Filogenija najčešćih jadranskih riba reda perciformes temeljena na strukturi citokrom oksidaze

Agapito, Antonija Borjana

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:137:582313

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Image not found or type unknown

Repository / Repozitorij:

Digital Repository Juraj Dobrila University of Pula

zir.nsk.hr

Image not found or type unknown

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli
Odjel za prirodne i zdravstvene studije

ANTONIJA BORJANA AGAPITO

FILOGENIJA NAJČEŠĆIH JADRANSKIH RIBA REDA PERCIFORMES TEMELJENA NA STRUKTURI CITOKROM OKSIDAZE I

Završni rad

Pula, 2017. godine

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli
Odjel za prirodne i zdravstvene studije

ANTONIJA BORJANA AGAPITO

FILOGENIJA NAJČEŠĆIH JADRANSKIH RIBA REDA PERCIFORMES TEMELJENA NA STRUKTURI CITOKROM OKSIDAZE I

Završni rad

JMBAG: 0303055693, redoviti student

Studijski smjer: 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 potpisana Antonija Borjana Agapito, 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

_____

U Puli, _____, 2017. godine

IZJAVA
o korištenju autorskog djela

Ja, Antonija Borjana Agapito dajem odobrenje Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli, kao nositelju prava iskorištavanja, da moj završni rad pod nazivom „**Filogenija najčešćih jadranskih riba reda *Perciformes* 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. Jadransko more 1

1.2. Ribe 3

1.2.1. Ihtiologija 4

1.2.2. Morfologija i anatomija riba 5

1.2.3. Jadranska ihtiofauna 7

1.2.4. Sistematika, filogenija i evolucija riba 8

1.3. Red *Perciformes* (grgečke) 14

1.4. Molekularna filogenija 16

1.4.1. Molekularni markeri 17

1.4.2. Mitohondrijska DNA (mtDNA) 18

1.4.3. Citokrom oksidaza I (COI/COXI) i Barcoding 18

1.5. Cilj istraživanja 19

2. MATERIJALI I METODE 20

2.1. Odabir uzorka za obradu 20

2.2. Obrada nukleotidnih sljedova 21

3. REZULTATI I RASPRAVA 22

4. ZAKLJUČAK 31

5. LITERATURA 32

6. PRILOZI 35

7. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA 36

8. BASIC DOCUMENTATION CARD 37

1. UVOD

Ribe su ekonomski vrlo važne čovjeku. Nekoliko stotina vrsta je komercijalno. Te vrste su se u povijesti promatrale izdvojeno od ostatka ekosustava. Količina maksimalnog godišnjeg ulova izračunavala se pomoću podataka o godišnjem ulovu vrste i njezine pretpostavljene zalihe. Ulov velikih količina riba u prošlosti promijenio je čitava staništa zbog složenih mreža odnosa među vrstama. S vremenom, ljudi su počeli biti svjesni posljedica izlova i prelova riba. Također, veliki problem predstavlja slučajni ulov (engl. By-catch). "By-catch" se odnosi na one ribe i morske životinje koje nenamjerno završavaju u mrežama pri lovu, a obično budu vraćene u more. U posljednjih nekoliko godina povećavaju se zajednički međunarodnih napori u promicanju zaštite mora. Obalna područja svijeta klasificirana su u velike morske ekosustave (Large Marine Ecosystems, LME), velike regije koje obuhvaćaju geopolitičke granice. LME-ovi proizvode 95 posto globalne biomase ribe. Stotine milijuna ljudi širom svijeta živi u blizini obale. (Ladischensky, 2013)

Ribe su mnogim siromašnim zajednicama glavni, a nekima i jedini izvor hrane. Ako se ne poduzmu drastične mjere zaštite ribljih fondova, posljedice bi mogle biti katastrofalne, kako za čovjeka, tako i za cijeli ekosustav. (World Fish Organization, Pristupljeno: 08.09.2017.)

1.1. Jadransko more

„Jadransko more ili Jadran, dio Sredozemnoga mora između Balkanskog i Apeninskoga poluotoka do Otrantskih vrata na jugoistoku. Duljina mu iznosi 783 km, prosječna širina 248,3 km, a prosječna dubina 173 m; obuhvaća 138 595 km².“ (Hrvatska enciklopedija, Pristupljeno: 15.08.2017.)

Jadransko more je duga depresija ili sinklinala. Sinklinala je pojam u geologiji korišten za ulegnuti dio naborane Zemljine kore. Današnji oblik je nastao procesom transgresije (izdizanje razine mora) na početku kvartara. U kasnom tercijaru na

području Jadranskog mora Zemljina kora se ulegnula i nastala je depresija. Kasnije se ona ispunila morskom vodom formirajući sjeverni Jadran. Tijekom razdoblja pleistocena sjeverna talijanska ravnica se osušila. Dublji južni Jadran nastaje u kasnom tercijaru. Otrantska vrata (72 km široka, 800 m duboka) povezuju Jadran s Jonskim morem. Obalna linija Jadrana se mijenjala tijekom tercijara. Na početku je istočni dio bio poplavljen, a kasnije se voda povukla na zapadnu obalu. Nakon toga se zapadni dio izdigao, pa je voda opet preplavila istočnu obalu Jadranu i tako su nastali brojni današnji otoci. Izuzevši Crno more, Jadran je najsjeverniji dio Sredozemlja. Radi se o relativno plitkom moru. Većina dna (oko 73%) je dubine manje od 200 m, dakle nalazi se na kontinentalnom šelfu. Dubina se postepeno smanjuje od juga prema sjeveru. Jabučka kotlina (273 m) i Južnojadranska kotlina (1330 m) su jedina dublja područja. Istočna i zapadna obala imaju različita morfološka i topografska svojstva. Istočna obala Jadrana se sastoji od vapnenca, njezina se strma i uska podina (šelf) produbljuje dok zapadna obala ima širu podinu zbog materijala koje donose rijeke. Za najveći donos materijal zaslužna je rijeka Po, prosječni godišnji donos je 1700 m^3/s. Donos rijeke Po je glavni čimbenik koji utječe na temperaturu, salinitet i prozirnost sjevernog Jadrana. Termohalinska svojstva Jadranskog mora određuju: međudjelovanje zraka i mora, izmjenu vode kroz Otrantska vrata, donosi rijeka, miješanje, struje i topografija bazena. Godišnji temperaturni raspon na površini je 18 ºC na jugu i 25 ºC na sjevernom Jadranu. Kao cjelina, Jadran je umjereno toplo more. Ekstremne površinske temperature imaju veliki raspon, od 6 ºC do 29 ºC. Temperature čak i najdubljih slojeva uglavnom su iznad 10 ºC. Južni Jadran zimi je 8-10 ºC topliji od središnjih i sjevernih dijelova. U drugim godišnjim dobima horizontalna raspodjela temperature je ujednačena. Općenito, otvoreno more je toplije od obalnih voda. Salinitet Jadrana je relativno visok. Južni dio ima salinitet između 38,4 do 38,9 PSU (Practical Salinity Unit), a u sjevernom dijelu salinitet je niži i mnogo varijabilniji. Najniža slanost je naravno u blizini ušća rijeke Po. Morske struje su općenito niske brzine i promjenjivog smjera. Radi se o jednostavnom kružnom cirkulacijskom režimu, struje prate obalnu liniju. Voda iz Sredozemlja ulazi uz južnu istočnu obalu i kreće se prema sjeveru Jadrana, a izlazi duž južne zapadne obale. Horizontalna razlika tlaka varira između sjevernog i južnog Jadrana, što utječe na intenzitet izmjene vode između Jadrana i istočnog Sredozemlja zbog prisutnosti velikog tlačnog centra na širem sredozemnom području. Godišnje fluktuacije izmjene vode između Sredozemnog i Jadranskog

bazena utječu na dugoročne fluktuacije slanosti, temperature, prozirnosti i zasićenosti hranjivim solima. Osim toga, čovjekov učinak na barem neke od oceanografskih svojstava postalo je jasno tijekom posljednja tri desetljeća. Danas se Jadranska oceanografija (naročito na području sjevernog Jadrana) sučeljava s nužnim rješavanjem sve hitnijih problema onečišćenja mora, koji bi mogli utjecati na toksične cvatnje fitoplanktona, kao i na biodegradaciju okoliša, što bi moglo imati i posljedice na biološku raznolikost. Jadransko more, osobito njezin sjeverni dio, jedan je od najbogatijih ribarskih područja na Sredozemlju. Bogati riječni priljevi na plitkom šelfu sjevernog Jadrana, a osim toga i miješanje pridnenih sedimenata čine ovo područje vrlo produktivnim. Srednji i južni Jadran manje su produktivni, ali njihova izloženost utjecaju sjevernog Jadrana i povremeno jakom utjecaju sredozemnih voda omogućuje i visoku produktivnost na tim područjima. (Dulčić, Soldo, Jardas, 2005)

1.2. Ribe

Ribe su najbrojnija skupina kralježnjaka. Do danas je opisano više od 32000 vrsta riba, što premašuje ukupni broj svih vodozemaca, gmazova, ptica i sisavaca zajedno. Uz taksonomsku raznolikost, bitno je spomenuti i upečatljivu raznolikost staništa u kojima ribe žive. Ribe su već davno u prošlosti zauzele gotovo sva velika vodena staništa poput jezera, polarnih mora, tropskih močvara, privremenih ribnjaka, oceanskih dubina te ostala manje ekstremna staništa. Preživljavanje u takvim surovim staništima omogućile su im brojne anatomske, fiziološke, bihevioralne i ekološke prilagodbe. O mnogim prilagodbama svjedoče i opsežni fosili koji su stari više od 500 milijuna godina. Ribe su odlični primjeri evolucije jer tumače usku povezanost između oblika i funkcije te između staništa i prilagodbe. (Helfman i sur., 2009)

Zbog raznolikosti riba i njihovih jedinstvenih evolucijskih procesa teško je točno definirati pojam riba. Najprihvaćenije su dvije definicije, iako ni one ne obuhvaćaju sve iznimke. Ribe su poikilotermni vodeni svitkovci koji imaju tjelesne privjeske u obliku peraja, glavnina disanja odvija se preko škrga te su prekriveni ljuskama. (Berra, 2001) Ribe su vodeni kralježnjaci sa škrgama tijekom cijelog života i tjelesnim privjescima u obliku peraja. (Nelson, 2006)

Pojam riba je biolozima tek skupni naziv koji obuhvaća različite organizme: sljepulje, paklare, morske pse, raže, dvodihalice, jesetre, mnogoperke i ostale zrakoperke. (Helfman i sur., 2009)

1.2.1. Ihtiologija

Ihtiologija je znanost koja proučava ribe. Povijest ihtiologije započela je s Aristotelom (384. – 322 p. K.) koji je odvojio ribe od kitova i imenovao 117 vrsta riba. To je prvi poznati zapis koji se bavi ribama. Nakon gotovo 2000 godina, Pierre Belon objavio je knjige *Histoire de la nature des estranges poissons marins* (1551.) te *De aquatilibus* (1553.) koje su osnova za modernu ihtiologiju. Hippolito Salviani objavljuje prvi regionalni ihtiološki rad *Aquatilium animalium historiae* (1554. – 1557.). Guillaume Rondelet objavljuje prvi udžbenik iz ihtiologije *De Piscibus Marinis* (1554.). Sedamnaesto, a posebno osamnaesto stoljeće, poznata su kao razdoblja prosvjetljenja. Osnivačem moderne ihtiologije smatra se Peter Artedi, a nazivaju ga i ocem ihtiologije. Kritički je pregledao svu prethodnu literaturu o ribama i predložio standard za mjere i brojanja koji je služio kao osnova taksonomije riba. Nažalost, umro je prije objave svojih djela koja je otkupio i posthumno objavio 1738. Linné. Artedijeva klasifikacija riba (prilagođena i promijenjena) dio je i Linnéovog djela *Systema Naturae* (1758) u kojoj je razvio binarnu nomenklaturu (dvoimeno nazivlje vrsta). Tijekom 19. stoljeća, pa sve do početka 20. stoljeća, unutar ihtiologije posebna se pozornost posvetila taksonomiji, opisnoj biologiji te klasifikaciji. Današnja istraživanja su uglavnom usmjerena prema primijenjenoj ihtiologiji, ribarstvenoj biologiji i akvakulturi. (Nellen, Dulčić, 2008)

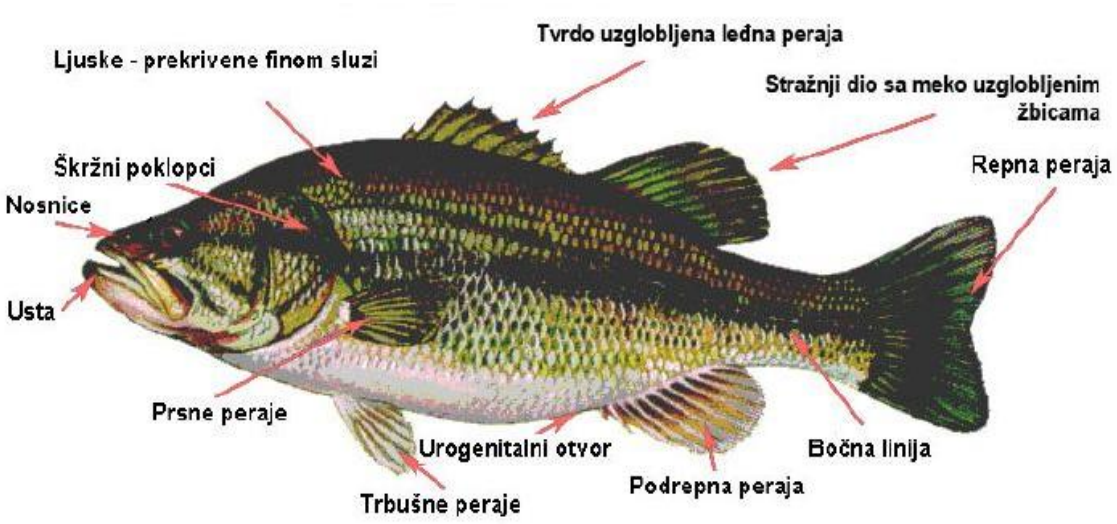
Osnova ihtiologije je organizirani hijerarhijski sustav naziva riba i evolucijske hipoteze povezane s tim nazivima. Takav sustav omogućuje identifikaciju i diferencijaciju vrsta riba te za razumijevanje odnosa među vrstama i višim svojtama. Najčešća klasifikacija se smatra najprirodnijom klasifikacijom, a radi se o klasifikaciji koja najbolje predstavlja filogenetsku (tj. evolucijsku) povijest samog organizma i njegovih srodnika. Filogenetska klasifikacija svojti sadrži dodatne informacije jer su kategorije predvidljive. (Helfman i sur., 2009)

1.2.2. Morfologija i anatomija riba

Ribe uglavnom imaju vretenasti oblik tijela koji im omogućava mali otpor vode te veliku brzinu kretanja. Kod riba koje moraju biti stalno spremne brzo plivati (npr. vrste koje žive u riječnim brzacima ili predatori) vretenasti oblik tijela je vrlo izražen. Ribe mirnih voda su latero-lateralno spljoštene. Ribe dna su jače ili slabije dorzo-ventralno spljoštene. Ta raznolikost oblika svjedoči kako je svaka vrsta prilagođena svom specifičnom staništu. (Helfman i sur., 2009)

Tijelo ribe dijeli se na glavu, trup i rep. Na glavi se nalaze usta, nosnice i škržni poklopci. Riba diše pomoću škrga koje se nalaze ispod škržnog poklopca. Škrge su zapravo sustav krvnih žila prekrivenih vrlo tankim epitelom koji omogućuje izmjenu plinova, odnosno disanje. Na svakoj strani nalaze se četiri škržna luka i pet škržnih pukotina. (Helfman i sur., 2009)

Tijelo ribe prekriveno je ljuskama koje joj pružaju zaštitu. Postoje dvije vrste ljusaka: nazubljene i glatke. Znanstvenici mogu odrediti starost riba prema prstenovima koji se stvaraju na ljuskama tijekom njenog života. Uz ljuske, dodatnu zaštitu od mikroba ribama pruža i sluz koja prekriva ljuske. (Helfman i sur., 2009)

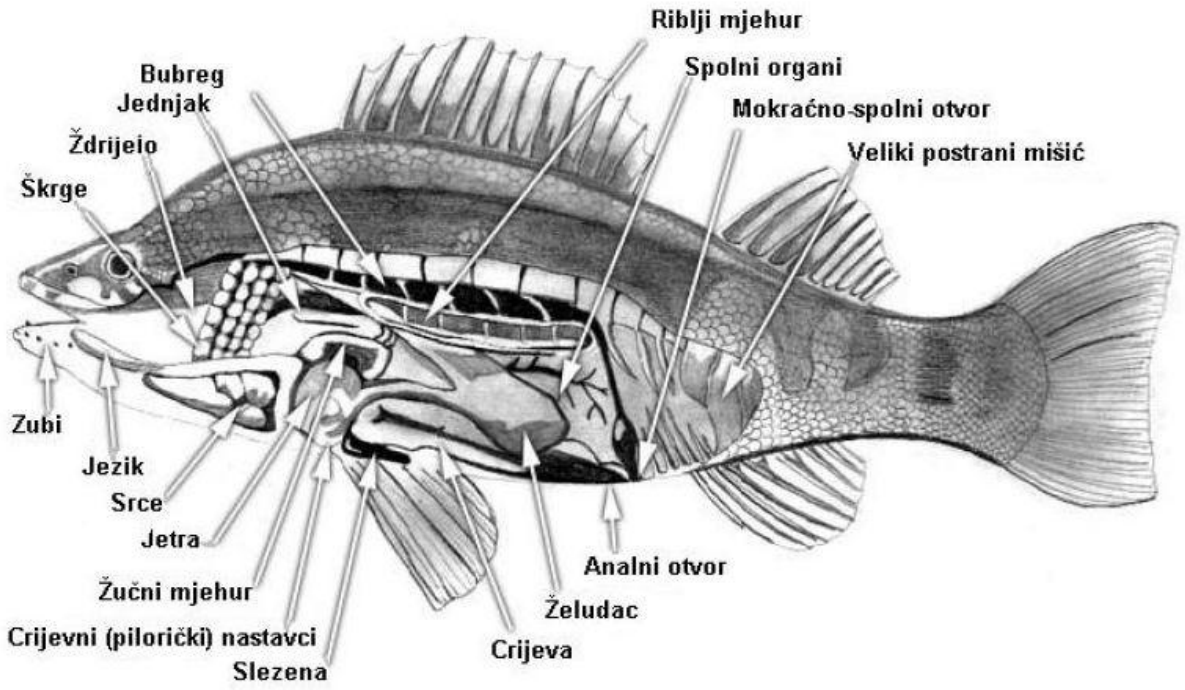


Slika 1. Vanjska anatomija ribe. (Preuzeto sa: HLEDE.net)

Duž tijela ribe proteže se bočna pruga koja ribi služi kao osjetilni organ. Bočna pruga je osjetljiva na pritisak, vibracije, pokret i zvuk. (Helfman i sur., 2009)

Ribe se kreću pomoću peraja (balansiranje i okretanje). Peraje su izgrađene od perajnih zraka međusobno povezanih tankim kožnim opnama, perajnom kožom. Neke vrste imaju koštane, krute perajne zrake koje se nazivaju bodljama. Ribe imaju po par prsnih i trbušnih peraja koje su povezane s ramenim i bočnim pojasom te po jednu leđnu, repnu i analnu peraju koje su povezane s kralježnicom. Leđna i trbušne peraje pružaju stabilnost ribama prilikom plivanja. Repna peraja je glavna za pokretanje. Analna peraja služi za stabilnost. Prsne peraje služe za pokretanje i okretanje. (Helfman i sur., 2009)

Tijelo ribe izgrađeno je oko kralježnice koja je povezana s glavom i repom. Kralješci, isto kao kod ostalih kralježnjaka, štite osjetljivu leđnu moždinu. Skelet može biti građen od hrskavice ili od kostiju. Unutar trbušne šupljine nalaze se probavni sustav, srce, jetra, bubrezi i spolni organi. Srce se sastoji od jedne klijetke (ventrikul) jedne i pretklijetke (atrij) i njime kola samo venska krv koja se oksigenira u škrgama. (Helfman i sur., 2009)



Slika 2. Unutrašnja anatomija riba. (Preuzeto sa: HLEDE.net)

Plivaći mjehur je plinom ispunjen organ koji ribama omogućuje regulaciju uzgona, a nekim vrstama koristi i za disanje. Nalazi se između probavnog sustava i bubrega. Kada riba prilagodi tlak zraka unutar plivaćega mjehura postiže neutralnu specifičnu težinu te ne tone niti se uzdiže u vodenom stupcu. Samim time štedi dragocjenu energiju. Hrskavičnjače nemaju plivaći mjehur. (Helfman i sur., 2009)

1.2.3. Jadranska ihtiofauna

Današnja flora i fauna Jadranskog mora rezultat su brojnih geoloških, zemljopisnih, klimatskih i bioloških utjecaja koji su se pojavili tijekom njezine formacije (Jardas, 1996).

Utjecaj zemljopisnih, geomorfoloških, klimatskih i drugih okolišnih čimbenika ključan je i danas te osobitosti jadranske ihtiofaune ovise o tim čimbenicima. Iako je Jadransko more dio Sredozemlja, radi se o neovisnoj biogeografskoj i ekološkoj podjedinici, čemu svjedoči sastav i svojstva njegovih životnih zajednica (biocenoza). Iako se radi o poluzatvorenom moru, svake godine otkrivaju se nove vrste morske flore i faune. Novija otkrića su uglavnom lesepsijski migranti, termofilne vrste koje su došle iz Crvenog u Sredozemno more (nazivaju se prema inženjeru Ferdinandu de Lessepsu koji je planirao i nadgledao gradnju Sueskoga kanala). Te vrste navode se kao dokaz o zagrijavanju Sredozemlja. (Dulčić, Soldo, Jardas, 2005)

„U Jadranskom su moru zabilježene 442 svojte riba, što predstavlja oko 65% poznatih ribljih svojti Sredozemnoga mora. Ova brojka podložna je stalnim promjenama. Tijekom posljednjih 15 godina zabilježeno je 28 novih vrsta. Neke od njih nastanjuju Sredozemlje, dok druge dolaze kroz Sueski kanal iz Crvenoga mora. Od ukupnog broja različitih svojti riba u Jadranu, 384 pripadaju u skupinu koštunjača, 55 u hrskavičnjače, a tri u kružnouste. Jadranska ihtiofauna uključuje 6 endemskih vrsta. U pogledu stupnja ugroženosti jadranske ihtiofaune 124 riblje svojte navedene su u Crvenoj knjizi morskih riba Hrvatske iz 2008. godine (28,05% morske ihtiofaune Hrvatske). Glavni razlozi ugroženosti jadranskih riba su nekontrolirano ribarstvo, uništavanje važnih staništa (hranilišta i mrijestilišta), kao što su livade posidonije, estuariji, priobalna područja i kanali, te onečišćenje mora i eutrofikacija. Jedno od

područja s najraznolikijom ihtiofaunom su more oko pučinskih otoka i otočni kanali.“ (Radović i sur. , 2009)

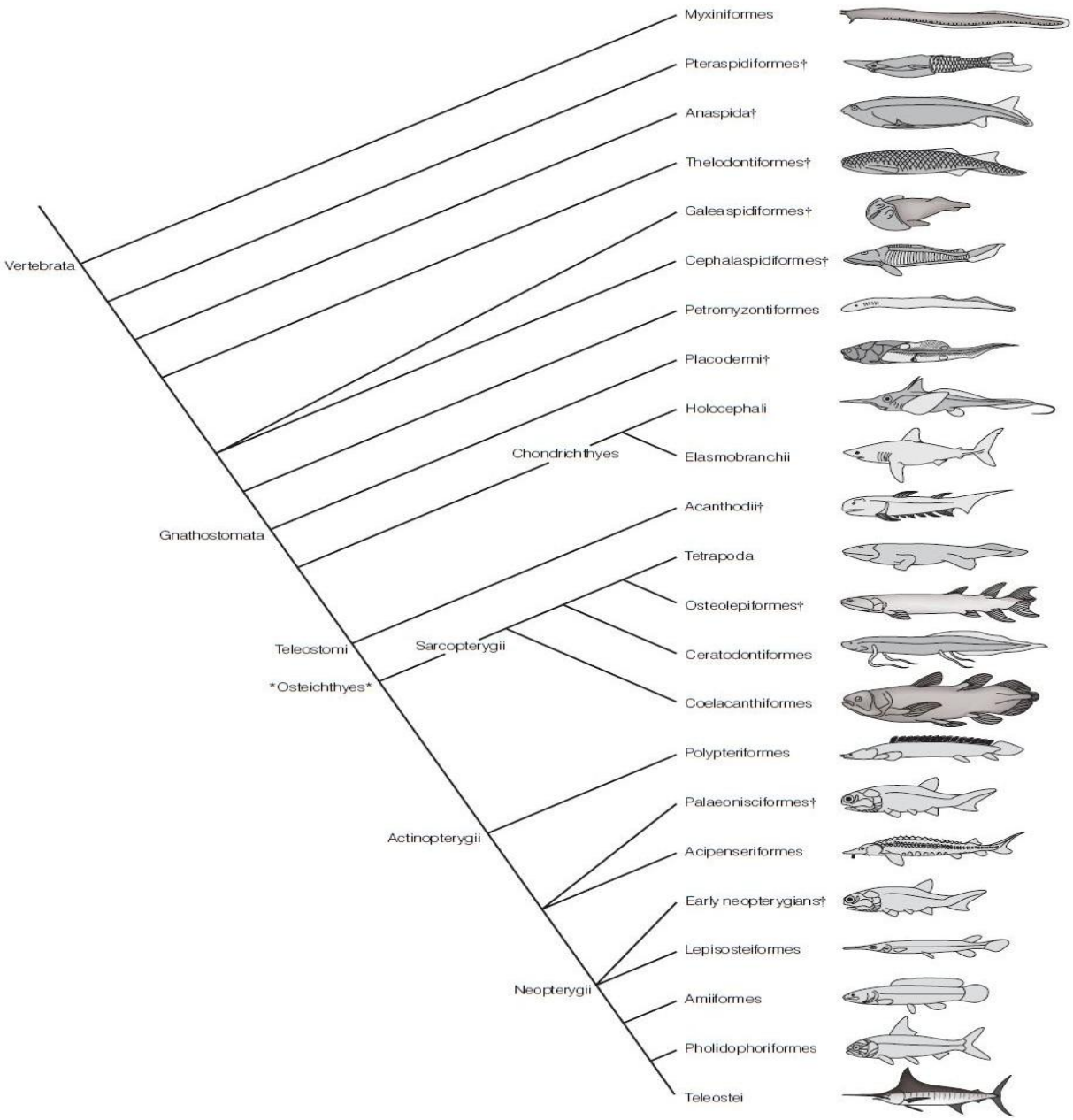
1.2.4. Sistematika, filogenija i evolucija riba

1.2.4.1.Sistematika

„Prema ranijim sistematikama ribe (*Pisces*) su bile smatrane razredom i nadrazredom, a prema suvremenoj sistematici one su neformalna skupina u koju se ubraja šest razreda: *Myxini* (sljepulje), *Pteraspidomorphi* (samo izumrli oblici), *Cephalaspidomorphi* (osim niza fosilnih oblika tom razredu pripadaju i recentne paklare), *Chondrichthyes* (hrskavičnjače), *Actinopterygii* (zrakoperke) i *Sarcopterygii* (mesoperke). Ribe u užem smislu obuhvaćaju samo hrskavičnjače i koštunjače, odnosno razrede: *Chondrichthyes*, *Actinopterygii* i *Sarcopterygii*. Razredi *Myxini*, *Pteraspidomorphi* i *Cephalaspidomorphi* čine nadrazred *Agnatha* (beščeljusti), dok se razredi *Chondrichthyes*, *Actinopterygii* i *Sarcopterygii* zajedno sa svim ostalim kralježnjacima ubrajaju u nadrazred *Gnathostomata* (čeljustousti).“ (Hrvatska enciklopedija, pristupljeno: 15.08.2017.)

Dakle, danas živuće vrste riba u svijetu klasificirane su u tri skupine: *Agnatha* (beščeljusti), *Chondrichthyes* (hrskavičnjače) i *Osteichthyes* (koštunjače). Ima oko 50 vrsta beščeljusti, 600 vrsta hrskavičnjača i 30000 vrsta koštunjača. Većina koštunjača pripada u zrakoperke (*Actinopterygii*). Za skupinu *Agnatha* karakteristično je što nemaju čeljust, parne peraje, plivaći mjehur, želudac ni škržne poklopce, kostur je hrskavičav, imaju svitak umjesto kralježnice, zmijoliko tijelo te kružna usta u kojima se skrivaju oštri zubi kojima se pričvršćuju za žrtve i sišu im krv. Oviparne su životinje te ih nalazimo u slatkoj vodi i moru. Dijele se na dva podrazreda: paklare (*Petromzontidae*) i sljepulje (*Myxinoida*). *Chondrichthyes* imaju hrskavičav kostur, no zubi su im kalcificirani, tijelo im je pokriveno trokutastim plakoidnim ljuskama, peraje su im krute i nefleksibilne, nemaju plivaći mjehur, razmnožavaju se unutarnjom oplodnjom te ih nalazimo samo u moru. Hrskavičnjače se dijele na dva podrazreda: cjeloglavke (*Holocephali*) i prečnouste (*Elasmobranchii*) u koje spadaju morski psi i ražovke. Karakteristike koštunjača su vretenasto tijelo, koža zaštićena ljuskama,

imaju plivaći mjehur, škržne poklopce, koštani kostur, parne peraje, razne tipove ljusaka te žlijezde koje izlučuju sluz. Peraje su im građene od perajnih zraka i/ili šiljaka povezanih perajnom opnom. Razmnožavaju se vanjskom ili unutarnjom oplodnjom, a postoje dva tipa jajašaca: plutajuća ili ona koja tonu na dno. Koštunjače se dijele na zrakoperke (*Actinopterygii*) i mesoperke(*Sarcopterygii*). Zrakoperke imaju tanke, fleksibilne peraje, dok mesoperke imaju mišićne peraje koje podupiru kosti. Zrakoperke s oko 27000 vrsta predstavljaju 96% ukupne riblje faune. (Helfman i sur., 2009)



Slika 3. Filogenetski odnosi između živih i izumrlih (†) skupina riba. (Helfman i sur., 2009)

1.2.4.2. Filogenija i filogenetska analiza

Filogenija je područje biologije koji proučava evolucijsku povijest vrste. U počecima služila je za istraživanja temeljena na morfološkom i fiziološkom karakteru. Ranih 1980- ih postaje mnogo popularnija zbog izolacije prvih genskih i proteinskih sekvenci. Napredak tehnologija sekvencioniranja odveo je filogenetsku analizu na potpuno novu razinu. Filogenija je vrlo brzo prodrla u gotovo sve ostale grane biologije. Također, razvijene su mnoge filogenetske metode i softverska rješenja dostupna eksperimentalnim biolozima. Deoksiribonukleinska kiselina (engl. Deoxyribonucleic acid, DNA) je osnovna molekula kojom se prenosi genetski materijal. Prije razvoja tehnologija sekvencioniranja DNA, filogenetska stabla bila su korištena samo u svrhu opisa veza između vrsta u sistematici i taksonomiji. Filogenija se temelji na usporedbi bioloških sekvenci kako bi se hijerarhijska klasifikacija mogla provesti. Glavni ciljevi molekularne filogenije su: određivanje hijerarhijskih odnosa postojećih vrsta prema njihovom evolucijskom pretku te procjena vremena divergencije između vrsta. (Brown, 2002)

Usporedbom između sekvenci genoma različitih organizama iste vrste ili druge vrste vidljivo je da se genomi mijenjaju ili mutiraju. Promjena ili mutacije se javljaju zbog pogrešaka tijekom normalnog staničnog metabolizma (greške tijekom replikacije DNA) ili zbog vanjskih utjecaja (UV zračenje). Promjene mogu biti neutralne, negativne ili pozitivne za adaptaciju, preživljavanje i reprodukciju organizma. Ako se mutacija dogodi tijekom embrionalnog razvoja, može se prenijeti potomcima. Neutralne ili pozitivne mutacije se tako šire u populaciji i one s vremenom postaju fiksni polimorfizmi. (Brown, 2002)

Određivanje hijerarhijskih odnosa između vrsta i procjene vremena divergencije među njima provodi se pomoću filogenetske analize. Za početak treba odabrati homologne nukleotidne ili proteinske sljedove (tzv. sekvence) koji se mogu pronaći u raznim bazama podataka ili pomoću poravnanja koristeći se BLAST rezultatima.

Idući korak je višestruko poravnavanje odabranih sljedova. Treba ukloniti nehomologne sljedove (ne pokazuju poravnanje), provjeriti paralelno poravnanje i ocijeniti njegovu značajnost. Ako poravnanje nije dobro, a pokazuje homologiju

između sljedova, treba promijeniti parametre umetanja i širenja praznina. Obično većina sljedova ima praznine koje je potrebno ukloniti. Treba provjeriti i dvojnost između filogenetskog stabla i višestrukog poravnanja. Za to se često koristi program MEGA koji omogućuje višestruko poravnanje MUSCLE i ClustalW metodama poravnanja.

Nakon višestrukog poravnanja, može se procijeniti genetska udaljenost između različitih sekvenci. Genetska udaljenost definirana je brojem izmjena nagomilanih među sekvencama budući da potječu od zajedničkog pretka. Opažanje izmjena otežano je u sekvencama koje su jako izmijenjene.

Idući korak je konstrukcija filogenetskog stabla odnosno uspostava hijerarhijskih odnosa između vrsta i procjena vremena divergencije. Postoje dva tipa stabla s obzirom na postojanje čvora (engl. node) koji se naziva korijen. Prvi tip je ukorijenjeno stablo koje ima korijenski čvor tj. korijen koji predstavlja zajedničkog pretka svih svojti i kod tih stabala može se utvrditi vremenski odnos. Drugi tip je neukorijenjeno stablo, nema korijen i ne može se odrediti vremenski odnos. Postoje dvije metode kojima se može odrediti korijen neukorijenjenih stabala. Može se dodati vanjska grupa (eng. outgroup) za koju se zna da je najudaljenija od ostatka stabla ili utvrditi najdužu granu i postaviti korijen na sredini te grane.

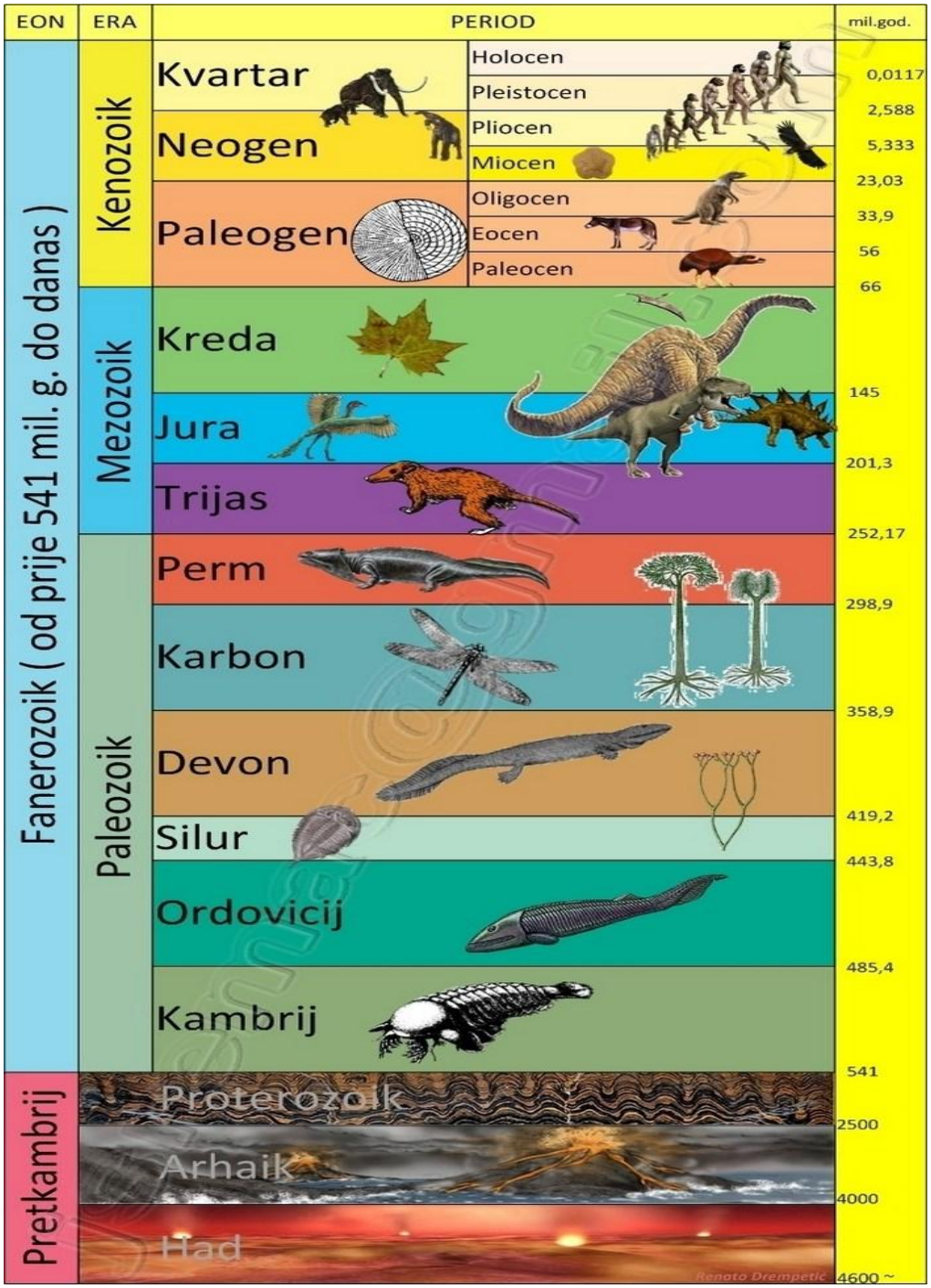
Najpopularnije i najčešće korištene metode konstrukcije stabla mogu se podijeliti u dvije glavne kategorije: fenotipske metode temeljene na udaljenosti i kladističke metode temeljene na karakteristikama. Metode temeljene na udaljenosti mjere udaljenost ili razlike između dva gena i konstruira stablo na osnovi tih podataka. Najpoznatije metode su : UPGMA (od engl. Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean), NJ (od engl. Neighbor joining) i one koje optimiziraju dodatak udaljenog stabla, FM (Fitch-Margoliash) i ME (Minimum Evolution). Druga skupina metoda vrednuje sva moguća stabla i traži ono koje najbolje odgovara evoluciji. U ovu skupinu spadaju maksimalna parsimonija (MP) i maksimalna vjerojatnost (ML).

Na kraju je potrebna statistička procjena filogenetskih stabala. (Barton i sur., 2007)

1.2.4.3. Evolucija

Ribe imaju zajedničkog pretka koji je star barem 500 milijuna godina. Neke fosilne skupine mogu se povezati s današnjim svojtama, nekim današnjim svojtama nedostaje očiti fosilni predak, a mnoge vrste su se pojavile, napredovale i izumrle. Prve fosilizirane ribe nastale su tijekom ranog Kambrija. Nisu imale čeljusti, ali su imale koštani oklop i mišićnu pumpu za hranjenje. Razvijanje čeljusti bio je ključan korak u evoluciji riba. Porijeklo čeljusnih riba je nejasno jer nisu pronađeni fosilni ostaci prijelaznih oblika. Razredi *Actinopterygii* (zrakoperke) i *Sarcopterygii* (mesoperke) javile su se tijekom Silura i Devona i tada je započeo razvoj današnjih koštunjača. Zrakoperke su bitne zbog strukturalnih promjena čeljusti koje su pojačale ugriz, povećale usnu šupljinu i stvorile silu usisavanja. Također, poboljšana je mobilnost zbog lakših ljuski, okoštavanja kralježnice i simetričnosti repa. Podrazred *Neopterygian* (novozrakoperke) je najuspješnija skupina od svih kralježnjaka. Javljaju se u razdoblju kasnog Perma i jako se razvijaju tijekom Mezozoika. U razred novozrakoperki spada nadred *Teleostei* (prave koštunjače). Evolucija pravih koštunjača značajna je zbog smanjenja koštanih elemenata, promjene položaja i funkcije dorzalne peraje, položaja i funkcija parnih peraja, modifikacija plivaćeg mjehura i repne peraje te poboljšanja aparata za hranjenje.

Postoje mnoge nesigurnosti i praznine u znanju o fosilnim ribama, njihovim međusobnim odnosima te o njihovim odnosima s modernim skupinama riba. Upravo su te praznine najčešće polazne točke budućih istraživanja. Raznolikost fosilnih riba, komplicirana mreža ranih odnosa kralježnjaka i kontinuitet u evoluciji riba tri su vrlo važne teme koje zahtijevaju pozornost znanstvenika.



Slika 4. Geološka razdoblja Zemlje. (Povijest Zemlje, Pristupljeno: 08.09.2017.)

Uspoređujući fosilne ribe s današnjim oblicima riba može se zaključiti koje su drevne skupine bile uspješnije u preživljavanju. No pronađeni fosili uopće ne svjedoče o ukupnoj raznolikosti fosilnih riba. Broj fosila se svakim danom smanjuje budući da ih geološki procesi uništavaju. Također, većina fosila iz prethodnih razdoblja Zemlje je nepristupačna znanstvenicima jer se nalaze u dubljim slojevima tektonskih ploča te pod površinom vode. Oko 2400 vrsta ili 10% danas živućih riba nastanjuju se u

dubinama većim od 200 m. Današnje dubokomorske ribe se međusobno jako razlikuju oblikom i strukturom tijela. Prilagodbe tih vrsta trebale bi biti prisutne u fosilnih zapisima, no njih gotovo ni nema. Duboko more je zapravo jedno od najstabilnijih vodenih staništa, što znači da su se organizmi trebali mnogo manje mijenjati kroz prošlost. Dakle, raznolikost fosilnih riba u dubokomorskim staništima je vrlo vjerojatno podcijenjena. Još jedan problem je što su mnoge fosilne grupe opisane na temelju jednog (često djelomičnog) uzorka. Takvo selektivno očuvanje fosilnih riba mnogo utječe na tumačenje linija podrijetla današnjih vrsta riba. Nitko ne može sa sigurnošću reći kako su pronađeni fosilni ostaci reprezentativan uzorak, što znači da je raznolikost fosilnih riba jako podcijenjena.

Glavne danas živuće skupine riba još uvijek nemaju jasnog pretka. Znanstvenici pokušavaju povezati moderne vrste beščeljusti s precima iz razdoblja Paleozoika, a čeljustousti s raznovrsnim precima riba iz razdoblja Devona. Moguće je da su preci beščeljusti i čeljustousti umrli te da njihovi ostaci nisu uopće fosilizirani. Tu teoriju podupiru najraniji fosilni ostaci beščeljusti i čeljustousti, preciznije njihove napredne kosti. Preci tih fosilnih riba su vjerojatno postojali milijunima godina, ali nisu imali mineralne strukture koje se mogu fosilizirati.

U organizacijskom pristupu, fosilne ribe se promatraju odvojeno od živućih vrsta riba. Ipak, treba uzeti u obzir i to da su moderne ribe zapravo nastavak loze fosilnih skupina. Neke primitivne skupine nisu danas prisutne i time zaslužuju da ih se promatra odvojeno. Jednako je logično promatrati moderne vrste zajedno s njihovim izumrlim precima. Dakle, treba uočiti kontinuitet između primitivnih i naprednih skupina riba te ih proučavati kao kontinuitet organskih promjena unutar loze. (Helfman i sur., 2009)

1.3. Red *Perciformes* (grgečke)

Red *Perciformes* je najveći red u razredu zrakoperki, ali i među svim kralježnjacima. Sadrži 160 porodica i više od 10000 vrsta, dakle više od jedne trećine svih riba. Na koraljnim grebenima je najveća raznolikost 6 od 8 najbrojnijih porodica (glavoči, usnače, brancini, babice, češljoustke i matulčići). Druge dvije porodice (ciklidi i

sjenke) svoju najveću raznolikost imaju u tropskim jezerima i obalnim umjerenim morskim staništima. Fosili grgečki datiraju iz ranog kenozoika, a većina prepoznatljivih članova podrazreda razvili su se u eocenu što svjedoči o vrlo brzoj evoluciji i diverzifikaciji. Ova skupina riba naziva se još i *Percomorphi* ili *Acanthopteri*.

Naziv *Perciformes* potječe iz grčke riječi „*perke*“ što znači grgeč te iz latinske riječi „*forma*“ što znači oblik. Međutim, radi se o vrlo raznolikom redu koji uključuje širok raspon oblika i veličina riba. Zapravo radi se o najvarijabilnijem redu kralježnjaka po pitanju veličine u rasponu od 7 mm duge *Schindleria brevipinguis* do 5 metara velikih *Makaira* vrsta (marlini). (New world Encyclopedia, Pristupljeno:08.09.2017.)

Tablica 1. Temeljne karakteristike svih grgečki

KARAKTERISTIKE	
1.	perajne zrake u leđnoj peraji su tvrdo uzglobljene poput bodlji;
2.	nemaju masnu peraju (bez koštanog ili hrskavičnog skeleta);
3.	prsne peraje su smještene na sredini bočne strane tijela;
4.	trbušne peraje postavljene ventralno naprijed (ako su prisutne);
5.	riblji mjehur (ako je prisutan) nije spojen sa probavilom.
6.	Repna peraja ima manje od 18 perajnih zraka

Za ovaj red uobičajeno je da su leđna i analna peraja podijeljene u prednji, bodljikavi i stražnji, meki dio peraje koji mogu biti djelomično ili potpuno odvojeni. Trbušne peraje najčešće imaju jednu bodlju i do pet mekih perajnih zraka. Ljuske su im uglavnom ktenoidne (češljaste), iako se javljaju i neki drugi tipovi ljuski.

Većina članova reda *Perciformes* živi u obalnom području, a ostatak dominira oceanskim životom kralježnjaka. (Nelson, 2006)

Sama klasifikacija grgečki je promjenjiva što se tiče razreda, a moguće je da mnoge porodice nisu monofiletske (monofiletska skupina organizama potječe od istog pretka). Većina porodica ostaje definirano pomoću zajedničkih karakteristika. Prema tradicionalnoj definiciji, *Perciformes* su gotovo sigurno parafiletska skupina. Parafiletska skupina uključuje samo neke primitivne potomke zajedničkog pretka, ali

ne i naprednije potomke. Ostali redovi koji bi trebali biti uključeni kao podredovi su: *Scorpaeniformes*, *Tetraodontiformes* i *Pleuronectiformes*. Ako se ta tri reda uključe, red *Perciformes* mogao bi se smatrati monofiletskom skupinom.

Prema Nelsonu (2006), u red *Perciformes* spada 10033 vrsta, raspoređenih u oko 1539 rodova, 160 porodica i 20 podreda. Od 160 porodica, 23 ima jednu vrstu, a 52 porodice imaju jedan rod. Više od tri četvrtine vrsta spada u tri podreda: *Percoidei*, *Labroidei* i *Gobiodei*. *Percoidei* je najveći podred s oko 3176 vrsta, 549 rodova i 79 porodica.

Red *Perciformes* ima važnu funkciju za staništa u kojima je prisutan, ali i za ljude. Ekološki, grgečke su sastavni dio hranidbenih mreža

, a konzumiraju ih druge ribe ili ptice, sisavci, gmazovi, vodozemci i razni beskralježnjaci. Za ljude ova skupina ima nekoliko funkcija. Tune, skuše, grgeči i igluni imaju veliku komercijalnu vrijednost kao hrana. Također, grgeči, tune, sabljarke, smuđevi i bucnjevi ljudima služe za rekreacijska natjecanja. Glavoči, anđeoske ribe i ciklidi su vrlo popularni kao akvarijske ribe. Raznolikost ponašanja i oblika mnogih vrsta upotpunjuju posebnost ovog reda. (Helfman i sur., 2009)

1.4. Molekularna filogenija

Molekularna filogenija analizira molekularne razlike u nukleotidnim sljedovima DNA te pruža informacije o evolucijskim odnosima među različitim vrstama. Osim prikazivanja odnosa među vrstama na stablu života, filogenija se koristi za opisivanje odnosa između paraloga (geni koji potječu od zajedničkog pretka) u genskoj obitelji, povijesti populacije, evolucijske i epidemiološke dinamike patogena, genealoškog odnosa somatskih stanica tijekom diferencijacije i razvoja karcinoma. Nedavno je molekularna filogenija postala nezamjenjiv alat za usporedbu genoma. (Brown, 2002)

1.4.1. Molekularni markeri

Povijest molekularne genetike seže do ranih 1950-ih kada su F. Crick, J. Watson i M. Wilkins predstavili model strukture DNA (dvostruki heliks). Od tada su razjašnjene pojedinosti o strukturi i funkciji DNA i gena te su ih počeli koristiti za određivanje genetske raznolikosti. Metode za kloniranje DNA, sekvencioniranje i hibridizaciju razvijene su u 1970-ima. DNA amplifikacija i automatizirano sekvenciranje tijekom 1980-ih doveli su do razvoja raznih klasa DNA markera. Klasična molekularna tehnika za proučavanje genetske varijacije kod kodominantnih Mendelovih naslijeđenih lokusa je alozimska elektroforeza. Tehnika je razvijena u 1960-ima i dominira sve do ranih 1990-ih. Početkom 1980-ih pojavile su se prve populacijske genetske studije temeljene na analizi mitohondrijske DNA. Kasnije, s dolaskom PCR-a (engl. Polymerase Chain Reaction, reakcija umožavanja molekule DNA) pojavio se niz različitih tehnika, od sekvenciranja DNA od interesa do metoda analize polimorfizama duljine, kao što su mikrosateliti. Molekularni marker je DNA sekvenca koja se upotrebljava za "označavanje" ili praćenje određene lokacije (lokusa) na određenom kromosomu, tj. markerskom genu. To je gen s poznatom lokacijom ili jasnom fenotipskom ekspresijom koja se detektira pomoću analitičkih metoda ili identificirajuće DNA sekvence koja olakšava proučavanje nasljeđivanja neke osobine ili gena. Markeri moraju biti lako prepoznatljivi u fenotipu, na primjer kontroliranjem lako primjetljivog svojstva ili lako prepoznatljivim molekularnim sredstvima. Danas su dostupne mnoge molekulske metode za proučavanje ribljih populacija, ali se u osnovi kategoriziraju pod dvije vrste markera, proteina i DNA. Postoje tri opće klase genetičkih markera koji se rutinski koriste u populacijskim genetskim i filogenetskim istraživanjima: alozimi, mitohondrijska DNA i nuklearna DNA. Molekularni markeri također imaju moguću primjenu u akvakulturi. Oni mogu pružiti vrijedne informacije u akvakulturi kao što su: usporedba uzgojenih i divljih svojti, genetska identifikacija i diverzifikacija uzgojenih svojti, praćenje srođivanja (engl. inbreeding) ili drugih promjena u genetskoj varijaciji, određivanje roditelja kroz genetske oznake, utvrđivanje lokusa kvantitativnih svojstva (QTL) i upotreba tih markera u programima odabira i procjena uspješne primjene genetičkih manipulacija kao što su poliploidija i ginogeneza. (Okumuş, I., Çiftci, 2003)

1.4.2. Mitohondrijska DNA (mtDNA)

Mitohondriji su strukture unutar stanice koje pretvaraju energiju iz hrane u oblik koji stanice mogu koristiti. Svaka stanica sadrži stotine ili tisuće mitohondrija koji se nalaze u citoplazmi. Mitohondriji proizvode energiju kroz proces koji se naziva oksidativna fosforilacija. U tom procesu se koristi kisik i jednostavni šećeri kako bi se stvorio adenozin trifosfat (ATP), glavni izvor energije u stanici. Skup enzimskih kompleksa provodi oksidativnu fosforilaciju unutar mitohondrija. Osim proizvodnje energije, mitohondriji imaju i neke druge važne uloge poput regulacije apoptoze (samouništenja) stanica, proizvodnje kolesterola i hema. Iako je većina DNA pohranjeno u kromosomima unutar jezgre, mitohondriji također imaju malu količinu njihove vlastite DNA. Taj genetički materijal poznat je kao mitohondrijska DNA ili mtDNA. Mitohondrijska DNA sadrži 37 gena koji su esencijalni za normalnu funkciju mitohondrija. Trinaest tih gena daje upute za stvaranje enzima uključenih u oksidativnu fosforilaciju, a preostali geni daju upute za stvaranje transportnih i ribosomalnih RNA (tRNA i rRNA). Te vrste RNA pomažu pri sastavljanju bjelančevina (aminokiselina) u funkcionalne proteine. (Genetics Home Reference, Pristupljeno: 09.09.2017.)

1.4.3. Citokrom oksidaza I (COI/COXI) i Barcoding

Citokrom oksidaza je oksidirajući enzim koji sadrži željezo i porfirin, a nalazi se u mitohondrijskoj membrani, gdje katalizira prijenos elektrona u kisik kao dio elektronskog transportnog lanca, što u konačnici dovodi do formiranja ATP. (Karlson, 1982)

Podjedinicu 1 Citokrom oksidaze (COI) odabrao je Konzorcij za barkod života (Consortium for the Barcode of Life, CBOL) kao idealni gen za DNA barkodiranje životinjskih vrsta. COI gen kodira za protein koji ima bitnu ulogu u staničnom disanju. Stanično disanje razgrađuje molekule hrane, poput glukoze, kako bi se oslobodilo

ugljičnog dioksida i vode. To je način na koji stanica stvara energiju. COI gen je prisutan u većini eukariota. Ovaj je gen visoko konzerviran u vrstama koje energiju proizvode u mitohondrijima. Budući da je gen visoko konzerviran, može se kopirati iz nepoznatih organizama. COI gen je mitohondrijski gen. Svaka stanica ima mnogo mitohondrija (od 1-1000 kopija ovisno o količini energije koju stanica treba), od kojih svaki sadrži više kopija mitohondrijske DNK. Dakle, čak i kada je uzorak tkiva ograničen, postoje dobri izgledi za izdvajanje dovoljno mitohondrijske DNA za uspješnu PCR amplifikaciju. Za DNA barkodiranje životinja COI se može koristiti za prepoznavanje pojedinaca koji pripadaju istoj vrsti, kao i za razlikovanje pojedinaca porijeklom od različitih vrsta. Tome je tako jer je brzina promjena genske sekvence tijekom vremena dovoljno spora da je vjerojatno da će biti identična u istoj vrsti, ali istovremeno i dovoljno brza da se razlikuje između vrsta. (Science Learning Hub, Pristupljeno:10.09.2017.)

1.5. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja je filogenetska analiza odabranih riba iz reda *Perciformes* uz pomoć COI (COXI) molekularnog markera koji je vrlo često korišten za potrebe identifikacije vrsta i populacijske genetike.

Za istraživanje je odabran uzorak vrsta riba Jadranskog mora selekcijom iz knjiga „Pod površinom Mediterana“ Toma Turka (2011) i „Nove ribe Jadranskog i Sredozemnog mora“ Dulčića i sur. (2011)

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Odabir uzorka za obradu

Iz knjiga „Pod površinom Mediterana“ Toma Turka (2011) i „Nove ribe Jadranskog i Sredozemnog mora“ Dulčića i sur. (2011) odabrane su vrste reda *Perciformes*, skupini kojoj pripada većina komercijalnih riba koje imaju i važne uloge u vodenim ekosustavima.

Kako bi izdvojili željenu skupinu te provjerili trenutno valjane nazive vrsta, korištena je stranica WoRMS (eng. World Register of Marine Species). Svrha tog registra je pružanje autoritativnog i sveobuhvatnog popisa morskih organizama, uključujući informacije o sinonimiji u nazivlju.

Za odabrane vrste riba provjerena je dostupnost nukleotidnih sljedova molekularnog markera COI (COXI) na stranicama nukleotidne banke podataka američkog Nacionalnog centra za biotehnološke informacije (NCBI; engl. National Center for Biotechnology Information).

Obrazac korišten za pretraživanje glasio je: *latinski naziv vrste [orgn] AND COI OR COXI*. Na primjer: *Thunnus thynnus* [orgn] AND COI OR COXI. *Thunnus thynnus* latinski je naziv roda i vrste za običnu tunu. Budući da se za citokrom oksidazu I često koriste dvije kratice (COI i COXI), uključili smo obje u obrazac kako bi poboljšali pretraživanje. Sljedovi nukleotida trebali bi biti dužine oko 650 baznih parova. Pronađeni sljedovi nukleotida spremljeni su u FASTA formatu za daljnju analizu, pojedinačno za svaku vrstu. Sastav nukleotidnih sljedova je provjeren. Svi sljedovi koji nisu sadržavali isključivo nedvosmislene nukleotidne kodove (prema IUPAC nomenklaturi) zamijenjeni su preciznije definiranim sljedovima. Drugim riječima, ako u nekom slijedu ima dosta kodova koji nisu A (adenin), C (citozin), G (gvanin) ili T (timin), pronađen je neki drugi, preciznije sekvenciran slijed kako bi imali što točnije podatke. Svi nukleotidni sljedovi kopirani su iz pojedinačnih FASTA datoteka u jednu zajedničku koja je korištena za daljnju obradu.

Ovisno o dostupnosti sljedova nukleotida u bazi podataka, izabrano je po nekoliko vrsta za svaki podred reda *Perciformes*.

Osim vrsta reda *Perciformes*, pretražene su baze i za sekvence dviju vrsta hrskavičnjača, te jedne vrste paklare, mješčićnice i ježinca. Te vrste su u sistematici smještene izvan reda *Perciformes,* a korištene s za „ukorjenjivanje“ filogenetskih stabala (outgroup). Njih se dodaje kako bi se vrste unutar reda *Perciformes* što točnije rasporedile u filogenetskom stablu. Pretraživanje je izvedeno na identičan način. Zatim je izrađena posebna FASTA datoteka koja sadrži slijedove nukleotida vrsta reda *Perciformes* i dodanih vrsta.

2.2. Obrada nukleotidnih sljedova

Nukleotidni sljedovi su zatim analizirani u programu MEGA7. To je filogenetski program koji koristi nekoliko metoda filogenetske rekonstrukcije. Također, uključuje program za usklađivanje (ClustalW) i povezan je s genetskom bazom NCBI-a. Služi za automatsko i ručno poravnanje sljedova, izgradnju filogenetskih stabala, procjenu stope evolucije i testiranje evolucijskih hipoteza. Datoteke sa sljedovima nukleotida otvorene su u MEGA7 programu i sljedovi su poravnati (engl. Align) pomoću ClustalW metode. Poravnanje je zatim spremljeno u MEGA formatu kako bi ga mogli koristiti za konstrukciju filogenetskog stabla.

Kako bi mogli konstruirati filogenetsko stablo, poravnanje je otvoreno u MEGA7 programu te je odabrano Neighbor-Joining stablo. Nakon što program konstruira stablo, možemo ga analizirati. Postupak je isti za oba uzorka (s i bez vrsta koje ne pripadaju redu *Perciformes*).

3. REZULTATI I RASPRAVA

Pretraživanjem registra morskih organizama (WoRMS) te baze podataka nukleotidnih sljedova (NCBI) dobiven je uzorak vrsta prikazan u Tablici 2.

Tablica 2. Popis odabranih vrsta reda *Perciformes*. U tablici se nalaze latinski i hrvatski naziv vrsta te podred na latinskom jeziku kojem vrsta pripada. U posljednjem stupcu nalaze se tzv. pristupnice (engl. Accession Numbers). To je šifra pomoću koje se može pratiti tko je i kada objavio nukleotidni slijed.

Br.	**Latinski naziv vrste**	**Hrvatski naziv**	**Podred**	**Pristupnica**
1	*Blennius ocellaris*	Babica dubinka	*Blennioidei*	KJ709489.1
2	*Callionymus marleyi*	Zmajski mišić	*Callionymoidei*	JF493006.1
3	*Dicentrarchus labrax*	Lubin, brancin	*Percoidei*	KP975557.1
4	*Gobius niger*	Glavoč blatar	*Gobioidei*	JF935269.1
5	*Liza aurata*	Zlatni cipal	*Mugiloidei*	EU715468.1
6	*Lobotes surinamensis*	Trorepan	*Percoidei*	FJ237808.1
7	*Pampus argenteus*	Srebrna plotica	*Stromateoidei*	HM068264.1
8	*Pseudocaranx dentex*	Šnjurak	*Percoidei*	KF489713.1
9	*Sarpa salpa*	Salpa	*Percoidei*	JF494423.1
10	*Sciaena umbra*	Kavala, krap, konj	*Percoidei*	KP722775.1
11	*Serranus hepatus*	Vučić, čučin	*Percoidei*	KM538559.1
12	*Siganus rivulatus*	Bodljikava mramornica	*Acanthuroidei*	KM538561.1
13	*Sparisoma cretense*	Papigača	*Labroidei*	KC501552.1
14	*Sphyraena sphyraena*	Štukan, škaram	*Sphyraenoidei*	JQ624000.1
15	*Symphodus roissali*	Kosirica, kraška	*Labroidei*	GQ341605.1
16	*Terapon theraps*	Veleljuskavi tigran	*Percoidei*	EU871699.1
17	*Thunnus thynnus*	Tuna, tunj	*Scombroidei*	GU451772.1
18	*Trachinus draco*	Pauk bijelac	*Trachinoidei*	KJ709936.1
19	*Tripterygion melanurum*	Pjevčić patuljčić	*Blennioidei*	KU740353.1

Uzorak se sastoji od 19 vrsta reda *Perciformes*, a zastupljeno je 11 (od 20) podreda. Ima sedam vrsta iz podreda *Percoidei*, po dvije vrste za podrede *Labroidei* i *Blennioidei* te po jedna vrsta za ostalih osam podreda.

Drugi uzorak je dobiven dodavanjem vrsta koje se ne nalaze u redu *Perciformes* vrstama prvog uzorka. Dodane vrste navedene su u Tablici 3.

Tablica 3. Popis vrsta koje se ne nalaze u redu *Perciformes*. U tablici se nalaze latinski i hrvatski naziv vrste, te latinski naziv potkoljena i razreda kojem vrsta pripada. U posljednjem stupcu nalaze se pristupnice.

Br.	**Latinski naziv vrste**	**Hrvatski naziv**	**Potkoljeno**	**Razred**	**Pristupnica**
1	*Petromyzon marinus*	Morska paklara	*Vertebrata*	*Petromyzonti*	JN028190.1
2	*Clavelina lepadiformis*	Žuta mješčićnica	*Tunicata*	*Ascidiacea*	AY603104.1
3	*Paracentrotus lividus*	Ježinac kamenjar	*Echinozoa*	*Echinoidea*	KF369173.1
4	*Carcharias taurus*	Psina zmijozuba	*Vertebrata*	*Elasmobranchii*	FJ519799.1
5	*Raja clavata*	Raža kamenica	*Vertebrata*	*Elasmobranchii*	KJ709867.1

Datoteke sa sljedovima nukleotida su pregledane u programu MEGA7 kako bi se utvrdilo ima li dvosmislenih nukleotidnih kodova. Sljedovi koji su sadržavali takve kodove, zamijenjeni su kako ne bi utjecali na rezultate.

Sljedeći korak bilo je poravnavanje (engl. Alignment) nukleotidnih sljedova u programu MEGA7. Korištena je metoda ClustalW. Poravnanje sljedova nukleotida vrsta reda *Perciformes* prikazano je na slici 5.



Slika 5. Dio sravnjenih sljedova nukleotida vrsta reda *Perciformes*. (MEGA7)

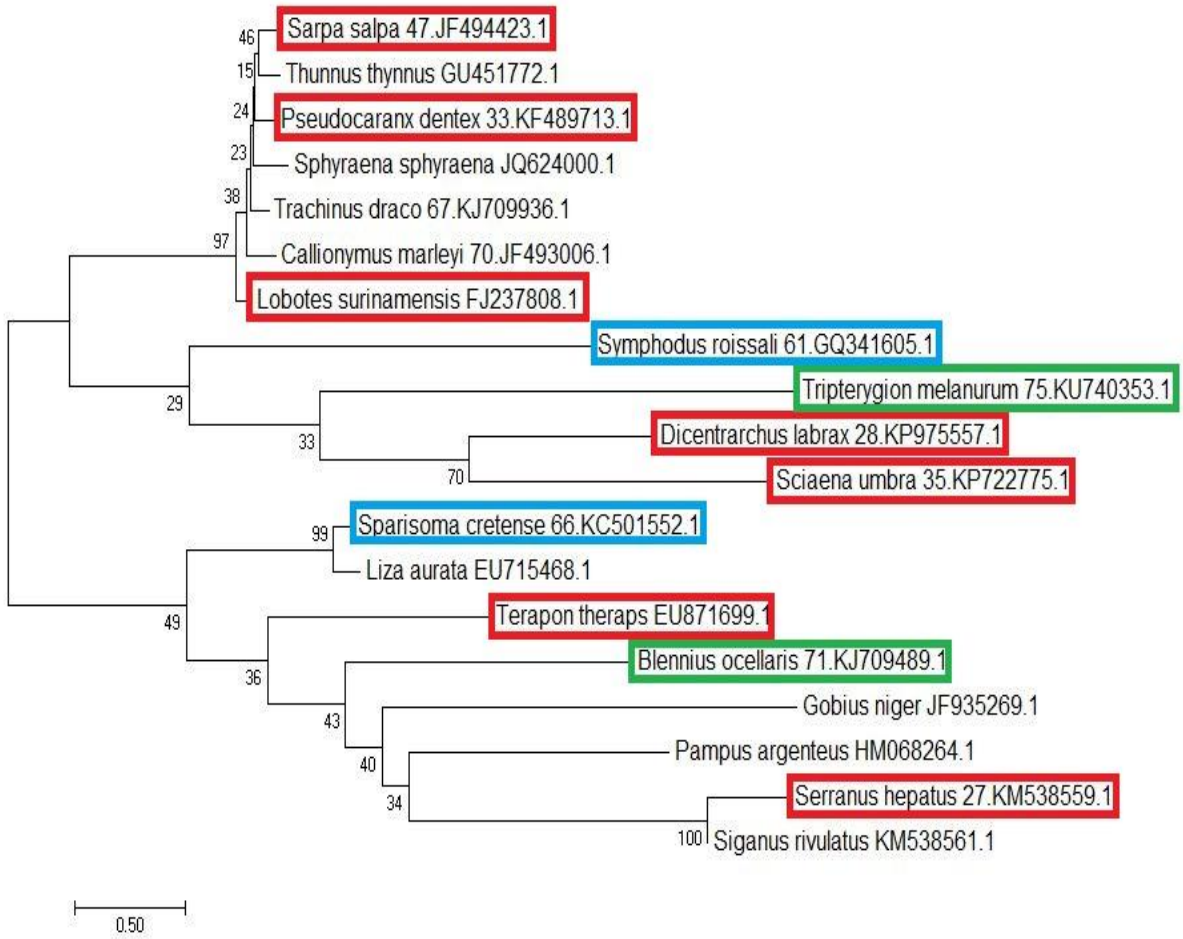
Iznad prvog slijeda nukleotida nalaze se zvjezdice (*) koje označavaju konzerviranost regije (odnosno nukleotida) ako je na tom mjestu u svim sljedovima isti nukleotid. Kada zvjezdice nema, to znači da se nukleotid u jednom ili više sljedova razlikuje. Na slici je vidljivo da u prvom stupcu svi sljedovi imaju nukleotid timin (crvena boja). Sljedeći zajednički nukleotid je adenin (zelena boja). U trećem stupcu vidi se da neki sljedovi imaju nukleotid timin, a neki citozin. Zato taj stupac nema zvjezdicu.



Slika 6. Početak sravnjenih sljedova nukleotida vrsta reda *Perciformes* i outgroup-a.

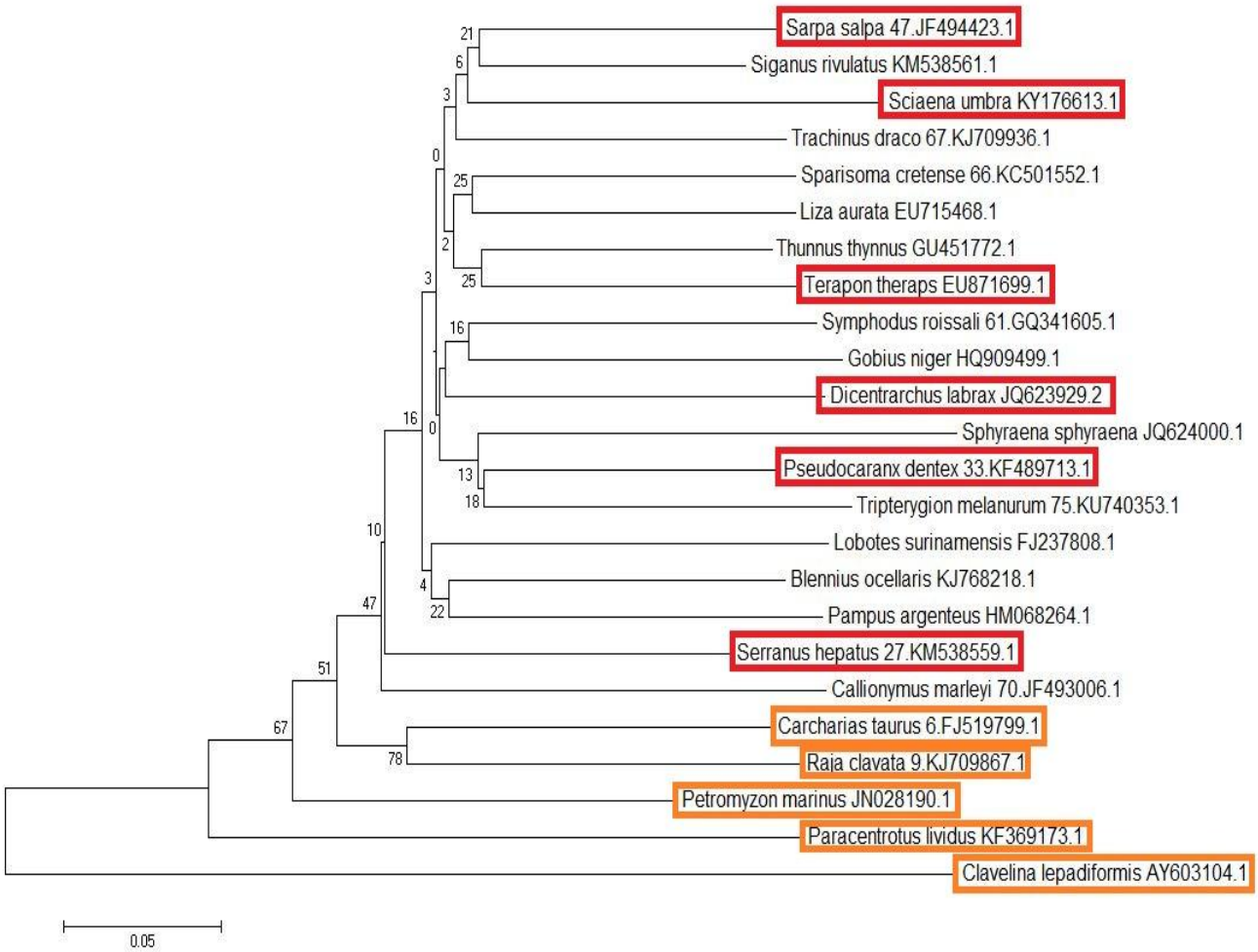
Nakon poravnanja sljedova prikazanog na slici 6., uočeno je da vrste *Sciaena umbra* i *Tripterygion melanurum* odstupaju od ostatka poravnanja. Budući da u bazi nukleotidnih sljedova nije bilo drugih sljedova, ostavljeni su u poravnanju.

Poravnati sljedovi su korišteni za konstrukciju filogenetskih stabala. Kao podrška grananja svih stabala korištena je metoda samoučitanja (engl. bootstrap). Konstrukcijom Neighbor-Joining stabla iz uzorka sljedova nukleotida vrsta reda *Perciformes*, dobiveno je filogenetsko stablo prikazano na slici 7.



Slika 7. Filogenetsko stablo odabranih vrsta reda *Perciformes*. Crvenom bojom označene su vrste podreda *Percoidei*. Zelenom bojom označene su vrste podreda *Blennoidei*. Plavom bojom označene su vrste podreda *Labroidei*. Brojke na mjestima grananja predstavljaju „bootstrap“ vrijednosti.

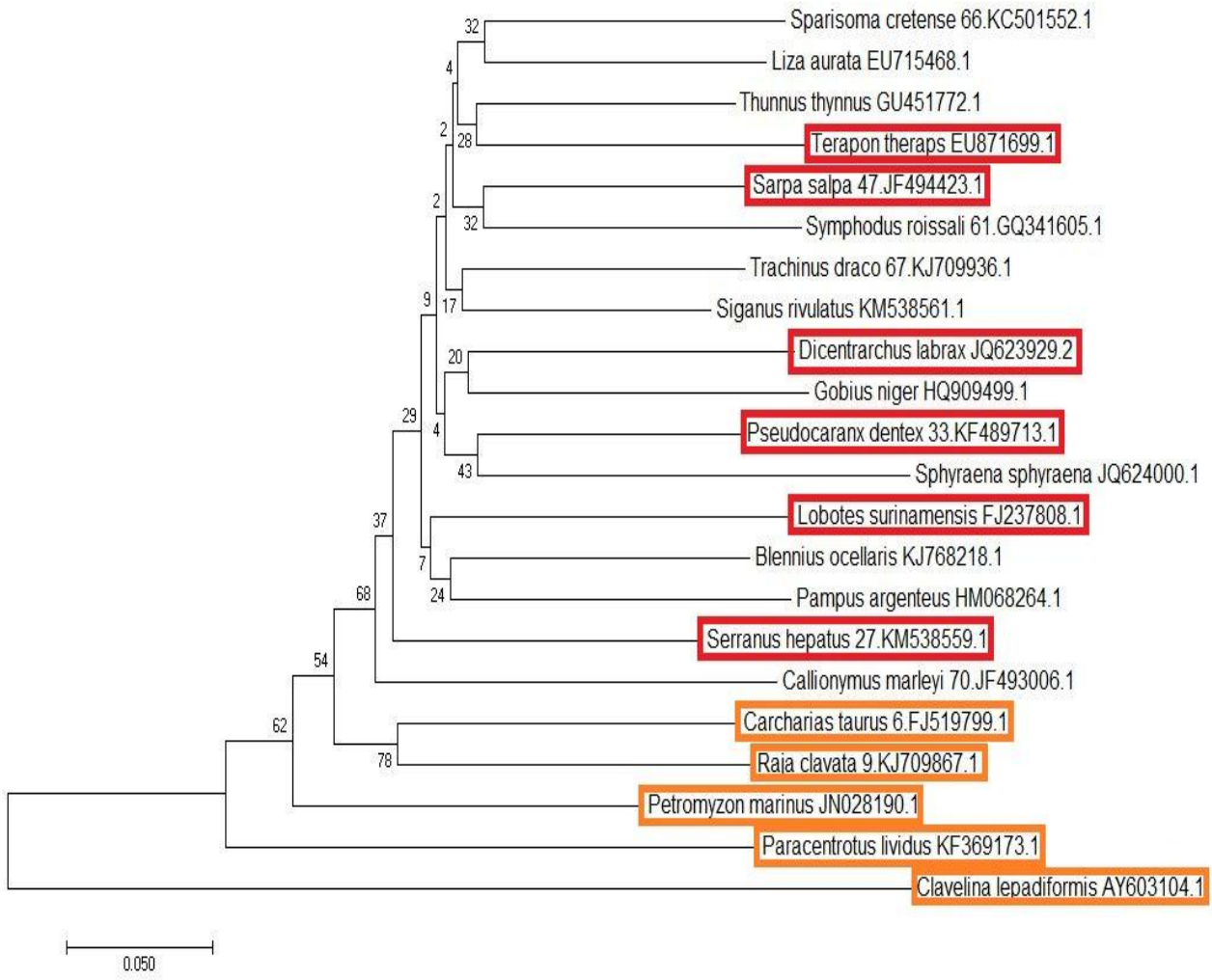
Filogenetsko stablo na slici 7. prikazuje grupaciju 19 vrsta u tri veće skupine. Označene su vrste podreda *Percoidei*, *Blennoidei* i *Labroidei*. Vrste se nisu grupirale po podredima, već nasumično. Bootstrap vrijednosti su u pravilu male, što navodi na nisku pouzdanost dobivenog filogenetskog stabla.



Slika 8. Filogenetsko stablo odabranih vrsta reda *Perciformes* i outgroup-a. Crvenom bojom označene su vrste podreda *Percoidei*. Narančastom bojom označene su vrste koje ne spadaju u red *Perciformes*.

Filogenetsko stablo na slici 8. nema vidljivu grupaciju vrsta reda *Perciformes* po podredima. Vrste koje ne spadaju u red *Perciformes* su se izdvojile. Bootstrap vrijednosti su vrlo male.

Vrste *Sciaena umbra* i *Tripterygion melanurum* imaju nešto kraće nukleotidne sljedove od ostalih vrsta, ali nema drugih sekvenci u bazi nukleotidnih sljedova. Te vrste su izbačene iz poravnanja. Zatim je ponovno konstruirano filogenetsko stablo.



Slika 9. Filogenetsko stablo odabranih vrsta reda *Perciformes* i outgroup s izuzetkom vrsta *Sciaena umbra* i *Tripterygion melanurum*. Crvenom bojom označene su vrste podreda *Percoidei*. Narančastom bojom označene su vrste koje ne spadaju u red *Perciformes*.

Filogenetsko stablo bez vrsta *Sciaena umbra* i *Tripterygion melanurum* na slici 10. ne razlikuje se mnogo od onog konstruiranog s tim vrstama. Vrste istih podreda ponovno su nasumično grupirane. Bootstrap vrijednosti su nešto veće nego u prethodnom stablu. Ovo stablo je nešto pouzdanije od prethodnog.

Usporedbom dobivenih filogenetskih stabala s klasifikacijom po Nelsonu (2006) te najnovijom klasifikacijom po Bentacur-R i sur. (2017) uočena su odstupanja. Umjesto očekivane grupacije po podrazredima, dobivena su filogenetska stabla kod kojih raspored vrsta izgleda nasumičan. Nekoliko je mogućih razloga za to.

Prvo, postoji mogućnost da se radi o lošim nukleotidnim sljedovima. Ako je došlo do nuvođenja grešaka prilikom sekvenciranja (očitavanja) DNK, nukleotidni slijed objavljen u bazi podataka NCBI-a niske je kvalitete. Problem postaje veći kada se radi o jedinom nukleotidnom slijedu u bazi jer se ne može zamijeniti. Također, često se događa da ista vrsta ima različita imena u bazama podataka. (Ardura i sur., 2013)

Drugo, prilikom sekvenciranja koristi se samo jedna jedinka iz cijele populacije. Teško je odrediti radi li se o reprezentativnom uzorku cijele populacije. Rješenje za to bi bilo uzorkovanje većeg broja organizama, njihovo sekvenciranje te izvlačenje prosječnog nukleotidnog slijeda populacije.

Treće, red *Perciformes* je relativno evolucijski mlada skupina riba, najdominantnija u današnjem svijetu kralježnjaka. Radi se o vrlo bliskim organizmima, s velikim brojem sličnosti. Ako razlike između vrsta reda *Perciformes* ovise samo o varijabilnosti trećeg nukleotida u kodonu, radi se o maloj ukupnoj varijabilnosti. Na slici 5. može se vidjeti da nakon poravnanja vrsta reda *Perciformes*, sljedovi nukleotida potvrđuju varijabilnost najčešće samo trećeg nukleotida kodonu, odnosno najčešće imaju po dva ista nukleotida u nizu, a samo se treći nukleotid pojedinih vrsta razlikuje. To se ponavlja uglavnom duž cijelih nukleotidnih sljedova. Prema Wardu i sur., (2005) kod koštunjača je zastupljenost glicina i citozina veća nego kod hrskavičnjača, a najviše se istosmislenih mutacija, zbog degeneriranosti genetičkog koda, događa upravo na trećem nukleotidu u kodonu. Takve mutacije ne uzrokuju promjene funkcije proteina. Ukoliko izuzmemo varijabilnost uzrokovanu degeneriranošću genetskog koda, preostaje vrlo niska evolucijska varijabilnost uspoređenih sljedova koja bi mogla biti „zamaskirana“ upravo varijabilnošću uzrokovanom degeneriranošću genetskog koda, što bi moglo rezultirati neočekivanim rasporedom vrsta u dobivenim filogenetskim stablima.

Na treći razlog se nadovezuje i duljina nukleotidnih sljedova. Pojedini mitohondrijski geni mogu potencijalno proizvesti pogrešne evolucijske zaključke i stoga ne bi mogli predstavljati prikladnu zastupljenost ni cijelog mitohondrijskog genoma niti evolucijske povijesti organizama iz kojih su izvedeni. (Zardoya i Meyer, 1996) Standardni kratki nukleotidni sljedovi (~600 baznih parova) nisu nužno prikladni za

sve skupine organizama, pogotovo ako se radi o vrlo velikim ili vrlo malim evolucijskim udaljenostima. Filogenetska stabla konstruirana iz kratkih sljedova nukleotida približno odražavaju prihvaćene filogenetske odnose, ali imaju nisku statističku podršku većine unutarnjih čvorova te mogu jako pogrešno prikazati neka grananja. (Min i Hickey, 2007) Za sve metode pri filogenetskoj analizi, točnost rezultata povećava se ako se koriste duži nukleotidni sljedovi. Također, bootstrap vrijednosti podcjenjuju točnost stabla, pogotovo kada su korišteni kraći slijedovi. (Hall i Salipante, 2007) Moguće je i da su dobiveni rezultati kombinacija navedenih razloga.

Kako bi se povećala točnost rezultata, u idućim istraživanjima trebalo bi koristiti više od jednog gena, po mogućnosti kombinacija nuklearnih i mitohondrijskih sljedova.

4. ZAKLJUČAK

Filogenetskom analizom odabranih vrsta reda *Perciformes* (grgečke), dobiveni su podaci koji se ne poklapaju s opće priznatim klasifikacijama riba. Najvjerojatniji razlog tome je što je red *Perciformes* evolucijski vrlo mlada skupina, vrste su jako slične te nukleotidni sljedovi koji su kratki (~650bp) te kao takvi imaju manju pouzdanost za korištenje tijekom konstrukcije filogenetskih stabala. Za određivanje filogenetskih odnosa unutar reda grgečki (*Perciformes*), na osnovu dobivenih rezultata preporučujemo korištenje dužih nukleotidnih sljedova te više od jednog markera.

5. LITERATURA

ALLISON, L.A., (2007) *Fundamental Molecular Biology*. Blackwell Publishing, Malden, MA .

ARDURA, A., PLANES, S., GARCIA-VAZQUEZ E., (2013) *Applications of DNA barcoding to fish landings: authentication and diversity assessment. DNA barcoding: a practical tool for fundamental and applied biodiversity research*. 49–65.

BARTON, N. H., BRIGGS, D. E. G., EISEN, J. A., GOLDSTEIN, D. B., PATEL, N.H (2007) *Evolution*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

BENTACUR-R, R., WILEY, E.O., ARRATIA, G., ACERO, A., BAILLY, N., MIYA, M. LECOINTRE, G., ORTI, G. (2017) *Phylogenetic classification of bony fishes*. BMC Evolutionary Biology. 17 (1). 1-40.

BERRA, T.M. (2001) *Freshwater fish distribution*. San Diego: Academic Press.

BRANDENBERG, O., DHLAMINI, Z., SENSI, A., GHOSH, K., SONNINO, A. (2011) *Introduction to Molecular Biology and Genetic Engineering*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rim.

BROWN, T. A., (2002) *Genomes, 2nd edition*. Wiley-Liss, Oxford.

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.*

GRIFFITHS, A. J. F., WESSLER, S. R., LEWONTIN, R. C., WILLIAM M. GELBART, W.M., SUZUKI, D. T., MILLER, J. H. (2005) *An Introduction to Genetic Analysis*. W. H. Freeman & Co, New York.

HALL, B.G., SALIPANTE, S.J., (2007) *Measures of Clade Confidence Do Not Correlate with Accuracy of Phylogenetic Trees. PLoS Computational Biology*. 3(7). e158.

HELFMAN, G.S, COLLETTE, B.B., FACEY, D.E., BOWEN, B.W. (2009) *The Diversity of Fishes: Biology, Evolution, and Ecology*. Wiley-Blackwell, West Sussex.

JARDAS, I. (1996) *Jadranska ihtiofauna*. Školska knjiga, Zagreb.

KARLSON, P. (1982) *Biokemija za studente kemije i medicine*. Školska knjiga, Zagreb.

LADISCHENSKY, D. (2013) World Ocean Review. Maribus gGmbH, Hamburg.

NEI, M., KUMAR., S. (2003), *Molecular Evolution and Phylogenetics*. 2000, Oxford.

NELLEN, W., DULČIĆ, J. (2008.) *Evolutionary steps in ichthyology and new challenges. Acta Adriatica: International Journal of Marine Sciences*. 49(3). 201-232.

NELSON, J. S. (2006) *Fishes of the world*, 4th edn. Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey.

MIN, X.J., HICKEY, D.A. (2007) *Assessing the effect of varying sequence length on DNA barcoding of fungi. Molecular Ecology Notes.* 7. 365-373.

ODAK, T., TREER, T., ANIČIĆ, I., SAFNER, R., PIRIA, M. (2002) *The use of molecular methods in fisheries. Croatian Journal of Fisheries*. 60(3). 116-126.

OKUMUŞ, I., ÇIFTCI, Y. (2003) *Fish population genetics and molecular markers: II-molecular markers and their applications in fisheries and aquaculture*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.*

RADOVIĆ, J., ČIVIĆ, K., TOPIĆ, R., POSAVEC-VUKELIĆ, V. (2009) *Biološka raznolikost Hrvatske*. Zagreb: Državni zavod za zaštitu prirode.

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

ZARDOYA, R., MEYER, A. (1996) *Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates. Molecular Biology and Evolution.* 13 (7). 933-942.

WARD, R.D., ZEMLAK, T.S., INNES, B.H., LAST, P.R., HEBERT, P.D.N., (2005) *DNA barcoding Australia's fish species. Philosophical Transactions of The Royal Society B*. 360. 1847-1857.

MREŽNE STRANICE

Hrvatska enciklopedija [Online] Dostupno na:
http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=52719
[Pristupljeno: 15.08.2017.]

Genetics Home Reference [Online] Dostupno na:
https://ghr.nlm.nih.gov
[Pristupljeno: 09.09.2017.]

New world encyclopedia [Online] Dostupno na:
http://www.newworldencyclopedia.org/entry/Perciformes
[Pristupljeno: 08.09.2017.]

Science Learning Hub [Online] Dostupno na:
https://www.sciencelearn.org.nz/resources/1937-the-ideal-barcoding-gene
[Pristupljeno: 10.09.2017.]

World Fish Organization [Online] Dostupno na:
https://www.worldfishcenter.org/why-fish
[Pristupljeno: 08.09.2017.]

6. PRILOZI

POPIS SLIKA

Slika 1. Vanjska anatomija ribe.
[Preuzeto:https://www.google.hr/search?q=vanjska+anatomija+ribe&client=opera&hs=RcJ&dcr=0&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiylazMnqrWAhUFDZoKHZElB7UQ_AUICigB&biw=1920&bih=941#imgrc=P5POTmQJGGWMsM:]
(Pristupljeno: 31.08.2017.)

Slika 2. Unutrašnja anatomija riba.
[Preuzeto:https://www.google.hr/search?q=vanjska+anatomija+ribe&client=opera&hs=RcJ&dcr=0&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiylazMnqrWAhUFDZoKHZElB7UQ_AUICigB&biw=1920&bih=941#imgrc=P5POTmQJGGWMsM:]
(Pristupljeno: 31.08.2017.)

Slika 3. Filogenetski odnosi između živih i izumrlih (†) skupina riba.
[Preuzeto: HELFMAN, G.S, COLLETTE, B.B., FACEY, D.E., BOWEN, B.W. (2009) *The Diversity of Fishes: Biology, Evolution, and Ecology*. Wiley-Blackwell, West Sussex.]

Slika 4. Geološka razdoblja Zemlje.
[Preuzeto: http://geol.pmf.hr/~jsremac/link/00_povijest%20zemlje.HTML]
(Pristupljeno: 08.09.2017.)

Slika 5. Dio sravnjenih sljedova nukleotida vrsta reda *Perciformes*.

Slika 6. Početak sravnjenih sljedova nukleotida vrsta reda *Perciformes* i outgroup-a.

Slika 7. Filogenetsko stablo odabranih vrsta reda *Perciformes*.

Slika 8. Filogenetsko stablo odabranih vrsta reda *Perciformes* i outgroup-a.

Slika 9. Filogenetsko stablo odabranih vrsta reda *Perciformes* i outgroup sa izuzetkom vrsta *Sciaena umbra* i *Tripterygion melanurum*.

POPIS TABLICA

Tablica 1. Temeljne karakteristike svih grgečki

Tablica 2. Popis odabranih vrsta reda *Perciformes*.

Tablica 3. Popis vrsta koje se ne nalaze u redu *Perciformes*.

7. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli — Završni rad
Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru

FILOGENIJA NAJČEŠĆIH JADRANSKIH RIBA REDA PERCIFORMES TEMELJENA NA STRUKTURI CITOKROM OKSIDAZE I

ANTONIJA BORJANA AGAPITO

SAŽETAK

Jadransko more je najsjeverniji topli dio Sredozemlja. Dosadašnja istraživanja pokazala su veliku bioraznolikost ihtiofaune. Kako bi se pratila raznolikost ribljih vrsta, najčešće se koriste molekularni markeri poput citokrom oksidaze I. Red *Perciformes* je najbrojnija skupina riba među svim kralježnjacima. Mnogo vrsta iz ove skupine je od velike ekonomske važnosti čovjeku. Nukleotidni sljedovi za odabrane vrste preuzeti su iz baze podataka NCBI-a te zatim analizirani u programu MEGA7. Korištene su metoda poravnanja ClustalW te Neighbor-Joining za konstrukciju filogenetskih stabala. Konstruirano je nekoliko verzija filogenetskih stabala, od kojih ni jedna nije bila slična opće priznatim klasifikacijama riba. Također, bootstrap vrijednosti su bile vrlo male. Red *Perciformes* evolucijski je vrlo mlada skupina unutar koje ima malo razlika među vrstama. Razlike u istraživanim sljedovima velikim dijelom ovise o varijabilnosti trećeg kodirajućeg nukleotida koja uglavnom uzrokuje istosmislene mutacije. Za preciznije utvrđivanje filogenetskih odnosa unutar ove skupine, preporučuje se upotreba kompletnih mitohondrijskih genoma ili više različitih markera.

KLJUČNE RIJEČI: molekularna filogenija, citokrom oksidaza 1, red *Perciformes*, filogenetska analiza

Mentor: doc.dr.sc. Mauro Štifanić

Povjerenstvo: doc.dr.sc. Emina Pustijanac, **predsjednica**

izv.prof.dr.sc. Daniel Mark Lyons, **član**

doc.dr.sc. Mauro Štifanić, **mentor**

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 PERCIFORM FISHES BASED ON CYTOCHROME OXYDASE I STRUCTURE

ANTONIJA BORJANA AGAPITO

ABSTRACT

Adriatic Sea is the most northern warm part of the Mediterranean. Previous research has shown great biodiversity of ichthyofauna. Molecular markers, such as cytochrome oxydase I, are used to monitor the variety of fish species. The fish order *Perciformes* is the largest group among all vertebrates. Many species in this group are of great economic importance to humans. Nucleotide sequences for selected species are downloaded from the NCBI database and then analyzed in MEGA7. The ClustalW alignment method and Neighbor-Joining phylogenetic trees were used. Several versions of the phylogenetic trees were constructed, none of which was similar to the generally recognized classification of fish. Also, bootstrap values were very small. The order *Perciformes* is an evolutionally very young group within which there is little difference between species. The differences in the investigated sequences are largely dependent on the variability of the third coding nucleotide, which mainly causes the same-sense mutations. In order to more confidently confer phylogenetic relationships within the order of Perciform fish, the use of complete mitochondrial genomes or multiple markers is recommended.

KEY WORDS: molecular phylogeny, cytochrome oxidase 1, order *Perciformes*, phylogenetic analysis

Supervisor: doc.dr.sc. Mauro Štifanić

Reviewers: doc.dr.sc. Emina Pustijanac, **president**

assoc.prof.dr.sc. Daniel Mark Lyons, **member**

doc.dr.sc. Mauro Štifanić, **supervisor**

Thesis defence: 21.09.2017.