NCBI nukleotidne banke i obrađeni u MEGA 7 računalnom programa sa ClustalW alatom za sravnjivanje. Za izradu filogenetskog stabla koristila se Neighbor-Joining metoda. Finalni rezultat bilo je očekivano filogenetsko stablo koje se podudaralo sa trenutačno opće prihvaćenom sistematikom. Red Batoidea jedini su pokazali iznimku različitog poretka od uobičajene sistematike prema Stiassny.

Rad je pohranjen u knjižnicama Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli. Izvornik je na hrvatskom jeziku (44 stranica, 14 slika, 2 tablica, 34 literaturnih navoda).

Ključne riječi: molekularni marker, molekularna filogenija, filogenetsko stablo, Citokrom oksidaza podjedinica I, hrskavičnjače (Chondrichthyes)

Mentor: Dr. sc. Mauro Štifanić

Ocjenjivači: Dr. sc. Mauro Štifanić

Dr. sc. Emina Pustijanac

Dr. sc. Daniel Mark Lyons

Datum obrane: 21.09.2017.

8. BASIC DOCUMENTATION CARD

Juraj Dobrila University of Pula Bachelor thesis

University Undergraduate Study Programme – Marine Sciences

Phylogeny of common Adriatic Cartilaginous (class Chondrichthyes) based on Cytocrom Oxydase I structure

Matteo Benussi

ABSTRACT

Molecular phylogeny has great importance and application in determining evolutionary relationships between organisms and monitoring of a common ancestor, which would certainly change certain divisions within systematics and takonomy as it does. Mitochondrial DNA Cytocrom Oxydase Subunit I as one of the molecular markers used in molecular filogenesis for the building of a phylogenetic tree, it has great importance today for species identification. Its extremely conserved sequence is one of the features that helps to determine the similarities and differences and the distances of certain species. Chondrichthyes is one of the rarest phenomena in the Adriatic Sea. The reason for this is to reduce species populations that are happening globally. In order to monitor the phylogenetic relationship of crustacean fish, the species are most commonly found in the Adriatic Sea. The nucleotide sequences of selected cartilage species were taken from the NCBI nucleotide bank and processed in the MEGA 7 computer program with the ClustalW alignment tool. The Neighbor-Joining method was used for filogenetic tree making. The final result was the expected phylogenetic tree that coincided with the currently universally accepted systematics. The Order Batoids are the only ones to show the exception of a different order of ordinary systematics twards Stiassny.

This thesis is deposited in the Library of Juraj Dobrile University of Pula. Original in Croatian (44 pages, 14 figures, 2 tables, 34 references).

Key words: molecular marker, molecular phylogenetics, phylogenetic tree, Cytocrom Oxydase I, Cartilaginous (Chondrichthyes)

Supervisor: Dr. sc. Mauro Štifanić

Reviewers: Dr. sc. Mauro Štifanić

Dr. sc. Emina Pustijanac

Dr. sc. Daniel Mark Lyons

Thesis defence: 21.09.2017.

9. LITERATURA

Al-Samarai R. F. i Al-Kazaz A. A. (2015.) Molecular Markers: an Introduction and Applications. *European Jornal of Molecular Biotechnology*. Vol. 9. str 118-130.

Bačić, T., Erben, R. i Krajačić M. (2003.) *Raznolikost živog svijeta; udžbenik biologije za drugi razred gimnazije*. Zagreb: Školska knjiga.

Brasier, M. (2009.) Mikroorganizmi. U Maljković, Z. (ur.). *Prapovijest- Sveobuhvatna ilustrirana povijest života na Zemlji.* Hrvatsko izdanje Grupa Mladinska knjiga, 2015, Zagreb: Mozaik knjiga .

Cooper, M. G. i Hausman, E.R. (2004.) *Stanica-molekularni pristup*. Treće izdanje. Zagreb: Medicinska naklada Zagreb.

Dulčić, J., Dragičević B. (2011.) *Nove ribe Jadranskog i Sredozemnog mora*. Zagreb: Institut za Oceanografiju i ribarstvo.

Dulčić, J., Soldo, A., Jardas, I. (2005.) Adriatic fish biodiversity and review of bibliography related to Croatian small-scale coastal fisheries. Adriatic Sea Small-Scale Fisheries. 103.

Girotti M. (1990.) *Ape regina; Biologia e selezione- Tecniche di allevamento- Utilizzo e mercato*. Milano: Ulrico Hoepli Editore.

Hebert, D. N. P., Ratnasingham, S. i deWaard R. J. (2003.) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related specie. *The Royal Society*; biology letters. 270 str. 96-99.

Helfman, S. G., Collette, B. B., Facey E. D. i Bowen W. B. (2009.) *The Diversity of Fishes; Biology, Evolution and Ecology*. Drugo izdanje. Oxford: Wiley-Blackwell

Inoue, G. J., Miya, M., Lam, K., Tay, B., Danks, A. J., Bell, J., Walker, I. T. i Venkatesh, B. (2010) Evolutionary Origin and Phylogeny of the Modern Holocephalans (Chondrichthyes: Chimaeriformes): A Mitogenomic Perspective. *Mol. Biol. Evol.* 27(11): 2576-2586.

Jelenić, S., Kerovec, M., Ternjej. I. i Mihaljević, Z. (2004.) *Biologija 4; Genetika, ekologija, evolucija; udžbenik iz biologije za četvrti razred gimnazije*. Drugo izdanje. Zagreb: Profil.

Jukes, T.H., i Cantor, C.R. (1969) Evolution of Protein Molecules. New York: *Academic Press*. Str. 21–132.

Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences". *Journal of Molecular Evolution*. vol 16. str. 111–120.

Lambert, D., Naish, D. i Wyse, Elizabeth. (2001.) *Encyclopedia of Dinosaurs and Prehistoric Life*. London: Dorling Kindersley Limited.

Liò, P. i Goldman, N. (1998.) Models of Molecular Evolution and Phylogeny. *Genome Res*. 8: 1233-1244.

Milišić, N. (2007.) *Sva riba Jadranskog mora.* Prvi dio. Split: Sveučilišna knjižnica u Splitu.

Nei, M. i Kumar, A. (2000.) *Molecular Evolution and Phylogenetics.* Oxford: University Press

Opačić, J. V. (2006.) *Ocean- velika ilustrirana enciklopedija*. Hrvatsko izdanje Grupa Mladinska knjiga, 2010, Zagreb: Mozaik knjiga.

Palmer, D. (2009.) Mlada Zemlja. U Maljković, Z. (ur.). *Prapovijest- Sveobuhvatna ilustrirana povijest života na Zemlji.* Hrvatsko izdanje Grupa Mladinska knjiga, 2015, Zagreb: Mozaik knjiga .

Radonić, M. M., Šimunović, V. S. i Markota, Š. Z. (2001.) *Monera, protisti, gljive, biljke; biologija; udžbenik za drugi razred gimnazije*. deveto izdanje. Zagreb: Profil.

Rannala, B. i Yang, Z. (2012.) Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nature Reviews. Genetics*. Vol. 13. str. 303-314.

Rocco, L., Liguori, I., Costagliola, D., Morescalchi, A. M., Tinti, F. i Stingo, V. (2006). Molecular and karyological aspects of Batoidea (Chondrichthyes, Elasmobranchi) phylogeny. *Science Dircect* [Online], vol 389. [Pristupljeno:12.9.2016.]

Rosenblatt, R. (2001.) Ribe. U Borovac I. (ur). Životinje- *Velika ilustrirana enciklopedija*. Zagreb: Mozaik knjiga.

Tamura, K. (1992). Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C content biases. *Molecular Biology and Evolution* 9 (4) str. 678–687.

Turk, T. (2011). *Pod površinom Mediterana*. Zagreb: Školska knjiga.

Collard, Y. C. B.. Jahufer, Z. Z. M. Brouwer, B. J. i Pang, E. C. K. (2004) An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. Euphytica vol 142: 169–196.

MREŽNE STRANICE

Bioinformatic.org [Online] Dostupno na:

https://www.bioinformatics.org/sms/iupac.html
[Pristupljeno:12.9.2017.]

BiologyStackExchange. [Online] Dostupno na:

https://biology.stackexchange.com/questions/17640/genes-chromosomes-base-pairs-and-the-23-pairs

[Pristupljeno:12.9.2017.]

Državni zavod za zaštitu prirode. [Online] Dostupno na:
http://www.dzzp.hr/novosti/k/morski-psi-i-ostale-hrskavicnjace-u-jadranu-1111.html
[Pristupljeno:8.9.2017.]

Encyclopeddia Britannica. [Online] Dostupno na:
https://www.britannica.com/science/phylogeny

[Pristupljeno:8.9.2017.]

GetMedEdu. [Online] Dostupno na:

http://www.getmededu.com/differences-between-prokaryotic-and-eukaryotic-cells.html

[Pristupljeno:9.9.2017.]

MedicalXpress. [Online] Dostupno na:

https://medicalxpress.com/news/2015-01-mitochondrial-mutations.html

[Pristupljeno:12.9.2017.]

Mrežni udžbenik iz genetike. [Online] Dostupno na:

http://www.genetika.biol.pmf.unizg.hr/pogl1.html

[Pristupljeno:9.9.2017.]

Quizlet. [Online] Dostupno na:
https://quizlet.com/1650531/taxonomy-flash-cards/
[Pristupljeno:12.9.2017.]

Zaštita-prirode.hr. [Online] Dostupno na:

http://www.zastita-prirode.hr/Novosti-i-dogadanja/Morski-psi-i-ostale-hrskavicnjace-u-Jadranu

[Pristupljeno:12.9.2017.]
IUCN Red List [Online] Dostupno na:
http://www.iucnredlist.org/technical-documents/categories-and-criteria/2001-categories-criteria

[Pristupljeno:9.9.2017.]

NCBI [Online] Dostupno na:
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
[Pristupljeno:12.3.2017.]

MEGA [Online] Dostupno na:
http://www.megasoftware.net/
[Pristupljeno:12.3.2017.]

PRILOZI

Popis slika

Slika 1. Geološka kronologija (McNamara i sur.,2015)

[Preuzeto: Palmer, D. (2009.) Mlada Zemlja. U Maljković, Z. (ur.). *Prapovijest-Sveobuhvatna ilustrirana povijest života na Zemlji.* Hrvatsko izdanje Grupa Mladinska knjiga, 2015, Zagreb: Mozaik knjiga .]

Slika 2. Prikaz Miller-Uryjevog eksperimenta spontanog formiranja organskih molekula (Cooper i Hausman, 2004)

[Preuzeto: Cooper, M. G. i Hausman, E.R. (2004.) *Stanica-molekularni pristup*. Treće izdanje. Zagreb: Medicinska naklada Zagreb.]

Slika 3. Prokariotska ili bakterijska stanica (lijevo) i Eukariotska desno stanica, njihova građa i razlike

[Preuzeto:http://www.getmededu.com/differences-between-prokaryotic-and-eukaryotic-cells.html]

(Pristupljeno: 9.9.2016.)

Slika 4. Prikaz nastanka složenijih eukariotskih stanica (Braseir i sur.,2009)

[Preuzeto: Brasier, M. (2009.) Mikroorganizmi. U Maljković, Z. (ur.). *Prapovijest-Sveobuhvatna ilustrirana povijest života na Zemlji.* Hrvatsko izdanje Grupa Mladinska knjiga, 2015, Zagreb: Mozaik knjiga .]

Slika 5. Prikaz strukture DNA i gena

[Preuzeto: https://biology.stackexchange.com/questions/17640/genes-chromosomes-base-pairs-and-the-23-pairs]

(pristupnjeno 12.9.)

Slika 6. Prikaz građe mitohondrija i mitohondrijskog genoma i položaj COI gena u genomu

[Preuzeto: https://medicalxpress.com/news/2015-01-mitochondrial-mutations.html]

(Pristupljeno 12.9.)

Slika 7. Prikaz kladograma i dijelovi filogenetskog stabla (Lio i Goldman, 1998.)

[Preuzeto: Liò, P. i Goldman, N. (1998.) Models of Molecular Evolution and Phylogeny. *Genome Res*. 8: 1233-1244.]

Slika 8. Markov model suptitucije nukleotida (Yang i sur.,2012).

[Preuzeto: Rannala, B. i Yang, Z. (2012.) Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nature Reviews. Genetics*. Vol. 13. str. 303-314.]

Slika 9. Filogenetski odnos između razreda Chondrichthyes (Stiassny i sur., 2004)

[Preuzeto: Helfman, S. G., Collette, B. B., Facey E. D. i Bowen W. B. (2009.) *The Diversity of Fishes; Biology, Evolution and Ecology*. Drugo izdanje. Oxford: Wiley-Blackwell]

Slika 10. Kategorizacija putem koje se uvrštava određena vrsta u skupine i prikazuje njezino trenutačno stanje

[Preuzeto: https://www.bioinformatics.org/sms/iupac.html]
(Pristupljeno: 12.9.2016.)

Slika 11. Postepeni koraci pri odabiranju COI slijeda putem NCBI nukleotidne baze podataka

Slika 12. Dio konzerviranih višestruko poravnatih (eng. multiple alignment) COI sljedova

Slika 13. Dio manje konzerviranih višestruko poravnatih (eng. multiple alignment) COI sljedova

Slika 14. Filogenetsko stablo dobiveno metodom susjednog sparivanja (NJ) pomoću COI gena

Popis tablica

Tablica 1. Oznake neodređenosti u slijedu nukleotida prema IUPAC-u

[Preuzeto: https://www.bioinformatics.org/sms/iupac.html]

(Pristupljeno:12.9.2016.)

Tablica 2. Latinski naziv i hrvatski naziv odabranih najčešćih hrskavičnih ribe u Jadranskom moru podijeljenih u redove i njihov NCBI iz

Prilog 1. Sljedovi Citokrom oksidaze podjedinice I (COI) milekularnog markera sa latinskim nazivom vrste. NCBI izvorom i brojem parova baza. Brojevi sa lijeve strane predstavljaju početni broj prve baze u nizu

Latinski naziv vrste	**NCBI izvor**	**Parovi baza**
Scyliorhinus canicula	JN641243.1	675

```
   1 tacttaatct ttggtgcatg agcaggcata gtcggaacag ccctaagcct cctaattcga
  61 gctgagttag gtcagccggg ttcactttta ggggatgatc agatttataa tgtaatcgta
 121 actgcccatg ctttcgtaat aatcttcttt atagttatgc cagtaataat tggcggattt
 181 gggaattgac tagtacccct aatgattgga gcaccagata tagccttccc tcgaataaat
 241 aacataagct tctgactcct tccaccctcc tttctcctcc tattagcttc agcaggggta
 301 gaagctgggg cagggactgg atgaacagtc taccccccat tagctggtaa tatagctcat
 361 gcgggagcat ccgttgattt aactatcttc tctctccacc tagctggtat ttcatcaatt
 421 ttagcttcaa ttaattttat cacaactatt attaatataa aacccccagc tgtatcacaa
 481 taccaaacac cattatttgt gtgatcaatt ctcgtgacta ccgtccttct tcttctatcc
 541 ctccctgtcc ttgcagccgg aattacaata ttgttaacag atcgaaatct taatacaaca
 601 ttctttgacc cagcaggagg aggagatcct attctttatc agcacttatt ctgattcttt
 661 ggccacccag aaatc
```

Scyliorhinus stellaris	JN641247.1	645

```
   1 cggaacagcc ctaagcctac taattcgagc tgaattaggt cagccgggtt cacttttagg
  61 tgatgatcag atttacaatg taatcgtaac tgcccatgct ttcgtaataa ttttctttat
 121 agttatacca gtaatgatcg gtggatttgg aaactgactg gtacccctaa taattggagc
 181 accagatata gccttccctc gaataaataa cataagcttt tgactccttc caccctcctt
 241 tcttctccta ttagcctcag caggggtaga ggccggagca ggaactgggt ggacagttta
 301 tcccccatta gctggtaata tagcccatgc cggggcatcc gttgatttaa ctatcttctc
 361 cctccatcta gctggtattt catcaatctt agcttcaatt aattttatta caaccattat
 421 taatataaaa cccccagccg tatcacagta ccaaacaccc ttatttgtgt gatcaattct
 481 cgtaactact gtccttcttc ttttatccct ccctgtcctt gcagccggaa ttacaatgtt
 541 attaacagat cgaaacctta atacaacatt ctttgaccca gcaggagggg gagaccccat
 601 tctttatcag cacttattct gattctttgg ccccccaaaa ttcta
```

Oxynotus centrina	KT307364.1	648

```
   1 cctttacttg atttttggtg catgagcagg aatagtaggt acagccctta gtttacttat
  61 tcgaacagaa ttaagccaac ctggtacact tttaggagat gaccaaatct acaatgttat
 121 tgtaactgct cacgctttcg tgataatctt ctttttagta atgcctgtaa taattggtgg
 181 gtttgggaat tggctagtgc ctttaataat tggcgcaccg gatatagctt ttccacgaat
 241 aaataatata agcttctgat tattaccccc ctctctcctt ttacttctag cctccgctgg
 301 tgtagaagcg ggagccggaa ccggatgaac agtatatccc cctcttgcga gcaatatagc
 361 tcacgcagga gcatctgtag atttagccat cttttccctt catttggccg gtatttcctc
 421 gattctagcc tctattaatt ttatcacaac tattattaat ataaaaccac ccgccatttc
 481 ccaatatcaa acaccacttt ttgtttgatc tatccttgta actactgtcc tcctcctcct
 541 agcccttccc gtccttgcag ccgcaattac aatattatta actgaccgta atttaaacac
 601 aacgtttttt gatcccgcag gaggaggaga ccccatcctc tatcaaca
```

Carcharodon carcharias	KM212005.1	652

```
   1 cctttattta atttttggtg catgagcagg aatagtggga acagccctaa gccttttaat
  61 ccgtgccgag ctgggtcaac caggttccct cctcggagat gaccagattt ataatgttat
 121 tgtgaccgcc catgccttcg taataatctt cttcatggta atgcccatca taattggggg
 181 ttttgggaat tgactaatcc cattaataat tggtgccccg gacatagcct tcccccgaat
 241 aaataacata agcttctgac tccttccccc ttccttttta ctactcctag cttcagccgg
 301 agttgaagca ggagccggca ctggttgaac agtctaccct cccctggccg gtaatttagc
 361 acacgcagga gcatccgttg acctggctat cttctccctt cacctagcag gtatttcctc
 421 aatcttggcc tcaattaact ttattacaac tatcatcaat atgaaacccc cagcaatctc
 481 ccaataccaa acacccctgt tcgtatgatc catcttagta acaaccatcc ttcttctcct
 541 agcccttcca gtgctcgcag ccggcatcac aatgttactt actgaccgaa atctaaacac
 601 aacattcttt gatccagcag gaggaggaga ccctattctc taccaacatc tt
```

Carcharhinus longimanus	GU440259.1	652

```
   1 cctttaccta atttttggtg catgagcagg tatagttgga acagccctaa gtctcctaat
  61 tcgagctgaa cttgggcaac ctggatcact tttaggagat gatcagattt ataatgtaat
 121 cgtaaccgcc cacgcttttg taataatctt tttcatggtt ataccaatta taattggtgg
 181 tttcggaaat tgattagtcc ctttaataat tggagcacca gatatagcct tcccacgaat
 241 aaataacata agtttctgac ttcttccacc gtcatttctt ctccttctcg cctctgctgg
 301 agtagaggct ggagcaggta ctggttgaac agtttatcct ccattagcta gcaacctagc
 361 acatgctgga ccatctgttg atttagctat tttctctctt cacttagccg gtgtttcatc
 421 aattttagct tcaattaatt ttatcacaac cattattaat ataaaaccac cagccatttc
 481 ccaatatcaa acaccattat ttgtttgatc tattcttgta accactattc ttcttctcct
 541 ctcacttcca gttcttgcag cagggattac aatattactt acagaccgta accttaatac
 601 tacattcttt gatcctgcag gtggaggaga cccaatcctt tatcaacatt ta
```

Carcharias taurus	JF493075.1	652

```
   1 cctatactta atctttggtg catgagcagg aatagtagga acagccctaa gccttctaat
  61 tcgagctgaa ctaggacaac ccggatcact cctaggagat gatcagatct ataatgttat
 121 tgtaaccgcc catgcatttg taataatttt cttcatggtt atacctgtaa taattggtgg
 181 attcggaaac tgactagtgc ccttaataat tggtgcacca gacatagcct tcccccgaat
 241 aaacaatata agcttttgac ttcttccccc ctcttttctt ttactcctag cttcagctgg
 301 agtcgaagct ggagccggca ccggttgaac ggtgtatcct cctttagccg gtaacttagc
 361 ccatgccgga gcatccgttg acttagctat cttttctctt catttagcag gcatttcatc
 421 aatcttagcc tcaatcaact tcattacaac cattattaac ataaaacccc cagctatctc
 481 tcagtaccaa acaccattat ttgtatgatc aattttagta acaactatcc tcctccttct
 541 atcccttcca gtacttgcag ctggtatcac tatacttctt acggaccgaa acttaaacac
 601 aacattcttt gacccggctg ggggaggaga cccaatcctc tatcaacatc ta
```

Cetorhinus maximus	KT307170.1	635

```
   1 agtagggaca gccctaagcc tcctaattcg agccgaatta ggccaacccg gatcacttct
  61 tggtgatgat caaatttata atgttattgt gacagctcat gcatttgtaa taatcttctt
 121 catggttata cccgtaataa ttgggggttt tgggaactga ttagtaccat taataattgg
 181 tgcgccagac atagccttcc cacgaataaa taatataagc ttttgactcc tccctccttc
 241 ttttctctta ctcctggcct cagccggagt tgaagctgga gccggaactg gctgaacagt
 301 ataccctccc ctagctggca atctagcaca cgctggagca tccgttgatt tagccatctt
 361 ttctctccat ttagcaggca tctcatcaat tctagcttca attaacttta ttacaaccat
 421 tattaatatg aagccaccag ccatctccca gtatcaaaca ccattattcg tgtgatcaat
 481 tctagtcaca accatccttc ttcttttagc cctcccagta cttgcagccg gcatcacaat
 541 attgcttacc gatcggaacc taaacacaac attctttgac ccagcagggg gaggggaccc
 601 tattctctac caacacctgt tctgattctt cggtc
```

Torpedo marmorata	KT307466.1	637

```
  1 agcaatagtc ggaacaggat taagcttatt aattcgaaca gaattaagtc agcctggtac
 61 tctcttaggg gatgatcaaa tctataacgt aatcgttact gcccatgctt tcgttataat
121 tttcttcatg gttataccta ttataattgg cggttttggc aattgactaa tcccactaat
181 aattggagcc cctgatatag cctttccacg aataaataat ataagtttct gattattgcc
241 tccatccttt ctccttttac ttgcctcagc aggtgttgaa gcaggagcag gaacagggtg
301 aacagtatat ccaccactcg ccggtaatct tgcacacgca ggagcatccg ttgatttaac
361 cattttctct ctccatttag ccggtatttc ctctatttta gcatcaatta attttattac
421 aacaattatt aatataaaac ccccatcaat ctcacaatat caaacaccat tattcgtatg
481 atcattgctt gtaacaactg ttctactcct cttatcatta ccagttctag cagcagggat
541 tacaatactc ctaacagacc gaaacctcaa caccacattc tttgacccag caggggggagg
601 ggatccaatt ttataccaac atttattctg attcttc
```

Raja clavata	KJ709867.1	652

```
  1 cctctattta atttttggtg cctgagcagg aatggtcgga actggcctaa gccttctaat
 61 ccgagcagaa ctaagtcaac ccgggaccct cctaggtgac gatcagattt ataatgtcat
121 tgttacagcc cacgcccttg taataatctt tttcatggtc ataccaatta tgatcggcgg
181 atttggcaac tgactcgtcc ctttaataat cggctcacca gacatagcct tccctcgcat
241 aaataatata agtttctgac ttttacctcc ctcttttctc ctcctcctgg cctccgctgg
301 ggttgaagcc ggagccggga caggttggac agtctacccc cctctggcag gaaacttagc
361 ccacgccggg gcctccgtag acttaacaat tttctccctc catttggcag gtgtttcatc
421 tattctagcc tccattaact tcattaccac aattattaac ataaaaccac cggcaatctc
481 tcaataccaa acacccctat tcgtgtgatc aatccttgtt acaactgttt tacttcttat
541 agccctcccc gttctagcag ccggcatcac tatgctactc acggatcgta atctcaacac
601 aactttcttt gaccccgctg gaggggggga ccccatccta tatcaacatt ta
```

Raja miraletus	JF494348.1	652

```
  1 cctctattta attttcggtg cctgagcagg aatagtcgga actggcctaa gccttctaat
 61 ccgagcagaa ctaagtcaac ccgggaccct cctaggtgat gatcagattt ataatgtcat
121 tgttacagcc cacgccttcg taataatctt ttttatggtt ataccaatta tgatcggcgg
181 attcggcaac tgactcgtcc ctttaataat tggctcgcca gacatagcct tccctcgcat
241 gaataatata agtttctggc ttttacctcc ctcttttctt cttctcctcg cctccgctgg
301 ggttgaagct ggagccggaa caggttgaac agtctaccca cccctagcag gaaacctagc
361 ccacgccggg gcctccgtag atctaacaat tttctccctt catttggcag gtatctcatc
421 tattctagcc tccattaact tcatcaccac aattattaat ataaaaccac cagcaatctc
481 tcaataccaa acacctctat tcgtgtggtc aatccttgtt acaactgttt tacttctcat
541 agccctacca gtgctagcag ctggcatcac gatactgctc acggatcgca atcttaacac
601 aactttcttt gaccctgctg ggggaggaga tccaattcta tatcaacatt ta
```

Dasyatis pastinaca	KT307197.1	652

```
  1 cctttattta atctttggtg catgagcggg gatagtgggc actggtctca gtctattaat
 61 ccgaaccgaa ttaagccaac caggcgcatt attgggtgat gaccaaatct acaatgtaat
121 tgttaccgcc cacgccttcg taataatttt cttcatagta ataccaatta tgatcggagg
181 atttggtaac tgactagttc ccctaataat tggcgctcca gatatagcct ttccacgact
241 aaataatata agcttttgac tccttccccc atctttcctt ctactactag cctcagcagg
301 agtagaagcc ggagctggca caggatgaac agtttacccc ccattagctg gtaatcttgc
361 acacgccgga gcttccgtag accttgctat cttttctctt cacttagccg gtgtttcctc
421 tattctagca tccattaact ttatcacaac aattattaat atgaaacccc ccacaatctc
481 ccaatatcag acacctctct tcgtctgatc tattctcatt acaacagtcc tccttttact
541 atcactccca gttctggcag caggcattac tatacttctc acagatcgta atcttaacac
601 aaccttcttc gacccagcag gtggaggaga ccccattctt taccaacatc tc
```

Myliobatis aquila	JF493930.1	652

```
   1 cctttacttg atctttggtg catgagcagg gatagtgggt actggcctca gcctactaat
  61 tcgaacagaa ctaagtcaac caggggcctt actgggtgac gaccaaattt ataatgtaat
 121 tgttaccgcc catgcctttg taataatttt cttcatggtc ataccaatca taatcggtgg
 181 gttcggtaat tgactagttc ccttaatgat cggtgctcca gacatggcct tcccacgaat
 241 aaataatata agcttctgac ttctcccccc atcttttctt ctactactag cctcagcagg
 301 ggtagaggcc ggagctggca ctgggtgaac agtttatccc cctctagctg gcaacctggc
 361 acatgctggg gcctctgtag atttaactat cttttccctg cacttagcag gggtctcctc
 421 tattctagca tcaatcaatt ttatcactac aattattaat ataaaaccac ccgcaatttc
 481 tcaatatcaa acaccactat ttgtctgatc tattcttatt acaaccattc ttctcttact
 541 atcgctgccc gttctagcag caggtatcac catgctcctc acagatcgta atcttaatac
 601 aacctttttc gacccggcag ggggtggcga ccccattctt tatcaacacc tc
```

Paracentrotus lividus	KF369173.1	658

```
   1 aacactttat ttaatttttg gtgcctgagc aggcatggta ggaactgcaa tgagagtaat
  61 tatccgagcc gagctagcac aaccagggtc tttattgaaa gacgaccaaa tttacaaagt
 121 agtagttact gcacacgcac tagtaatgat tttttttatg gtaatgccaa ttatgatagg
 181 aggatttgga aactgactta tcccactaat gattggagca ccagatatgg ccttcccccg
 241 aatgaacaat atgagattct ggttaatccc cccttctttt attttgcttc tagcttcagc
 301 aggagtagaa agaggagccg ggacaggatg aaccatatac ccccctctct ccagaaaaat
 361 tgcccacgca ggaggctcag tagacttagc aatcttctca ctccatcttg cgggtgcctc
 421 ttctatccta gcctcaatta actttataac cacaattatt aatatgcgaa cgccgggaat
 481 gtcttttgac cgactacctt tgtttgtttg atccgttttt gttacagcat tcctacttct
 541 tctttctcta ccagtactag caggagcgat tactatgttt ctaacagacc gtaaaattaa
 601 cacaacattt ttcgacccag caggaggagg agacccaatt ctgtttcaac atttattc
```

Petromyzon marinus,	AY603104.1	652

```
   1 cctatatcta attttcgggg cttgagcagg aatagtagga actgctttaa gtattctaat
  61 tcgagctgaa ctaagtcagc caggcacttt attaggagac gaccaaattt ttaatgttat
 121 cgtaactgcc catgccttcg tcataatctt ttttatagtt ataccaatta taattggagg
 181 ctttggcaac tgacttgtac ccctaatact tggtgctcct gatatggcct tccctcgtat
 241 aaacaacata agtttttgac tacttccgcc ctctttactt ttactcttag cctctgcagg
 301 agttgaagct ggggcaggaa caggatgaac tgtatatcct cccttagccg gaaacctagc
 361 ccacaccggg gcctctgtcg acctaacaat cttttcctta cacttagccg gagtttcatc
 421 aattctagga gcagttaatt tcatcacaac tatttttaat atgaaacccc caactatgac
 481 tcaataccaa acccccttat ttgtttgatc agtcttaatc actgcagttc ttcttcttct
 541 atctctacca gtactagcag ctgctatcac aatacttcta acagatcgta acttaaatac
 601 atccttcttc gaccctgcag gaggaggaga ccccattctt taccaacact ta
```

Clavelina lepadiformis	JN028190.1	617

```
   1 ttatattttt ttttaagaat ttattcggct ttagtgagaa ctggtttaag tataattatt
  61 cgtactgagc tttcacaaac tgggcaatta attggtaatg gtcagattta taatgtagta
 121 gtaactgcac atgctctttt aataattttt ttttttatta tacctgttat aattagagga
 181 tttagaaatt ggctattacc tataatagta ggatctcctg atatagcttt cccgcgttta
 241 aataatataa gtttctgatt actgcctcca gctttatttc ttcttgtatt atctgttttt
 301 aatagggaca gggtaaggac agggtggact atttacccac cattatctgg cattttagct
 361 catagtagtg gggctgtaga tataggtatt ttttctttac atttagctag ggtttctagt
 421 attttaaggt ctataaattt tttagttaca ataagtaata tgaaattaaa aggttttgat
 481 tataataatt taagtttatt ttgttgatct gttgttgtaa ccactgtttt actggtgcta
 541 tctctacctg ttttagctgc tgctattacc atactgcttt ttgatcgtaa tttaaatact
 601 agttttttg atcctat
```