

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Tatjana Mijošek

Morfološka i genetička raznolikost populacija invazivnog raka  
*Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) u Hrvatskoj

Diplomski rad

Zagreb, 2015.

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju za molekularnu evoluciju i taksonomiju životinja Zoologijskog zavoda, Biološkog odsjeka, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Ivane Maguire i neposrednim voditeljstvom dr. sc. Mišela Jelića, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre eksperimentalne biologije.

## ZAHVALE

Zahvaljujem svima koji su pridonijeli izradi ovog diplomskog rada.

Ogromno Hvala mojoj mentorici izv. prof. Ivani Maguire na pruženoj prilici, vodstvu i pomoći oko rada, mnogobrojnim savjetima prilikom pisanja, brzom odgovaranju na sva moja pitanja i nedoumice te svakodnevnom entuzijazmu. Izuzetna pristupačnost, neposrednost i ugodna atmosfera su učinili rad puno lakšim.

Zahvaljujem se i neposrednom voditelju dr. sc. Mišelu Jeliću na vodstvu kroz cjelokupan rad, prilici da naučim nešto novo, sakupljenim rakovima, savjetima prilikom pisanja kao i na zabavnom terenu.

Također se zahvaljujem dr. sc. Sandri Hudini na sakupljenim uzorcima s Korane.

Hvala doc. Jasni Lajtner na preporuci, sugestijama, pomoći i ljubaznosti u svakom trenutku.

Zavalu upućujem i Buket na početnom ohrabrenju, smirivanju i ugodnom drušvu u labosu i na terenu.

Hvala članovima komisije.

Hvala mojim prijateljima i kolegama za podršku, prijateljstvo, slušanje žalopojki, zezanje i savjete tijekom ovog rada, ali i čitavog studija (i/ili prije).

Zahvaljujem čitavoj obitelji, a najveće hvala Dadi, mami i tati jer su uvijek bili uz mene, omogućili mi bezbrižno studiranje, slušali (i rješavali) sve moje probleme i nastojali me oraspoložiti u svakom trenutku. Dada, hvala na slikici i mjerenju rakova sa mnom; bilo je to super otkrivanje zoologa u tebi, a molekularca u meni. :)

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

### **Morfološka i genetička raznolikost populacija invazivnog raka**

#### ***Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) u Hrvatskoj**

Tatjana Mijošek

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Signalni rak (*Pacifastacus leniusculus*) je autohton za područje Sjeverne Amerike. Introduciran je na područje Europe i Japana, ali se ubrzo nakon unošenja proširio kao invazivna vrsta. U Hrvatskoj je rasprostranjen u rijekama Muri i Korani gdje je u kompeticiji s autohtonim vrstama te je prijenosnik patogena (*Aphanomyces astaci*); uzročnika bolesti koja je smrtonosna za autohtone vrste rakova. Budući da se malo zna o genetičkoj raznolikosti vrste, u ovom istraživanju su korišteni mikrosatelitni lokusi i mitohondrijski geni za 16S rRNA s ciljem utvrđivanja međusobnih filogenetskih odnosa proučavanih populacija kao i njihova odnosa prema već istraženim populacijama ove vrste u svijetu. Analizirane su i morfometrijske značajke kako bi se utvrdilo postoje li značajne razlike između populacija i podudaraju li se rezultati morfometrijskih analiza s rezultatima genetskih analiza. Rezultati pokazuju da je raznolikost signalnog raka nešto veća u rijeci Muri, nego u Korani, ali niti jedna metoda jasno ne odvaja dvije populacije. Raznolikost na razini Hrvatske nešto je manja u odnosu na već istražene skandinavske i zapadnoeuropske zemlje. Rezultati ovog rada također pridonose spoznajama o ovoj vrsti kao i procjeni njezinog invazivnog uspjeha.

(58 stranica, 15 slika, 18 tablica, 85 literaturnih navoda, 2 priloga, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

**Ključne riječi:** invazivna vrsta, mikrosatelitni lokusi, 16S rRNA, morfometrijske značajke, filogenetski odnosi, invazivni uspjeh

**Voditelj:** Izv. prof. dr. sc. Ivana Maguire

**Neposredni voditelj:** Dr. sc. Mišel Jelić

**Ocjenitelji:** Izv. prof. dr. sc. Ivana Maguire

Doc. dr. sc. Ana Galov

Prof. dr. sc. Božena Mitić

**Rad prihvaćen:** 05.11.2015.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Divison of Biology

Graduation thesis

### **Morphological and genetic diversity of the invasive crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) populations in Croatia**

Tatjana Mijošek

Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) is a native to North America. It was introduced to Europe and Japan but it soon spread as an invasive species. In Croatia, it is widespread in the rivers Mura and Korana where it competes with native species. Moreover, it may be an *Aphanomyces astaci* carrier, a pathogen causing a disease lethal to native crayfish species. Since the knowledge on the genetic diversity of this species is limited, microsatellite markers and mitochondrial gene 16S rRNA analyses were used to explore the phylogenetic relations among Croatian populations as well as their relation to other already studied populations. Morphometric characteristics were studied to determine if there are significant differences among populations and if these are concordant with the genetic analyses results. Results showed that the genetic diversity of *Pacifastacus leniusculus* is slightly higher within the Mura population compared to the Korana population, but no clear separation of these two populations was obtained. Genetic diversity of this species within Croatia is slightly lower in comparison to already investigated Scandinavian and West European countries. This study contributes to the knowledge on signal crayfish, its characteristics, genetic diversity as well as the possible estimation of its invasive success.

(58 pages, 15 figures, 18 tables, 85 references, 2 attachments, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

**Key words:** invasive species, microsatellite markers, 16S rRNA, morphometric characteristics, phylogenetic relations, invasive success

**Supervisor:** Dr. Ivana Maguire, Assoc. Prof.

**Assistant Supervisor:** Dr. Mišel Jelić

**Reviewers:** Dr. Ivana Maguire, Assoc. Prof.

Dr. Ana Galov, Asst. Prof.

Dr. Božena Mitić, Prof.

**Thesis accepted:** 05.11.2015.

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. SLATKOVODNI RAKOVI .....	1
1.2. INVAZIVNE VRSTE .....	4
1.3. VRSTA <i>Pacifastacus leniusculus</i> (Dana, 1852) .....	5
1.3.1. Sistematika .....	5
1.3.2. Morfologija .....	6
1.3.3. Biologija i ekologija .....	7
1.3.4. Rasprostranjenost .....	8
1.3.5. Utjecaj .....	9
1.4. GENETIČKA RAZNOLIKOST .....	9
1.5. MIKROSATELITI .....	11
1.6. MITOHONDRIJSKA DNA (MtDNA) .....	12
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	13
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	14
3.1. PODRUČJE ISTRAŽIVANJA .....	14
3.2. ŽIVOTINJSKI MATERIJAL .....	14
3.3. KEMIKALIJE I PRIBOR .....	16
3.4. MORFOMETRIJA .....	17
3.4.1. Mjerenje morfometrijskih značajki .....	18
3.4.2. Statistička obrada morfometrijskih podataka .....	19
3.5. MOLEKULARNE METODE .....	19
3.5.1. Izolacija DNA .....	19
3.5.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR) .....	20
3.5.3. Gel elektroforeza .....	22
3.5.4. Sekvenciranje i genotipizacija .....	22
3.6. RAČUNALNE I STATISTIČKE ANALIZE MIKROSATELITNIH BILJEGA .....	23
3.6.1. Analiza kromatograma .....	23
3.6.2. Opisna statistika i analiza Hardy – Weinbergove ravnoteže .....	23
3.6.3. Strukturiranje populacija .....	23
3.6.4. Usporedba rezultata .....	23
3.7. RAČUNALNE I STATISTIČKE ANALIZE MITOHONDRIJSKE DNA .....	24
3.7.1. Analiza sekvenci DNA .....	24
3.7.2. Filogenetska rekonstrukcija .....	24

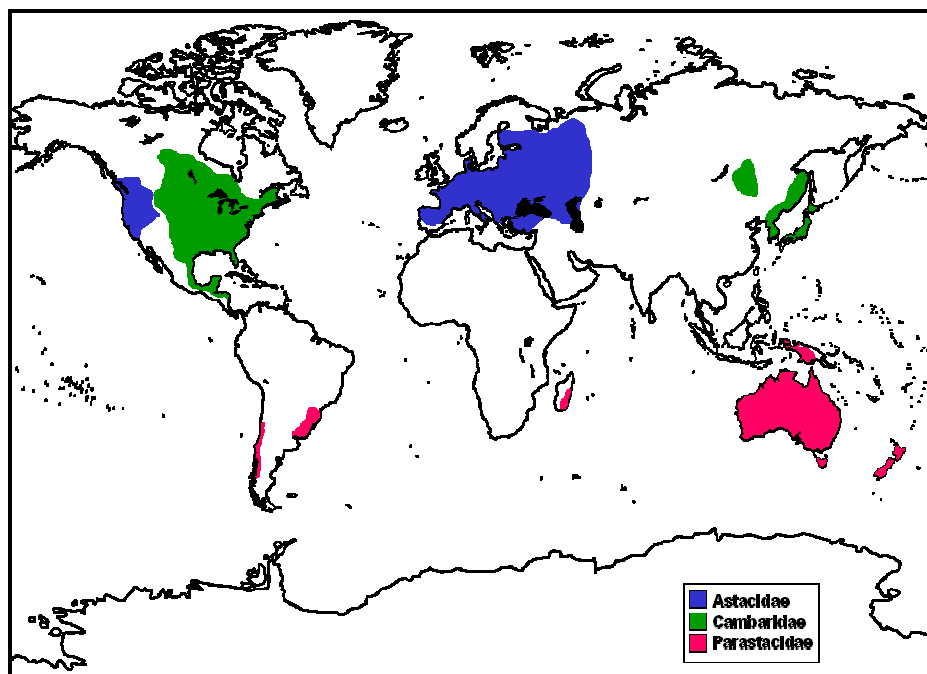
<b>4. REZULTATI</b> .....	25
4.1. MORFOMETRIJA .....	25
4.2. MIKROSATELITI .....	29
4.2.1. Uspješnost genotipizacije.....	29
4.2.2. Opisna statistika i analiza Hardy – Weinbergove ravnoteže.....	31
4.2.3. Strukturiranje populacija.....	33
4.3. MITOHONDRIJSKA DNA – 16S rRNA .....	34
4.3.1. Uspješnost PCR reakcije.....	34
4.3.2. Analiza sekvenci DNA .....	34
4.3.3. Filogenetska rekonstrukcija .....	35
<b>5. RASPRAVA</b> .....	38
5.1. MORFOMETRIJA .....	38
5.2. MIKROSATELITI .....	39
5.3. MITOHONDRIJSKA DNA- 16S rRNA .....	43
5.4. UKUPNA RAZNOLIKOST SIGNALNOG RAKA U HRVATSKOJ.....	44
5.5. UTJECAJ I INVAZIVNI USPJEH .....	44
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	46
<b>7. LITERATURA</b> .....	47
<b>8. ŽIVOTOPIS</b> .....	56
<b>9. PRILOZI</b> .....	58

## 1.UVOD

### 1.1. SLATKOVODNI RAKOVI

Do danas je otkriveno i opisano oko 640 vrsta slatkovodnih deseteronožnih rakova iz infrareda Astacidea. Najveća je brojnost vrsta i podvrsta infrareda Astacidea zabilježena u Sjevernoj Americi (77 %) i Australiji (20 %), dok oko 1,5 % otpada na vrste u Južnoj Americi i Europi (Holdich, 2002; Taylor, 2002). Uz slatkovodne natporodice Astacoidea i Parastacoidea u taj infrared spadaju i tri natporodice morskih rakova: Nephropoidea, Glypheoidea i Enoplometopoidea (Martin i Davis, 2001).

Natporodica Parastacoidea obuhvaća samo jednu porodicu – Parastacidae, a natporodica Astacoidea dvije porodice – Astacidae i Cambaridae. Rakovi iz porodice Parastacidae naseljavaju područje Južne Amerike, Australije i Novog Zelanda te Madagaskar. Opisano je 175 vrsta s najvećom raznolikošću u Australiji (Crandall i Buhay, 2008). Porodica Cambaridae rasprostranjena je u istočnoj Aziji i jugoistočnom dijelu Sjedinjenih Američkih Država. Opisano je 445 vrsta, a centar raznolikosti je Sjeverna Amerika, odnosno SAD. Areal porodice Astacidae čine Azija, Europa i Sjeverna Amerika. Opisano je ukupno 39 vrsta (Crandall i Buhay, 2008). Rasprostranjenost je prikazana na Slici 1.

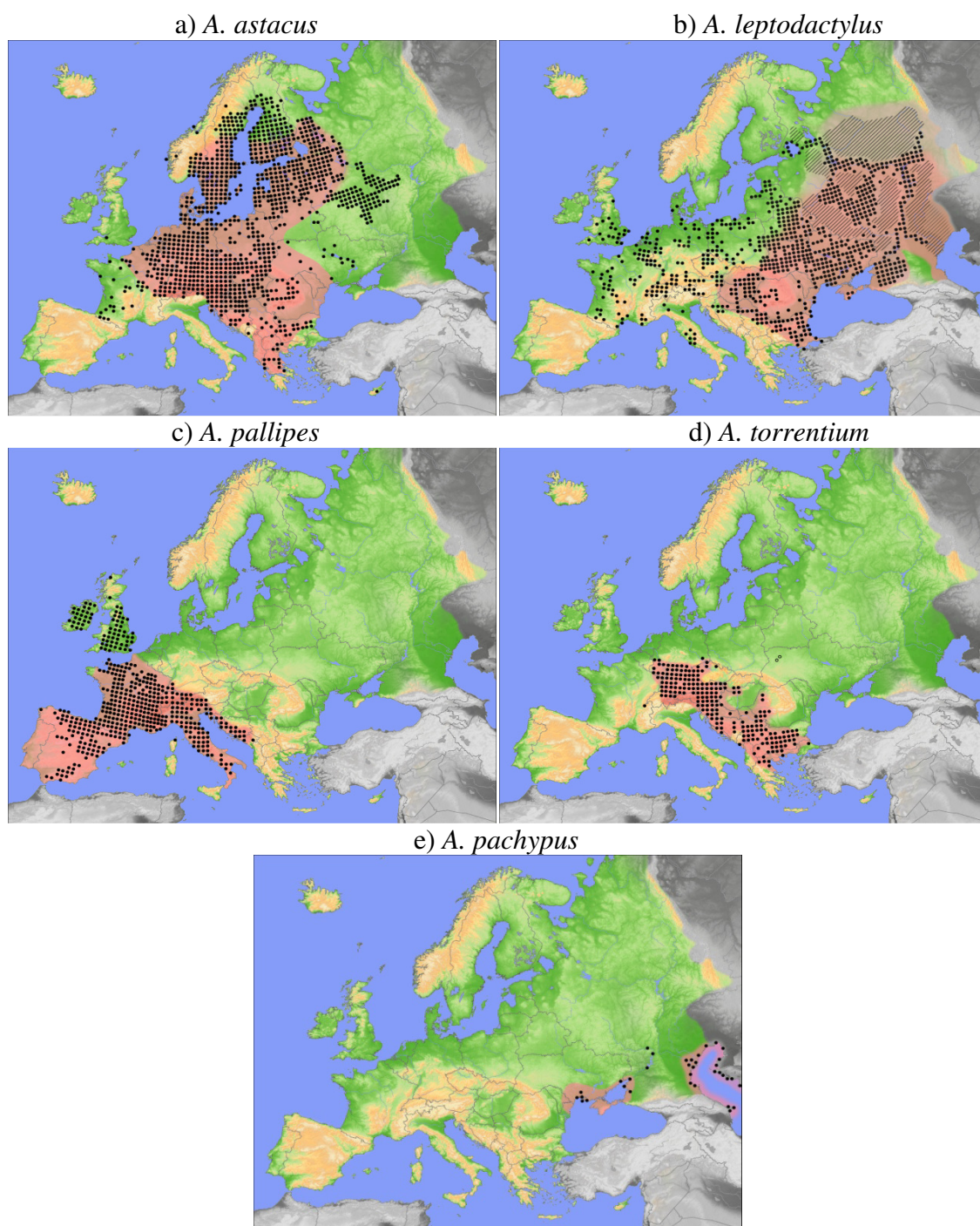


Slika 1. Rasprostranjenost slatkovodnih rakova u svijetu.

Preuzeto iz Fetzner (2010).



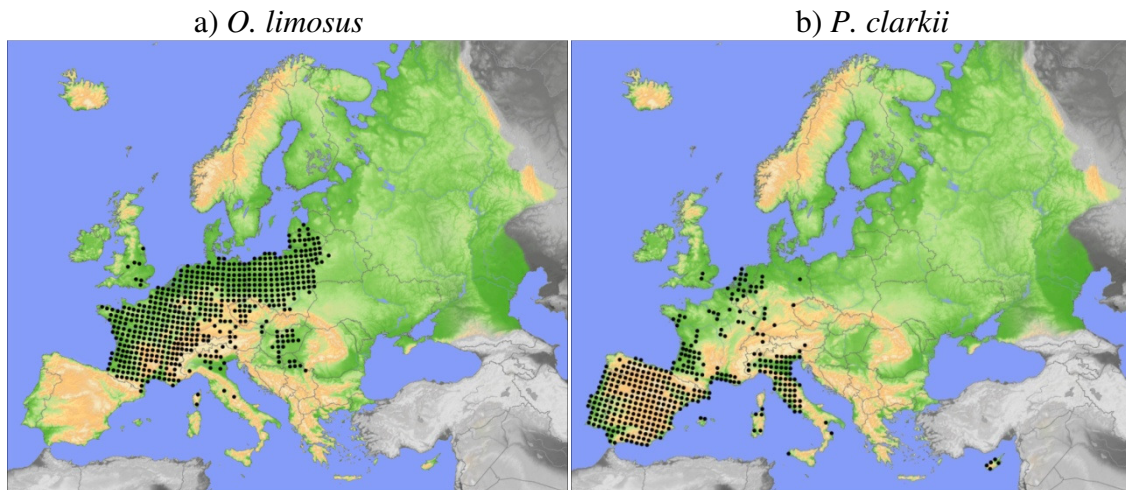
Na području Europe prirodno je rasprostranjeno pet vrsta slatkovodnih rakova iz porodice Astacidae: *Astacus astacus* (Linnaeus, 1758) - riječni ili plemeniti rak, *Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823 - uskoškari, turski ili barski rak, *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858) – bjelonogi ili primorski rak, *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803) – potočni rak ili rak kamenjar i *Astacus pachypus* (Rathke, 1837). Rasprostranjenost je prikazana na Slici 2.



**Slika 2.** Rasprostranjenost autohtonih vrsta rakova u Europi.

Preuzeto i prilagođeno prema Kouba i suradnici (2014).

Osim autohtonih vrsta rakova, europske slatkovodne ekosustave danas nastanjuju i alohtone vrste. To su ponajprije američke vrste *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852), *Orconectes limosus* (Rafinesque, 1817) i *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) te neke vrste australskog roda *Cherax*. Distribucija vrsta *O. limosus* i *P. clarkii* prikazana je na Slici 3.



**Slika 3.** Rasprostranjenost dviju alohtonih vrsta rakova u Europi.

Preuzeto i prilagođeno prema Kouba i suradnici (2014).

Na području Hrvatske rasprostranjene su četiri autohtone vrste slatkovodnih deseteronožnih rakova iz porodice Astacidae: riječni rak (*A. astacus*), uskoškari rak (*A. leptodactylus*), bjelonogi rak (*A. pallipes*) i potočni rak (*A. torrentium*) te tri vrste stranih invazivnih rakova: signalni rak (*P. leniusculus*), bodljobrađi rak (*O. limosus*) i mramorni rak (*Procambarus fallax* f. *virginalis*). Sve tri invazivne vrste potječu iz Sjeverne Amerike.

Autohtone europske vrste slatkovodnih rakova su ugrožene negativnim antropogenim utjecajem u vidu fragmentacije i onečišćenja staništa kao i prekomjernim nekontroliranim izlovom. Uz to se ističu velike količine otpadnih tvari u vodenim ekosustavima, regulacija vodenih tokova koja također uzrokuje gubitak staništa te ekstremni klimatski uvjeti izraženiji posljednjih godina. Poseban, možda i najveći problem europskim autohtonim vrstama čine alohtone vrste koje postaju invazivne i potiskuju autohtone vrste rakova.

Autohtone europske vrste *A. astacus* i *A. pallipes* su ugrožene na svjetskoj razini i uvrštene su na IUCN-ov Crveni popis ugroženih svojiti u kategoriji osjetljive (VU - vulnerable) i ugrožene (EN – endangered) vrste. Navedene vrste se uz vrstu *A. torrentium* nalaze i na Dodatku III Konvencije o zaštiti europskih divljih vrsta i prirodnih staništa (Bernska konvencija) te na Dodatku II i Dodatku V Direktive o zaštiti prirodnih staništa i divlje faune i flore. U Hrvatskoj su te vrste zaštićene Pravilnikom o proglašavanju divljih

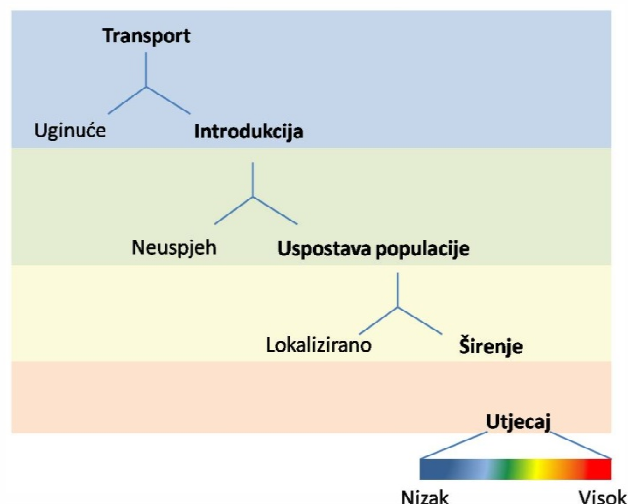
svojni zaštićenim i strogo zaštićenim, (Narodne novine 144/13) kao i Zakonom o zaštiti prirode (Narodne novine 80/13) te ih je sukladno članku 153. ovog zakona zabranjeno namjerno hvatati, uznemiravati, držati ili ubijati.

## 1.2. INVAZIVNE VRSTE

Invazivne vrste su alohtone (strane) vrste unesene na novo područje izvan svog prirodnog područja rasprostranjenosti, gdje se uspijevaju nesmetano razmnožavati i širiti, a značajno ugrožavaju ekosustav, stanište i autohtone vrste. Prema Svjetskoj udruzi za zaštitu prirode (IUCN) invazivne vrste su drugi vodeći uzrok ugroženosti autohtonih vrsta odmah nakon gubitka staništa.

Strane vrste mogu biti unesene slučajno ili namjerno. Nenamjerno unošenje odnosi se na unos preko balastnih voda, pričvršćivanjem za brodove, povezivanjem slijevova velikih rijeka i vodenih putova. Namjerno unošenje vezano je uz potrebe akvakulture, hortikulture, ljudske prehrane, hrane za ribe i stoku ili kao rezultat trgovine kućnim ljubimcima. Od velikog broja unesenih stranih vrsta samo mali dio zapravo uspije zasnovati populaciju na novom staništu, a od zasnovanih populacija samo 10 % uspije povećati svoju gustoću i osvojiti novi teritorij toliko da počnu negativno utjecati na autohtone populacije (Williamson, 1996). Ipak, to se odnosi na kopnene sustave, dok su slatkovodni puno osjetljiviji na invazivne vrste te je tamo postotak uspješnosti uspostavljanja populacija stranih vrsta puno veći. Slatkovodne sustave karakterizira veći stupanj endemizma pa je stoga utjecaj rastućeg broja unosa stranih vrsta za potrebe trgovine mamcima, kućnim ljubimcima i hranom te unos vrsta balastnim vodama puno izraženiji nego u ostalim ekosustavima (Wright, 2007).

Sam proces invazije ima nekoliko stadija (Slika 4). Prvi stadij je introdukcija u novo područje. Opstanak unesene vrste ovisi o broju jedinki, ekologiji vrste i mogućnosti prilagodbe na nove uvjete i stanište. Ukoliko ne dođe do prilagodbe, nema slobodne odgovarajuće ekološke niše ili zbog djelovanja prirodnih predatora unesena vrsta može nestati. Tek kad se vrsta počne razmnožavati može se smatrati da je uspostavila svoju populaciju. Slijedeći korak je širenje u kojem vrsta mora proširiti svoj areal. Kada se strana vrsta značajno proširi i poveća svoju brojnost te počne imati negativan ekološki ili ekonomski utjecaj počinje se smatrati invazivnom.



**Slika 4.** Proces invazije alohtonih vrsta.

Preuzeto i prilagođeno prema Lockwood i suradnici (2007).

Deseteronožni rakovi su među najuspješnijim invazivnim vrstama slatkovodnih ekosustava. Predstavljaju veliku opasnost za populacije autohtonih vrsta jer uglavnom brže rastu, ranije postižu spolnu zrelost, imaju veći fekunditet i agresivniji su, a često prenose i uzročnike bolesti račje kuge na koje su sami otporni, a koje su letalne za autohtone vrste (Souty-Grosset i sur., 2006).

Signalni rak je u Hrvatskoj rasprostranjen u rijekama Muri i Korani gdje je u kompeticiji s autohtonim vrstama *A. astacus* odnosno *A. leptodactylus*. Dok se u rijeku Muru proširio prirodnim putem iz Slovenije (Maguire i sur., 2008; Hudina i sur., 2009) zna se da je u Koranu namjerno unesen (Hudina i sur., 2013).

### 1.3. VRSTA *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852)

#### 1.3.1. Sistematika

Sistematski položaj signalnog raka prikazan je u Tablici 1.

**Tablica 1.** Sistematika vrste *P. leniusculus* prema [www.faunaeur.org](http://www.faunaeur.org).

<b>CARSTVO</b>	Animalia
<b>PODCARSTVO</b>	Eumetazoa
<b>KOLJENO</b>	Arthropoda
<b>RAZRED</b>	Malacostraca
<b>PODRAZRED</b>	Eumalacostraca
<b>NADRED</b>	Eucarida
<b>RED</b>	Decapoda
<b>PODRED</b>	Pleocyemata
<b>INFRARED</b>	Astacidea
<b>PORODICA</b>	Astacidae
<b>ROD</b>	<i>Pacifastacus</i>
<b>VRSTA</b>	<i>Pacifastacus leniusculus</i> (Dana, 1852)

### 1.3.2. Morfologija

Mužjaci signalnog raka obično narastu do 16 cm, a ženke do 12 cm ukupne duljine tijela (Souty-Grosset i sur., 2006), ali mogu se naći i veći primjerci do 18 cm veličine. Crvenkasto-smeđe su boje i imaju velika kliješta koja se osobito ističu kod mužjaka. Kliješta su crvena s donje strane (Slika 5). Površina tijela je glatka. Signalni rak se ističe po karakterističnom plavo-bijelom obojenju na spoju pomičnog i nepomičnog prsta kliješta (Slika 6).



**Slika 5.** Kliješta signalnog raka s donje strane.

Fotografija: Ivana Maguire



**Slika 6.** Izgled signalnog raka i plavičasto obojenje na kliještima.

Fotografija: Ivana Maguire

### 1.3.3. Biologija i ekologija

Prirodna staništa signalnog raka obuhvaćaju i stajaće i tekuće vode uključujući rijeke, potoke, jezera i kanale. Mogu preživjeti i u bočatim vodama (Holdich i sur., 1997). Mogu se prilagoditi na različite životne i okolišne uvjete, a ekološka niša im može biti i veća u područjima gdje su uneseni, nego u njihovim prirodnom staništu (Holdich i sur., 2014). Ukoliko nastupe negativni okolišni uvjeti ili populacija postigne preveliku gustoću, rakovi ove vrste mogu i napustiti vodu (Holdich i sur., 1995).

S obzirom na to da pripadaju porodici Astacidae mnogi aspekti njihove biologije su slični onima drugih autohtonih europskih deseteronožnih rakova ove porodice (Souty-Grosset i sur., 2006). Spolnu zrelost postižu pri veličini od 6 do 9 cm ukupne dužine, što odgovara starosti od dvije do tri godine (Souty-Grosset i sur., 2006). Parenje i oplodnja jaja odvija se tijekom jeseni, najčešće krajem rujna i početkom listopada, a broj jaja varira između 200 i 400. Vrijeme izlijeganja u divljim populacijama obično se odvija od kraja ožujka do kraja srpnja ovisno o temperaturi vode (Holdich i sur., 2014). Općenito su aktivni tijekom cijele godine, iako mnogo manje zimi.

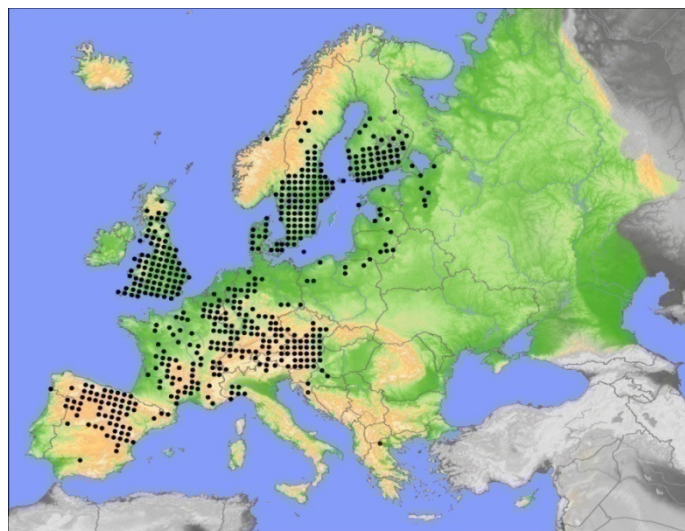
Signalni rakovi su uglavnom aktivni noću kad je manja opasnost od predatora (riba, ptica), a danju koriste prirodna skloništa između kamenja, šljunka i korijena bilja. Ipak, odrasle jedinke zbog svoje veličine, kliješta i agresivnog ponašanja mogu biti aktivne i danju. Također, mogu kopati i rupe u sedimentu dna te obalama vodotoka u svrhu zaklona. Takvo ponašanje nije primijećeno kod prirodnih populacija u Sjevernoj Americi (Lewis, 2002), ali je prisutno kod populacija unesenih u Europu.

Imaju jako široku trofičku nišu i prehranom se prilagođavaju uvjetima u okolišu i dostupnim nutrijentima (Olsson i sur., 2009). Juvenilne jedinke češće se hrane vodenim kukcima, a odrasle biljem (Lewis, 2002). Zbog prehrane detritusom imaju važnu ulogu u degradaciji i mineralizaciji organskih tvari.

Procijenjeno je da im je životni vijek do 20 godina (Johnsen i Taugbol, 2010).

#### 1.3.4. Rasprostranjenost

Signalni rak je vrsta autohtona za zapadno područje Sjeverne Amerike (Lewis, 2002). Međutim, introduciran je na područje Europe i Japana s ciljem nadomještanja populacija autohtonih vrsta rakova gdje se ubrzo nakon unošenja proširio kao invazivna vrsta (Holdich i sur., 2009). Danas je rasprostranjen na području 29 država Europe što ga čini najraširenijom alohtonom vrstom u Europi (Kouba i sur., 2014). Prvo je unesen u Švedsku iz Kalifornije 1959. godine kako bi nadomjestio populacije riječnog raka i tamo se proširio na više od 4000 lokaliteta (Edsman i Schröder, 2009). Uslijedila je Finska, a zatim i druge europske države. Kao posljedica unošenja u Austriju 1970-ih godina kasnije se proširio u rijeke Muru i Dravu na području Slovenije (Vrezec i sur., 2013), a 2008. godine je prvi put uočen i u hrvatskom dijelu Mure (Maguire i sur., 2008). Procijenjena brzina nizvodnog širenja ove vrste donjim tokom Mure od 18-24,4 km godišnje najveća je zabilježena brzina u Europi (Hudina i sur., 2009). U Korani je prvi puta pronađen 2012. godine u koju je ilegalno unesen u posljednjih pet godina (Hudina i sur., 2013). Upravo je ilegalan unos najrašireniji način širenja areala ove vrste danas. Najmanje je raširen u jugoistočnoj Europi za koju postoji samo nekoliko nalaza (Kouba i sur., 2014). Distribucija vrste zabilježena do 2014. godine prikazana je na Slici 7.



**Slika 7.** Rasprostranjenost signalnog raka u Europi.

Preuzeto iz Kouba i suradnici (2014).

### 1.3.5. Utjecaj

Signalni rak zauzima slične ili iste ekološke niše kao europske autohtone vrste rakova. U Hrvatskoj tako dolazi u kompeticiju s autohtonim vrstama *A. astacus* odnosno *A. leptodactylus*. Uz izravnu kompeticiju za hranu i stanište glavni problem je što je signalni rak prijenosnik patogena *Aphanomyces astaci* koji je uzročnik račje kuge; bolesti koja je smrtonosna za autohtone europske vrste rakova, a na koju je sam otporan (Dieguez-Uribeodno i sur., 2006; Holdich i sur., 2006). Zbog tih razloga u samo nekoliko godina mogu nestati i čitave populacije autohtonih rakova (Weinländer i Füreder, 2009).

Račja kuga je bolest koja inficira isključivo rakove (Gherardi, 2007). Kako su američke vrste rakova evoluirale zajedno s uzročnikom račje kuge razvile su otpornost prema njemu te postale prirodni domaćini i prijenosnici ove parazitske bolesti. Europske su pak vrste jako osjetljive na račju kugu. Kako bi se bolest pojavila nije nužna prisutnost signalnih rakova jer se može prenositi i sporama, odnosno vodom, zaraženom opremom i slično (Oidtmann i sur., 2002). Patogen *A. astaci* stavljen je na listu 100 najgorih invazivnih vrsta svijeta (Lowe i sur., 2000).

Uz negativan utjecaj na rakove, signalni rak direktno i indirektno utječe i na ribe bilo da se radi o predatorstvu, kompeticiji s ribama za skloništa i hranu ili promjeni staništa. Promjena staništa može negativno utjecati na neke od ribljih stadija (Holdich i sur., 2014) primjerice zbog gubitka zaklona ili kopanja sedimenta koje potencijalno smanjuje koncentraciju kisika i time smanjuje preživljavanje ribljih jajašaca.

Indirektan utjecaj se očituje i u predaciji nad ostalim bezkralježnjacima te uništavanju biljnih vrsta. Signalni rakovi općenito imaju znatno veći utjecaj na hranidbene mreže nego autohtone vrste rakova.

Mehaničkim djelovanjem na staništa (kopanje rupa/zaklona) potencijalno utječu na stabilnost obale, karakteristike sedimenta i kvalitetu voda. Taj učinak može imati i negativno ekološko i ekonomsko značenje jer može povećati trošak održavanja kanala, rijeka, drenaže (Peay i sur., 2010).

## 1.4. GENETIČKA RAZNOLIKOST

Genetička raznolikost je raznolikost alela i genotipova prisutnih u istraživanoj skupini, bilo da se radi o populaciji, vrsti ili skupini vrsta (Frankham i sur., 2002). Najčešće se opisuje izračunavanjem polimorfizma, nivoa heterozigotnosti i alelne raznolikosti. Lokus je polimorfan ako u istraživanoj skupini postoji više od jednog alela uz uvjet da se drugi alel



javlja u populaciji s frekvencijom 5 % ili više. Prosječna heterozigotnost ukazuje na prosječni broj heterozigota u populaciji, a često se uspoređuje uočeni stupanj heterozigotnosti ( $H_O$ ) u odnosu na očekivani ( $H_E$ ) prema Hardy-Weinbergovoj ravnoteži. Genetička raznolikost nastaje kao posljedica mutacija (većina mutacija nastaje tijekom replikacije DNA) i rekombinacija.

Veća genetička raznolikost omogućuje preživljavanje vrsta pod različitim okolišnim uvjetima i promjenama te omogućuje njihovu evoluciju. Ukoliko vrsta ili populacija ima nisku genetičku raznolikost ona postaje ugrožena jer u slučaju nastupanja nekog nepovoljnog događaja postoji velika vjerojatnost da se niti jedna jedinka neće moći prilagoditi i preživjeti u novonastalim uvjetima pa će stoga nestati. Kod populacija koje imaju visoku genetičku raznolikost barem dio jedinki u promijenjenim uvjetima ima šansu prilagoditi se i preživjeti. Genetička raznolikost pozitivno je korelirana s veličinom populacije i staništa, veća je kod vrsta sa širim arealom, a manja kod izoliranih, otočnih populacija te ugroženih vrsta (Frankham, 1996).

Na gubitak genetičke raznolikosti utječu gubitak i fragmentacija staništa i/ili populacija, pad nivoa heterozigotnosti i akumulacija letalnih mutacija. Do gubitka genetičke raznolikosti najčešće dolazi kod malih, izoliranih populacija i populacija koje su prošle kroz "usko grlo" (eng. *bottleneck*) (Allendorf, 2002). Pad brojnosti populacije dovodi do parenja u srodstvu (eng. *inbreeding*), populacije gube stabilnost, udio parenja u srodstvu sve više raste, a brojnost jedinki pada. Takvo međusobno djelovanje između pada brojnosti populacije, fragmentacije, gubitka genske raznolikosti i parenja u srodstvu se naziva ekstinkcijskim vorteksom (Frankham i sur., 2002).

Istraživanjem i očuvanjem genetičke raznolikosti se bavi konzervacijska genetika koja primjenjuje različite molekularne metode u svrhu konzervacije i proučavanja populacija različitih vrsta. Danas se u molekularnim istraživanjima koriste različiti genetski biljezi. (Emerson i Hewitt, 2005). To su dijelovi molekule DNA koji se lako izoliraju i pokazuju veći ili manji stupanj varijabilnosti među ispitivanim jedinkama. Mogu biti visoko konzervirani ili (hiper)varijabilni. Visoko konzervirani genetski biljezi korisni su u istraživanjima na višim taksonomskim kategorijama, a jako varijabilni biljezi koriste za rješavanje filogenetskih odnosa na nižim taksonomskim razinama (Hwang i Kim, 1999). S obzirom na cilj istraživanja preporuča se odabir nekoliko različitih biljega što doprinosi točnosti i vjerodostojnosti rezultata.

Neki od najčešće korištenih molekularnih biljega su polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata – RFLP (eng. *restriction fragment length polymorphism*), polimorfizam duljine

umnoženih fragmenata – AFLP (eng. *amplified fragment length polymorphism*), nasumično umnožena polimorfna DNA – RAPD (eng. *random amplified polymorphic DNA*), polimorfizam pojedinačnih nukleotida – SNP (eng. *single nucleotide polymorphism*), polimorfizam jednolančane konformacije – SSCP (eng. *single strand conformational polymorphisms*), metoda minisatelita ili varijabilni broj uzdužno opetovanih sljedova – VNTR (eng. *variable number tandem repeats*), metoda mikrosatelita ili kratkog broja uzdužno opetovanih sljedova – STR (engl. *short tandem repeats*) te direktno sekvenciranje mtDNA fragmenata.

### 1.5. MIKROSATELITI

Mikrosateliti su otkriveni u eukariotskim stanicama početkom 1980-ih godina (Schlötterer, 1998), no njihovo postojanje u početku nije pobuđivalo veći interes znanstvenika, ali se ubrzo spoznalo da bi mogli biti jedni od najboljih genetskih biljega (Jarne i Lagoda, 1996).

Mikrosateliti su ponavljajuće sekvence dužine 2-6 parova baza DNA. Najzastupljeniji su dinukleotidi, zatim mononukleotidi i tetranukleotidi, dok su trinukleotidi najrjeđi (Ellegren, 2004). Njihova pozicija češća je u nekodirajućim regijama DNA, a njihova funkcija nije u potpunosti poznata, ali neka istraživanja upućuju da imaju ulogu u translaciji, transkripciji, organizaciji kromatina, rekombinaciji i staničnom ciklusu (Li i sur., 2002). Jako su polimorfni, kodominantni te se smatraju evolucijski neutralnim markerima (Li i sur., 2002) što ih čini korisnima u istraživanjima na nižim taksonomskim razinama. Osobito su brojni u eukariotskim genomima, ali se u manjem broju pojavljuju i kod prokariota.

Izuzetno su podložni pogreškama replikacije DNA zbog čestog ponavljanja određene grupe nukleotida. Takve pogreške su produljenje ili skraćivanje mikrosatelita, odnosno promjena broja ponavljanja grupe nukleotida koja nastaje procesom pogrešnog sparivanja skliznutog lanca ili klizanja DNA (eng. *DNA slippage*) (Moxon i Wills, 1999). Najčešće su promjene od jedne ponavljajuće jedinice (Schlötterer, 1998). Uz klizanje DNA tijekom replikacije mutacije uzrokuje i rekombinacija DNA lanaca. Različiti faktori utječu na razinu mutacije: ponavljajući motiv mikrosatelita, veličina alela, pozicija kromosoma, omjer GC baza, radi li se o mitozu ili mejozi, spol i genotip (Li i sur., 2002). Brzina njihove mutacije iznosi  $10^{-2}$  do  $10^{-6}$  mutacijskih događaja po lokusu po generaciji (Li i sur., 2002).

Mikrosateliti se često koriste u istraživanju populacijske i konzervacijske genetike, evolucije, identifikaciji jedinki, mapiranju gena i određivanju srodstva među jedinkama

(Kashi i Soller, 1999). Nerijetko se koriste kod istraživanja forenzičkih i arheoloških materijala jer ih je moguće umnožiti i iz vrlo male količine DNA, kao i iz degradirane DNA (Hagelberg i sur., 1991). Koriste se i u svrhu otkrivanja raznih neuroloških i imunoloških bolesti, a jedan od ranih pokazatelja oboljenja od nekih vrsta karcinoma ponekad može biti i promjena u duljini mikrosatelita (Shibata, 1999).

#### 1.6. MITOHONDRIJSKA DNA (MtDNA)

MtDNA je u životinja kružna dvolančana molekula veličine između 15 000 i 20 000 parova baza (pb), a nalazi se u matriksu mitohondrija. Kod biljaka je mtDNA linearna molekula (Wan i sur., 2004). MtDNA se dijeli na kodirajući i nekodirajući dio. Kodirajuća regija mitohondrijskog genoma životinja sadrži 36 ili 37 gena: dva za rRNA, 12 ili 13 za proteine i 22 za tRNA (Wan i sur., 2004). Nekodirajući dio mitohondrijske DNA je kontrolna regija ili D-petlja koja djeluje na početak transkripcije i replikacije. Ima visoku stopu nakupljanja točkastih mutacija te se naziva i hipervarijabilnom regijom.

Upotreba mitohondrijske DNA u filogenetskim istraživanjima je porasla zbog intenzivnog razvoja u metodama izolacije DNA, upotrebe restrikcijskih enzima da bi se uočile nukleotidne razlike, razvoja PCR metoda te zbog korištenja univerzalnih početnica za umnožavanje DNA (Patwardhan i sur., 2014).

Karakteristike koje mitohondrijsku DNA čine pogodnom za filogenetska istraživanja su lakoća izolacije, veliki broj potencijalnih kopija, nasljeđivanje po majčinskoj liniji, manjak rekombinacije, nedostatak introna i brža evolucija u odnosu na jezgrinu DNA.

Gen za 16S rRNA se nalazi na mitohondrijskoj DNA, a kodira RNA velike podjedinice mitohondrijskih ribosoma. 16S rRNA se uglavnom koristi u proučavanju odnosa unutar porodica i nižih kategorija. Za razliku od gena za 16S rRNA gen za 12S rRNA je konzerviraniji i koristi se za proučavanje odnosa viših sistematskih kategorija. Mitohondrijski protein-kodirajući geni (npr. COI) evoluiraju brže od oba gena za rRNA te se stoga koriste za niže taksonomske kategorije poput rodova i vrsta (Hwang i Kim, 1999; Wan i sur., 2004).

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

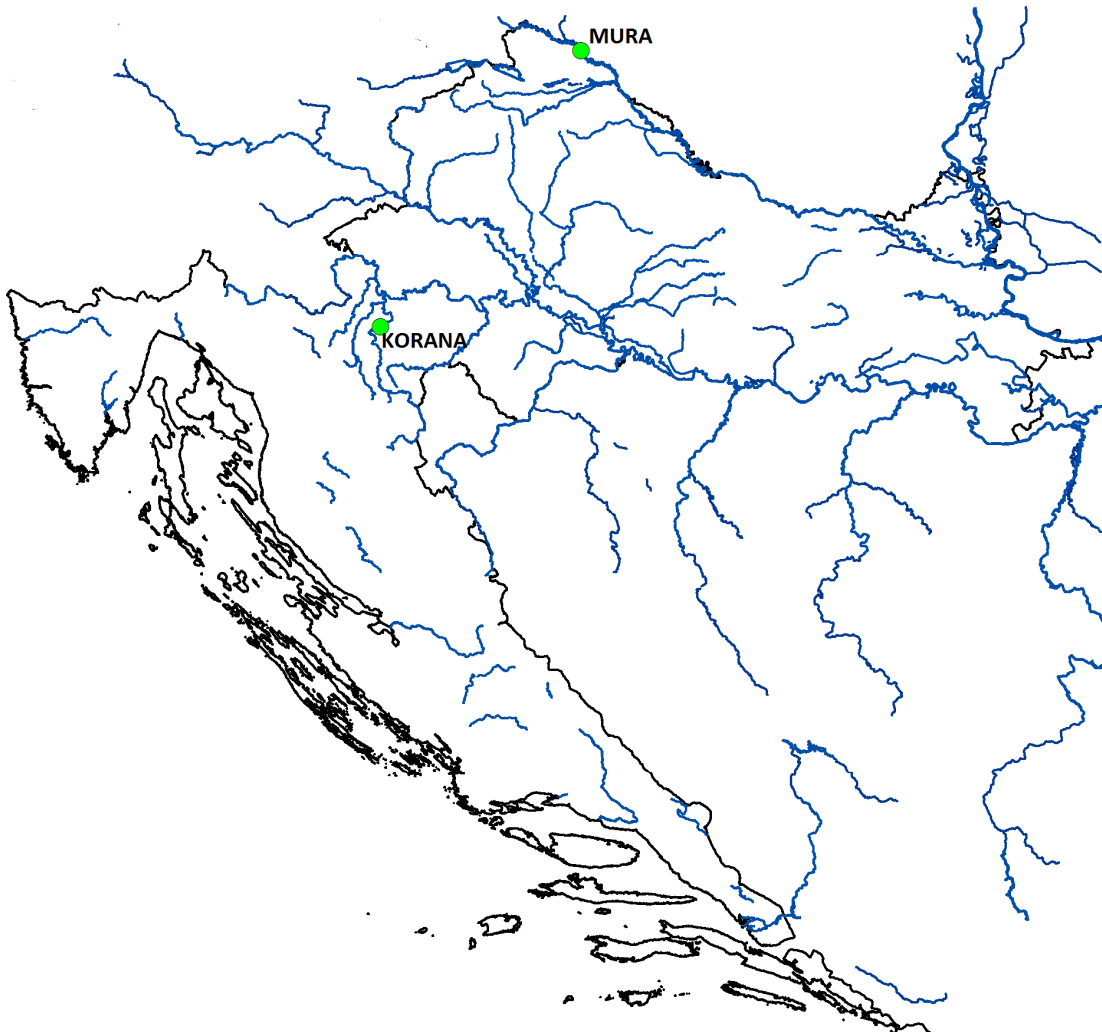
Ciljevi ovog istraživanja su bili:

- Analiza morfometrijskih značajki signalnih rakova uzorkovanih iz populacija Mure i Korane i njihova usporedba.
- Istraživanje genetičke raznolikosti populacija signalnog raka iz Mure i Korane uz upotrebu mikrosatelitnih biljega i gena za 16S rRNA.
- Usporedba morfometrijskih i genetskih podataka.
- Utvrđivanje međusobnog filogenetskog odnosa proučavanih populacija kao i njihovog filogenetskog odnosa prema istraženim populacijama u Europi i Sjevernoj Americi.
- Doprinos spoznajama o vrsti i procjeni invazivnog uspjeha.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. PODRUČJE ISTRAŽIVANJA

Uzorkovanje je provedeno tijekom lipnja 2015. godine na području rijeka Mure i Korane (Slika 8).



**Slika 8.** Područja uzorkovanja signalnog raka.

#### 3.2. ŽIVOTINJSKI MATERIJAL

Tijekom lipnja 2015. su prikupljene ukupno 42 jedinice iz rijeka Korane (31) i Mure (11). Svi rakovi sakupljeni su vršama (Slika 9). U set iz rijeke Mure su dodani i prethodno sakupljeni uzorci te su u konačnici analizirana 53 raka (Tablica 2). Po jedan pereopod svakog raka (za potrebe molekularnih analiza) pohranjen je u plastične epruvete napunjene alkoholom. Svakom uzorku je stavljena etiketa s napisanom oznakom uzorka i mjestom sakupljanja. Čitavi rakovi su pohranjeni u ledu za daljnja morfometrijska mjerenja i analize.

**Tablica 2.** Popis uzoraka vrste *Pacifastacus leniusculus* korištenih u istraživanju.

Lokalitet	Broj uzorka	Oznaka uzorka	Morfometrija	16S rRNA	Mikrosateliti
Korana	1	kar1	✓	✓	✓
	2	kar2	✓	✓	✓
	3	kar3	✓	✓	✓
	4	kar4	✓	✓	✓
	5	kar5	✓	✓	✓
	6	kar6	✓		✓
	7	kar7	✓		✓
	8	kar8	✓		✓
	9	kar9	✓		✓
	10	kar10	✓		✓
	11	kar11	✓		✓
	12	kar12	✓		✓
	13	kar13	✓		✓
	14	kar14	✓		✓
	15	kar15	✓		✓
	16	kar16	✓		✓
	17	kar17	✓		✓
	18	kar18	✓		✓
	19	kar19	✓		✓
	20	kar20	✓		✓
	21	kar21	✓		✓
	22	kar22	✓		✓
	23	kar23	✓		✓
	24	kar24	✓		✓
	25	kar25	✓		✓
	26	kar26	✓		✓
	27	kar27	✓		✓
	28	kar28	✓		✓
	29	kar29	✓		✓
	30	kar30	✓		✓
	31	kar31	✓		✓
Mura	32	mar1	✓	✓	✓
	33	mar2	✓	✓	✓
	34	mar3	✓	✓	✓
	35	mar4	✓	✓	✓
	36	mar5	✓	✓	✓
	37	mar6	✓		✓
	38	mar7	✓		✓
	39	mar8	✓		✓
	40	mar9	✓		✓
	41	mar10	✓		✓
	42	mar11	✓		✓
	43	mar12	✓		✓
	44	mar13	✓		✓
	45	svm27	✓		✓
	46	led1	✓		✓
	47	led2	✓		✓
	48	led3			✓
	49	m1			✓
	50	m7			✓
	51	m10			✓
	52	m31			✓
	53	m32			✓



**Slika 9.** Vrša za lov rakova.

### 3.3. KEMIKALIJE I PRIBOR

#### Osnovni materijal

- Mikroeprovete 1,5 mL, mikroeprovete 2 mL
- PCR mikroeprovete 0,2 mL
- Poklopci za PCR 0,2 mL mikroeprovete
- Nastavci za mikropipete 10  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L
- Nastavci za mikropipete s filterima
- Zaštitne rukavice
- Stalci

#### Kitovi

- GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep 70 (Sigma-Aldrich)
- QIAGEN Multiplex PCR kit (Qiagen)

#### Elektroforetski standardi

- Quick-Load 1kb DNA ladder (New England BioLabs Inc., UK)
- Quick-Load 100bp DNA ladder (New England BioLabs Inc., UK)

#### Oligonukleotidne početnice

- par početnica za umnažanje mikrosatelitskog lokusa LPL6
- par početnica za umnažanje mikrosatelitskog lokusa LPL22

- par početnica za umnažanje mikrosatelitskog lokusa LPL26
- par početnica za umnažanje mikrosatelitskog lokusa LPL40
- 16Sar, 16Sbr za umnažanje mtDNA gena 16S rRNA

#### Kemikalije

- Etanol
- Etidij – bromid
- Agaroza
- TAE puffer
- Loading Dye, Purple 6X (New England BioLabs Inc, UK)

#### Tehnički pribor i uređaji

- Digitalno pomično mjerilo
- Mikropipete
- Vortex miješalica
- Centrifuga
- Vodena kupelj
- Nanodrop spektrofotometar
- PCR uređaj
- Kadice za pripremu gelova
- Kadice za elektroforezu
- Analitička vaga
- Mikrovalna pećnica
- Parafilm
- Transiluminator
- Digitalni fotoaparat
- Računalo
- Hladnjak

### 3.4. MORFOMETRIJA

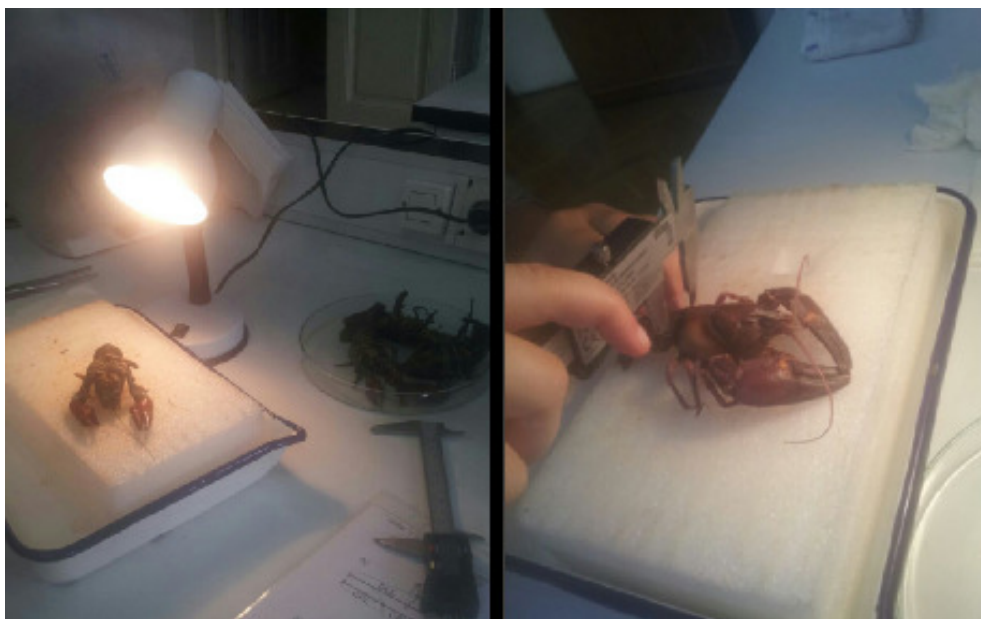
U biološkom kontekstu morfometrija je disciplina kojom se kvantitativnim analizama opisuje oblik i veličina neke morfološke značajke (Oxnard, 1978). Morfometrijskim metodama utvrđuju se dimenzije pojedinih dijelova tijela, kao i odnosi među njima. Uz pretpostavku da morfologija ovisi o genetičkoj informaciji, morfometrijske se analize može



koristiti za odvajanje populacija. Zbog činjenice da se uspoređuju jedinke različitih veličina morfometrijski podaci se normaliziraju (Sint i sur., 2005).

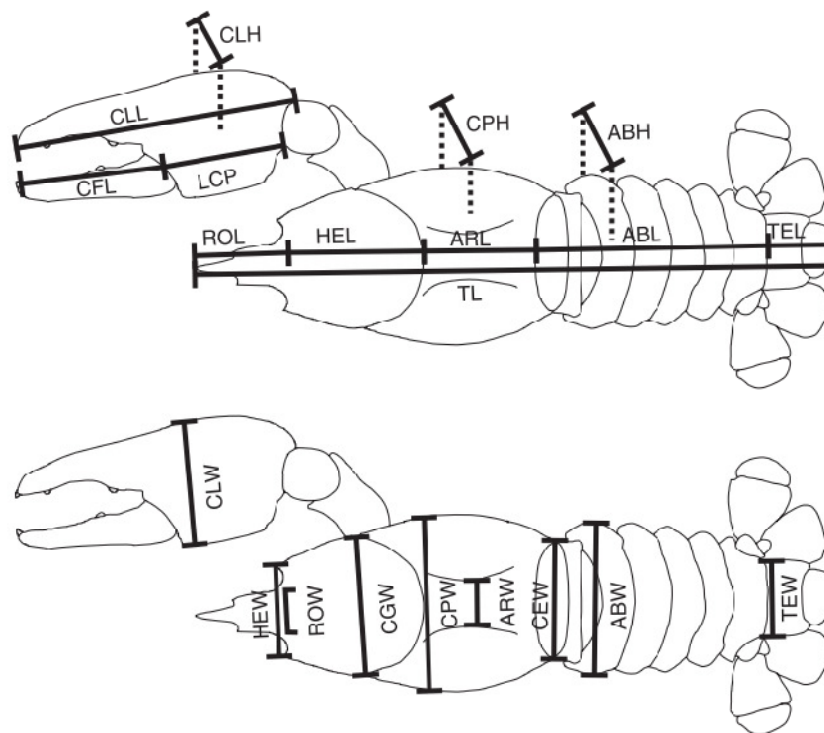
#### 3.4.1. Mjerenje morfometrijskih značajki

Morfometrijska obilježja su mjerena digitalnim pomičnim mjerilom na ukupno 47 jedinki signalnog raka (Slika 10 i Tablica 2). Na svakoj jedinci izmjerene su ukupno 22 morfometrijske značajke (Slika 11). Mjerene značajke preuzete su od Sint i suradnici (2005). To su: dužina nepomičnog prsta (CLL), dužina pomičnog prsta (CFL), dužina dlana (CPL), širina kliješta (CLW), debljina kliješta (CLH), dužina cefalotoraksa (CEF), dužina rostruma (ROL), širina rostruma (ROW), širina glave (HEW), dužina glave (HEL), širina glave ispred cervikalne brazde (CGW), širina karapaksa (CPW), dužina areole (ARL), širina areole (ARW), debljina/visina prsa (CPH), dužina abdomena (ABL), širina cefalotoraksa prije abdomena (CEW), širina prvog začanog kolutića (ABW), debljina/visina abdomena (ABH), dužina telzona (TEL), širina telzona (TEW) i ukupna dužina (TL). Bilateralne karakteristike mjerene su s lijeve i desne strane tijela. Određen je i spol jedinki.



**Slika 10.** Mjerenje morfometrijskih značajki rakova.

Fotografija: Vedrana Mijošek



**Slika 11.** Mjerene morfometrijske značajke rakova.

Preuzeto iz Sint i suradnici (2005).

### 3.4.2. Statistička obrada morfometrijskih podataka

Svi podaci su opisani deskriptivnim statističkim mjerama (minimum, maksimum, srednja vrijednost) te su normalizirani na način da su njihove vrijednosti podijeljene s vrijednosti POL koja je zapravo zbroj dužina glave (HEL) i dužina areole (ARL). To omogućuje usporedbu životinja inače različitih veličina.

Isto tako proveden je T-test kako bi se utvrdilo postoje li statistički značajne razlike između mužjaka i ženki unutar svake populacije te postoje li značajne razlike u mjenim morfometrijskih značajkama između dvije populacije.

Sva statistička obrada podataka (deskriptivna statistika, Studentov T-test) je izvedena pomoću programa Microsoft Excel i Statistica 12. Korišteni nivo značajnosti je bio 0,05.

## 3.5. MOLEKULARNE METODE

### 3.5.1. Izolacija DNA

Ukupna genomska DNA jedinki izolirana je prema protokolu korištenjem kita GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep 70 (Sigma-Aldrich). Koncentracije DNA u uzorcima izmjerene su pomoću Nanodropspektrofotometra Zavoda za botaniku. DNA

uzoraka je razrijeđena na koncentraciju od ~ 35 ng/μL. Uzorci su spremljeni u zamrzivač na -20 °C do daljnje upotrebe.

### 3.5.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Lančana reakcija polimerazom (eng. *Polymerase Chain Reaction* – PCR) je metoda u koja se koristi kako bi se iz jedne ili nekoliko molekula DNA umnožio velik broj kopija. Odvija se u ciklusima koji uključuju tri osnovna koraka: denaturaciju kalupa DNA, specifično vezanje oligonukleotidnih početnica te sintezu komplementarnih lanaca DNA. Za umnažanje su odabrani mikrosatelitni lokusi te mitohondrijski geni za 16S rRNA.

Lančanom reakcijom polimerazom umnažana su 4 mikrosatelitna lokusa; LPL6, LPL22, LPL26 i LPL40 (Froufe i sur., 2015). Oni su umnažani zajedno jer je korištena multipleks lančana reakcija polimerazom. Analiza je rađena na 53 jedinice signalnog raka. PCR reakcija je provedena pomoću QIAGEN Multiplex PCR kit (Qiagen). Reakcijska smjesa ukupnog volumena 10 μL sadržavala je 5 μL Qiagen Multiplex PCR Master Mix, 3 μL destilirane vode, 1 μL mješavine početnica s varijabilnim koncentracijama početnica (Tablica 3) te 1 μL izolirane ukupne DNA. Uz to je pripravljena i negativna kontrola koja je imala isti sadržaj izuzev uzorka DNA, a služila je kao kontrola potencijalne kontaminacije pojedinih kemikalija i pribora.

Mješavina početnica (Primer mix) sastojala se od različitih količina i koncentracija 8 početnica i TE pufera. Naime, za svaki lokus korišten je par uzvodnih (eng. *forward*) i nizvodnih (eng. *reverse*) početnica. Svaka uzvodna početnica bila je obilježena nekom od fluorescencijskih boja (VIC – zelena, NED – žuta, FAM – plava i PET – crvena). U Tablici 3 su prikazani podaci o korištenoj Multiplex PCR reakciji s pripadajućim lokusima, sekvencama početnica, fluorescencijskim bojama uzvodnih početnica, koncentracijom početnica (μM) te očekivanom veličinom umnoženog fragmenta prema Froufe i sur. (2015).

Uvjeti izvođenja PCR reakcija bili su:

95 °C , 15 min – početna denaturacija

13 ciklusa: 95 °C, 30 s – denaturacija

56 °C, 45 s – sparivanje početnica (svaki ciklus temperatura se snižava za 0,5 °C)

72 °C, 30 s – produljivanje lanca DNA

27 ciklusa: 95 °C, 30 s – denaturacija

50 °C, 30 s – sparivanje početnica

72 °C, 30 s – produljivanje lanca DNA

60 °C, 30 min – završno produljivanje lanaca DNA

**Tablica 3.** Karakteristike mikrosatelitnih lokusa za lančanu reakciju polimerazom (PCR).

Lokus	Sekvenca početnica	Flourescentna boja	Koncentracija početnica ( $\mu\text{M}$ )	Ponavljajući slijed baza	Očekivana veličina (pb)
LPL6	TGTCGGATCATAGTCGTCGT	VIC	0,45	(ttg) <sub>12</sub>	121–172
	GGCTCTCAGTAACCTACCAGG				
LPL22	CTTCTGTCTTAATTACTGAGG ATGATT	NED	3	(cata) <sub>15</sub>	82–126
	TGTATGCGATGTATGTGATGT ATGT				
LPL26	AAATAAGACCCGACAAAGCG	FAM	0,5	(tg) <sub>11</sub>	323–337
	ATGAGGAGCCGCAAGTGTA				
LPL40	CAGTCGATATTTCTTTATATC CCTCA	PET	0,6	(caa) <sub>9</sub>	128–137
	CTGGTTCCAGATAGCAGCGT				

PCR-om su umnažani i mitohondrijski geni za 16S rRNA. Međutim, za tu analizu je odabrano samo 10 jedinki signalnog raka, po 5 iz Mure i 5 iz Korane uz negativnu kontrolu. I tu je korišten QIAGEN Multiplex PCR kit (Qiagen). Reakcijska smjesa volumena 10  $\mu\text{L}$  sadržavala je 5  $\mu\text{L}$  Qiagen Multiplex PCR Master Mix, 3,6  $\mu\text{L}$  destilirane vode, po 0,2  $\mu\text{L}$  početnica 16Sar i 16Sbr i 1  $\mu\text{L}$  izolirane ukupne DNA. Početnice su preuzete iz literature (Tablica 4).

Uvjeti izvođenja PCR reakcija bili su:

95 °C , 15 min – početna denaturacija

35 ciklusa: 95 °C, 1 min – denaturacija

52 °C, 1 min – sparivanje početnica

72 °C, 1 min – produljivanje lanca DNA

72 °C, 5 min – završno produljivanje lanca DNA.

**Tablica 4.** Početnice korištene u PCR reakcijama za 16S rRNA.

Gen	Ime početnice	Sekvenca početnice	Literatura
16S rRNA	16Sar	CGCCTGTTTATCAAAAACAT	Simon i sur., 1994
	16Sbr	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT	

### 3.5.3. Gel elektroforeza

Uspješnost reakcija PCR provjeravana je elektroforezom. Gel elektroforeza je metoda razdvajanja molekula na temelju naboja ili molekulske mase. Omogućuje razdvajanje molekula DNA pod utjecajem istosmjernog električnog polja. Negativno nabijene DNA molekule kreću se od negativne katode prema pozitivnoj anodi. Na pokretljivost DNA utječu molekularna masa i konformacija, koncentracija agaroze u gelu, jakost i smjer električnog polja, kao i sastav elektroforetskog pufera. Pokretljivost DNA molekule kroz agarozni matriks obrnuto je proporcionalna logaritmu njene mase te stoga manje molekule putuju brže. U ovom slučaju radilo se o razdvajanju prema dužini DNA fragmenata.

Provjera uspješnosti umnožavanja fragmenata rađena je na 1,3 % - tnom gelu koji je pripremljen otapanjem agaroze u 1xTAE puferu. Za određivanje veličine DNA fragmenata korišteni su standardi Quick-Load 100bp i 1kb DNA Ladder (New England BioLabs Inc, UK) kojih je dodavano po 3  $\mu$ L u prvu jažicu gela. Na gel se nanosilo 5  $\mu$ L pojedinog uzorka, a zbog lakšeg praćenja elektroforeze svaki uzorak je pomiješan s ~ 1  $\mu$ L boje Gel Loading Dye, Purple 6X (New England BioLabs Inc, UK). Elektroforeza se provodila u TAE puferu pri 120V, u trajanju od 40 minuta. Gelovi su nakon elektroforeze stavljeni u vodenu otopinu etidij – bromida na 15 minuta. Etidij-bromid je boja koja omogućuje vizualizaciju fragmenata DNA pod UV svjetlom. Nakon bojanja gel je vizualiziran na UV transiluminatoru i fotografiran digitalnim fotoaparatom spojenim s računalom što je omogućilo pohranu slika gelova.

### 3.5.4. Sekvenciranje i genotipizacija

Uzorci su nakon elektroforeze zajedno poslani na određivanje duljine alela na mikrosatelitnim lokusima (genotipiziranje) i sekvenciranje mtDNA 16S rRNA u komercijalni servis MacroGen Inc. (Amsterdam, Nizozemska). Genotipizacija je izvedena uz 500 LIZ kao dužinski standard, dok je sekvenciranje napravljeno uz korištene 16Sar i 16Sbr početnice.

### 3.6. RAČUNALNE I STATISTIČKE ANALIZE MIKROSATELITNIH BILJEGA

#### 3.6.1. Analiza kromatograma

Dobiveni kromatogrami analizirani su programom GeneMapper (Applied Biosystems) koji omogućava određivanje dužine mikrosatelitnih alela na određenim lokusima, a više određenih lokusa neke jedinke daje njezin genotip. Rezultati su upisani u Excel tablicu za buduće analize.

#### 3.6.2. Opisna statistika i analiza Hardy – Weinbergove ravnoteže

Broj alela ( $N$ ), frekvencije alela, očekivana ( $H_E$ ) i uočena ( $H_O$ ) heterozigotnost kao i indeks križanja u bliskom srodstvu ( $F_{IS}$ ) izračunati su programom GENETIX 4.05 (Belkhir i sur. 1996-2004), a fiksacijski indeks ( $F_{ST}$ ) programom GenAlex 6.5 (Peakall i Smouse, 2012). Frekvencije nul - alela određene su programom FreeNA (Chapuis i Estoup, 2007).

Program FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2001) korišten je za izračun alelnog bogatstva (eng. allelic richness,  $N_a$ ) što je mjera broja alela po lokusu neovisno o veličini uzorka.

Hardy – Weinbergova ravnoteža je testirana u programu GENEPOP 4.2 (Raymond i Rousset, 1995) te je time određena  $p$  vrijednost za pojedinačne lokuse. Pri tom je korišten Markovljev chain test (10 000 dememorizacija, 20 serija, 10 000 ponavljanja).

#### 3.6.3. Strukturiranje populacija

U programu GENETIX 4.05 (Belkhir i sur. 1996-2004) je napravljena i faktorijalna analiza korespondencije (FCA) koja vizualizira genetičke odnose među jedinkama.

Procjena postojanja strukturiranja unutar populacije napravljena je pomoću programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard i sur., 2000). Cilj je odrediti pripadnost jedinki određenim genetičkim grupama (klasterima) te odrediti najvjerojatniji broj populacija ( $K$ ). Pretpostavljene vrijednosti  $K$  definirane su od 1 do 5. Za svaku vrijednost rađeno je 10 ponavljanja, a parametri programa bili su: „burn-in period“ 100 000 i „MCM“ od 500 000 iteracija prema vrijednostima korištenim u Froufe i sur. (2015). Grafički prikaz dobivenih rezultata je napravljen pomoću online aplikacije CLUMPAK (Kopelman i sur., 2015).

#### 3.6.4. Usporedba rezultata

Dobiveni podaci koji govore o genetskoj raznolikosti signalnog raka u Hrvatskoj uspoređeni su s onima iz Portugala, Velike Britanije, Švedske i Finske dostupnima iz literature (Froufe i sur., 2015).

### 3.7. RAČUNALNE I STATISTIČKE ANALIZE MITOHONDRIJSKE DNA

#### 3.7.1. Analiza sekvenci DNA

Za pregledavanje i uređivanje dobivenih sekvenci korišten je program SEQUENCHER (Gene Codes Corporation). Razlike u očitanim nukleotidima provjerene su pregledavanjem kromatograma pojedinih sekvenci. Sve pogreške sekvenciranja (pogrešno očitano signal, preklapanja signala dviju baza ili izostavljanja neke od baza) su ručno ispravljene. Naposljetku su pregledane sekvence pohranjene u fasta format.

Autentičnost sekvenciranih slijedova je provjerena korištenjem programa za lokalno sravnjenje BLAST (eng. *Basic Local Alignment Tool*) koji uspoređuje eksperimentalno dobivenu nukleotidnu sekvencu s već postojećima u bazi NCBI (National Center for Biotechnology Information). Na taj način su u set podataka dodane i homologne sekvence (Larson i sur., 2012) iz baze GenBank. Uključene su i sekvence vanjskih grupa (Tablica 5).

**Tablica 5.** Nukleotidne sekvence vanjskih grupa za gen 16S rRNA iz baze GenBank.

Naziv	Pristupni broj	Referenca
<i>Pacifastacus connectens</i>	JX077131	Larson i sur., 2012
<i>Orconectes limosus</i>	KP205431	Gan i sur., 2014
<i>Procambarus clarkii</i>	KJ645829	Quan i sur., 2014
<i>Astacus astacus</i>	GU727618	Jadan i sur., 2010

Sve te sekvence su međusobno uspoređene kako bi se dobili jedinstveni haplotipovi. Haplotip čini skupina sekvenci s identičnim nukleotidnim slijedom. Te jedinstvene sekvence haplotipova su zatim učitane u program MEGA 6.06 (Tamura i sur., 2013) te su sravnjene upotrebom Muscle opcije (Edgar, 2004) kako bi se mogle raditi daljnje filogenetske analize.

#### 3.7.2. Filogenetska rekonstrukcija

Prije provođenja same filogenetske analize potrebno je odrediti optimalni evolucijski model za odabrani gen. Evolucijski modeli opisuju na koji način je došlo do nukleotidnih promjena u sekvencama koje koristimo prilikom izrade filogenetskih stabala (Hall, 2007). Određen je i korišten je evolucijski model Tamura-3 parametar (Tamura, 1992) uz predloženu gama distribuciju. Filogenetsko stablo je konstruirano primjenom statističke metode najveće vjerojatnosti (eng. *Maximum Likelihood*), a za izračun statističke podržanosti pojedinih grananja filogenetskog stabla koristila se „bootstrap“ metoda (1000 ponavljanja). Konačno stablo je kondenzirano na način da nisu prikazana grananja s „bootstrap“ vrijednostima manjim od 50 %. Stablo je grafički doručeno programom Inkscape.

## 4. REZULTATI

### 4.1. MORFOMETRIJA

Morfometrijska je analiza provedena na 47 rakova iz rijeke Korane i Mure. Mjerene morfometrijske značajke opisane su deskriptivnom statistikom i rezultati, zasebno za svaku populaciju i spol, su prikazani u Tablici 6 i 7.

**Tablica 6.** Deskriptivnom statistikom opisane značajke mužjaka (a) i ženki (b) iz Korane.

a)

	Populacija: Korana, spol: M				
	Broj jedinki	Srednja vrijednost	Minimum	Maksimum	St. dev.
CLLR	20	46,39	32,97	65,61	10,23
CFLR	20	27,11	19,47	37,90	6,11
CPLR	20	15,68	10,85	29,94	4,57
CLWR	20	18,78	13,57	25,29	4,09
CLHR	20	9,89	6,69	13,40	2,26
CEFR	20	43,85	36,90	51,57	5,19
ROL	20	14,95	12,62	20,58	1,98
ROW	20	8,34	6,70	10,40	1,03
HEW	20	15,92	12,13	19,66	2,00
HEL	20	20,09	15,80	26,53	3,09
CGW	20	22,22	17,40	28,24	3,41
CPW	20	26,09	19,44	33,48	4,14
ARL	20	14,96	11,91	18,48	1,95
ARW	20	7,30	5,11	9,43	1,07
CPH	20	23,47	18,27	30,29	3,79
ABL	20	37,69	30,95	44,23	3,29
CEW	20	18,61	15,28	23,88	2,63
ABW	20	24,41	19,48	30,06	3,12
ABH	20	16,90	13,62	21,63	2,13
TEL	20	13,73	11,21	16,82	1,68
TEW	20	12,76	10,69	15,45	1,55
TL	20	103,10	87,36	121,69	10,51

b)

	Populacija: Korana, spol: Ž				
	Broj jedinki	Srednja vrijednost	Minimum	Maksimum	St. dev.
CLLR	11	39,12	25,91	52,76	7,32
CFLR	11	23,31	16,37	31,22	4,65
CPLR	11	11,86	8,46	16,67	2,31
CLWR	11	15,30	9,26	20,80	3,14
CLHR	11	7,79	4,97	9,95	1,40
CEFR	11	42,54	31,21	52,03	5,71
ROL	11	15,07	12,70	19,67	2,42
ROW	11	7,93	6,11	10,31	1,19
HEW	11	16,09	12,29	19,42	2,14
HEL	11	19,95	14,56	25,45	2,73
CGW	11	21,90	16,35	27,68	3,43
CPW	11	25,50	18,45	33,67	4,33
ARL	11	14,71	10,18	20,03	2,43
ARW	11	7,30	5,18	9,01	1,15
CPH	11	23,19	16,65	29,76	3,77
ABL	11	38,79	31,96	48,47	4,86
CEW	11	18,66	14,01	24,17	2,80
ABW	11	27,95	18,81	39,08	5,61
ABH	11	17,29	10,24	22,34	3,65
TEL	11	14,42	10,48	19,28	2,33
TEW	11	13,07	9,90	17,25	1,98
TL	11	105,24	81,23	131,67	13,20



**Tablica 7.** Deskriptivnom statistikom opisane značajke mužjaka (a) i ženki (b) iz Mure.

a)

	Populacija: Mura, spol: M				
	Broj jedinki	Srednja vrijednost	Minimum	Maksimum	St. dev
CLLR	10	50,44	33,71	74,86	13,81
CFLR	10	29,07	18,21	45,44	8,48
CPLR	10	16,03	11,44	22,33	4,20
CLWR	10	21,43	14,98	31,00	5,35
CLHR	10	10,93	8,36	15,52	2,62
CEFR	10	46,43	35,18	57,17	7,47
ROL	10	14,07	11,61	17,87	1,98
ROW	10	7,89	6,17	10,09	1,29
HEW	10	15,66	11,24	19,46	2,82
HEL	10	21,19	15,57	27,22	3,72
CGW	10	22,21	16,61	28,45	3,73
CPW	10	26,17	18,22	32,85	4,59
ARL	10	16,69	12,75	20,88	2,69
ARW	10	6,98	4,26	8,82	1,42
CPH	10	23,91	17,46	30,53	3,83
ABL	10	38,79	32,07	46,34	4,89
CEW	10	17,79	13,47	22,88	2,62
ABW	10	25,48	19,52	31,33	3,90
ABH	10	15,66	12,09	19,12	2,58
TEL	10	14,17	10,96	18,02	2,24
TEW	10	12,96	10,55	15,90	1,88
TL	10	107,69	85,02	128,98	15,27

b)

	Populacija: Mura, spol: Ž				
	Broj jedinki	Srednja vrijednost	Minimum	Maksimum	St. dev
CLLR	6	38,73	32,15	42,82	4,39
CFLR	6	23,08	17,30	26,32	4,01
CPLR	6	11,20	10,13	14,29	1,55
CLWR	6	17,04	14,44	19,30	1,92
CLHR	6	8,48	7,28	10,30	1,12
CEFR	6	43,14	37,79	46,44	3,84
ROL	6	13,46	11,14	15,28	1,76
ROW	6	7,57	6,25	8,28	1,02
HEW	6	15,58	13,92	17,76	1,41
HEL	6	19,36	17,86	21,26	1,23
CGW	6	20,85	18,16	22,28	1,98
CPW	6	24,05	22,44	25,91	1,35
ARL	6	15,00	12,49	16,71	1,61
ARW	6	6,77	5,98	8,09	0,88
CPH	6	22,91	19,38	25,84	2,59
ABL	6	39,50	34,86	42,24	3,34
CEW	6	17,03	14,61	18,69	1,52
ABW	6	29,62	22,31	36,15	5,73
ABH	6	14,61	12,12	18,34	2,45
TEL	6	14,02	11,97	15,45	1,47
TEW	6	12,68	11,10	14,09	1,17
TL	6	104,77	88,83	113,02	9,73

Vidljivo je da je u obje populacije bilo gotovo dvostruko više mužjaka, nego ženki. Prosječna ukupna dužina tijela kod oba spola bila je ~ 10,5 cm.

S obzirom da su neke značajke mjerene i na desnoj i lijevoj strani tijela testirano je jesu li one simetrične, odnosno postoji li značajna korelacija između njih. Rezultati (Prilog 1) su pokazali da postoji statistički značajna korelacija između lijeve i desne strane tijela te su stoga u daljnjim analizama korištene samo značajke desne strane.

Nadalje, analizirano je da li se mjerene značajke razlikuju između mužjaka i ženki. Rezultati T-testa pokazali su da se mužjaci i ženke značajno razlikuju po mjerama kliješta (CLL, CFL, CPL, CLW, CLH i CEF) i abdomena (ABW) (Prilog 2). Stoga su u daljnjim analizama dva spola tretirana (analizirana) zasebno.

Svi morfometrijski podaci su zatim normalizirani kako bi se izbjeglo dobivanje značajnih razlika uzrokovanih samom veličinom tijela životinja. Normalizirani su podaci korišteni kako bi se analiziralo razlikuju li se mužjaci i ženke u mjerenim morfometrijskim značajkama između dviju populacija (Tablice 8 i 9). Dobiveni rezultati ukazuju na značajne razlike u morfometrijskim značajkama između dvije populacije. Iz rezultata T-testa je vidljivo da se mužjaci razlikuju u mnogo više značajki, nego ženke. Kod njih postoji statistički značajna razlika u čak 13 mjerenih značajki. Mužjaci dviju populacija razlikuju se prema dužini i širini rostruma (ROL i ROW), dužini i širini glave (HEW i HEL), širini glave iza cervikalne brazde (CGW), širini karapaksa (CPW), dužini areole (ARL), širini areole (ARW), debljini prsa (CPH), širini cefalotoraksa prije cervikalne brazde (CEW), debljini abdomena (ABH) te dužini i širini telzona (TEL i TEW). S druge strane, ženke se značajno razlikuju samo u širini kliješta (CLW).

**Tablica 8.** Rezultati T-testa za razlike između mužjaka dviju populacija. Statistički značajne razlike prikazane su crvenom bojom ( $p < 0,05$ ).

Variable	T-tests; Grupiranje: nalazište (normalizirani.sta) Grupa 1: Korana Grupa 2: Mura Uključuje: spol=0										
	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
cil	1,311719	1,313539	-0,03377	28	0,973303	20	10	0,130070	0,156742	1,452177	0,470782
cfl	0,766117	0,754623	0,34532	28	0,732432	20	10	0,078022	0,100636	1,663678	0,334930
cpl	0,441550	0,419242	0,80577	28	0,427165	20	10	0,077505	0,056705	1,868179	0,337903
clw	0,531133	0,561235	-1,37136	28	0,181155	20	10	0,049994	0,068679	1,887208	0,233506
clh	0,279365	0,286856	-0,62005	28	0,540240	20	10	0,030989	0,031624	1,041436	0,889751
cef	1,255665	1,227637	1,38287	28	0,177635	20	10	0,056656	0,041757	1,840928	0,349647
rol	0,428716	0,374253	4,06448	28	0,000353	20	10	0,036346	0,030582	1,412420	0,609863
row	0,239112	0,209006	4,42147	28	0,000135	20	10	0,018275	0,016017	1,301863	0,706896
hew	0,456241	0,414018	2,95094	28	0,006340	20	10	0,037260	0,036269	1,055364	0,981442
hel	0,572317	0,558890	2,14100	28	0,041121	20	10	0,017891	0,011832	2,286499	0,204306
cgw	0,633377	0,586641	4,63491	28	0,000075	20	10	0,027555	0,022495	1,500488	0,542627
cpw	0,743586	0,691226	2,97617	28	0,005958	20	10	0,045627	0,044997	1,028163	1,000000
arl	0,427683	0,441110	-2,14100	28	0,041121	20	10	0,017891	0,011832	2,286499	0,204306
arw	0,208868	0,183690	3,30699	28	0,002594	20	10	0,019816	0,019320	1,051957	0,985837
cph	0,668873	0,632985	2,18524	28	0,037399	20	10	0,043568	0,039835	1,196220	0,814216
abl	1,084404	1,033029	1,56304	28	0,129276	20	10	0,085291	0,083962	1,031914	1,000000
cew	0,531571	0,472097	5,30725	28	0,000012	20	10	0,027450	0,031840	1,345412	0,558011
abw	0,698647	0,674689	1,66111	28	0,107850	20	10	0,039272	0,032536	1,456902	0,574855
abh	0,485885	0,416785	3,25618	28	0,002953	20	10	0,053917	0,056595	1,101772	0,813472
tel	0,393052	0,375254	2,33383	28	0,027008	20	10	0,019799	0,019460	1,035134	1,000000
tew	0,365284	0,343778	3,32669	28	0,002466	20	10	0,016694	0,016687	1,000778	1,000000
tl	2,958803	2,855585	1,73339	28	0,094028	20	10	0,165903	0,124250	1,782870	0,376250

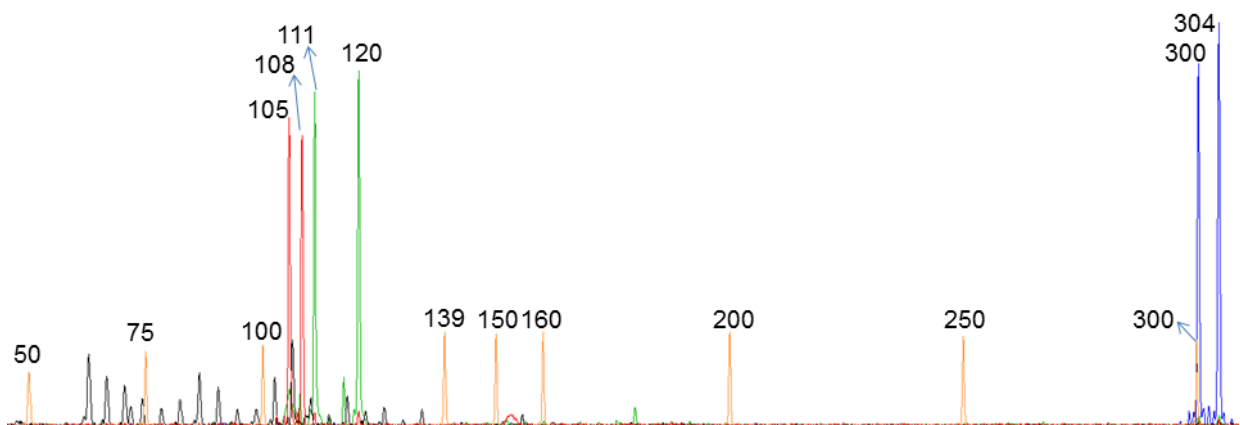
**Tablica 9.** Rezultati T-testa za razlike između ženki dviju populacija. Statistički značajne razlike prikazane su crvenom bojom ( $p < 0,05$ ).

Variable	T-tests; Grupiranje: nalazište (normalizirani.sta) Grupa 1: Korana Grupa 2: Mura Uključuje: spol=1										
	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
cil	1,124174	1,126444	-0,05324	15	0,958245	11	6	0,085884	0,080191	1,147024	0,934530
cfl	0,669976	0,669351	0,01674	15	0,986862	11	6	0,065080	0,088118	1,833271	0,387836
cpl	0,341633	0,325777	0,88610	15	0,389550	11	6	0,036977	0,031541	1,374430	0,762998
clw	0,438726	0,497200	-2,47540	15	0,025724	11	6	0,044653	0,050113	1,259459	0,705036
clh	0,224517	0,246853	-1,84902	15	0,084261	11	6	0,023496	0,024402	1,078600	0,855379
cef	1,229909	1,256275	-0,84462	15	0,411593	11	6	0,060527	0,063426	1,098087	0,837742
rol	0,435912	0,392039	2,09586	15	0,053470	11	6	0,039971	0,043684	1,194399	0,755754
row	0,229272	0,219724	1,13020	15	0,276142	11	6	0,015816	0,018190	1,322747	0,659091
hew	0,465848	0,453688	0,78049	15	0,447243	11	6	0,033537	0,024033	1,947256	0,478572
hel	0,576412	0,564182	1,56277	15	0,138954	11	6	0,016307	0,013471	1,465431	0,705401
cgw	0,632277	0,606787	1,23585	15	0,235520	11	6	0,045664	0,028012	2,657449	0,292253
cpw	0,735066	0,701287	1,34844	15	0,197528	11	6	0,058325	0,022475	6,734343	0,048193
arl	0,423588	0,435818	-1,56277	15	0,138954	11	6	0,016307	0,013471	1,465431	0,705401
arw	0,211008	0,197326	1,25298	15	0,229392	11	6	0,020389	0,023610	1,340856	0,646533
cph	0,669414	0,666117	0,12552	15	0,901781	11	6	0,057662	0,037215	2,400801	0,345865
abl	1,126403	1,150123	-0,52617	15	0,606464	11	6	0,103782	0,046125	5,062673	0,087381
cew	0,539134	0,497829	1,87766	15	0,080011	11	6	0,036044	0,055118	2,338320	0,237055
abw	0,802308	0,858184	-1,15813	15	0,264920	11	6	0,072478	0,128860	3,161021	0,114500
abh	0,497615	0,423895	2,04965	15	0,058305	11	6	0,079858	0,048087	2,757965	0,274343
tel	0,415631	0,408070	0,67690	15	0,508772	11	6	0,019944	0,025644	1,653341	0,465999
tew	0,377420	0,369420	0,74728	15	0,466447	11	6	0,019365	0,024178	1,558889	0,513945
tl	3,046684	3,049439	-0,03751	15	0,970572	11	6	0,144744	0,144630	1,001581	1,000000

## 4.2. MIKROSATELITI

### 4.2.1. Uspješnost genotipizacije

Genotipizacija je provedena na 53 uzorka signalnog raka na 4 lokusa. Utvrđeno je da lokus LPL22 ima nisku uspješnost amplifikacije te je stoga isključen iz daljnjih analiza. Većina uzoraka tako je na kraju imala tri uspješno genotipizirana lokusa. Na nekoliko uzoraka nije se amplificirao lokus LPL6. Primjer amplifikacije prikazan je na primjeru uzorka mar8 (Slika 12). Svi genotipovi (duljine alela) prikazani su u Tablici 10.



**Slika 12.** Elektroferogram uzorka mar8 za sve lokuse. Zelenom bojom prikazani su aleli za lokus LPL6, plavom LPL26, a crvenom za lokus LPL40. Narančasta boja odgovara dužinskom standardu. Crna boja pokazuje neuspješno amplificirane alele za lokus LPL22.

**Tablica 10.** Genotipovi (duljine alela) signalnih rakova iz Korane i Mure.

Oznaka	Populacija	Lokusi s alelima					
		LPL6		LPL26		LPL40	
kar1	korana	114	114	304	304	105	105
kar2	korana	108	150	302	304	108	108
kar3	korana	/	/	304	304	108	108
kar4	korana	123	150	302	304	105	108
kar5	korana	120	120	304	304	105	108
kar6	korana	114	114	302	304	108	108
kar7	korana	120	123	302	304	105	105
kar8	korana	108	150	304	304	108	114
kar9	korana	114	150	302	304	105	105
kar10	korana	105	108	304	304	105	108
kar11	korana	108	120	302	304	105	105
kar12	korana	108	150	304	304	105	108
kar13	korana	108	108	304	304	105	108
kar14	korana	108	108	304	304	105	108
kar15	korana	105	120	302	304	105	114
kar16	korana	108	150	304	304	105	105
kar17	korana	120	120	304	304	105	108
kar18	korana	108	108	302	304	105	108
kar19	korana	114	120	304	304	105	108
kar20	korana	114	150	304	304	108	108
kar21	korana	108	108	304	304	105	108
kar22	korana	/	/	304	304	105	108
kar23	korana	165	180	302	304	105	108
kar24	korana	114	114	304	304	105	108
kar25	korana	108	114	302	304	105	114
kar26	korana	108	108	304	304	105	105
kar27	korana	114	150	304	304	105	108
kar28	korana	108	108	304	304	105	108
kar29	korana	114	114	304	304	108	108
kar30	korana	108	114	304	304	105	108
kar31	korana	114	114	304	304	108	108
mar1	mura	120	123	304	314	108	108
mar2	mura	117	120	304	304	108	108
mar3	mura	120	150	304	304	105	108
mar4	mura	108	108	304	304	105	105
mar5	mura	105	108	304	306	108	114
mar6	mura	108	108	304	304	105	108
mar7	mura	108	120	300	304	105	105
mar8	mura	111	120	300	304	105	108
mar9	mura	111	120	304	304	105	108
mar10	mura	111	117	304	304	105	111
mar11	mura	108	108	304	304	114	125
mar12	mura	108	108	306	306	105	105
mar13	mura	108	108	304	306	108	125
svm27	mura	108	108	304	304	105	108
led1	mura	108	108	302	304	105	108
led2	mura	120	150	304	304	105	108
led3	mura	105	150	304	304	105	108
m1	mura	108	108	304	304	105	111
m7	mura	108	117	304	304	105	105
m10	mura	102	120	306	306	108	108
m31	mura	105	108	304	304	105	108
m32	mura	108	108	304	314	105	108

#### 4.2.2. Opisna statistika i analiza Hardy – Weinbergove ravnoteže

Rezultati su pokazali da su svi istraženi lokusi polimorfni. Utvrđena je prisutnost 21 različitog alela na tri ispitivana lokusa. Ukupno najveći broj alela; njih 11, ima lokus LPL6 dok druga dva lokusa imaju po 5 alela. Veći broj prisutnih alela zabilježen je kod populacije rakova iz Mure, osobito za lokus LPL26 na kojem za rakove iz Mure zabilježeno 5 različitih alela, a za rakove iz Korane samo 2. Usporedba rezultata prikazana je u Tablici 11.

**Tablica 11.** Usporedba broja alela po lokusu.

	LPL6	LPL26	LPL40
<b>Korana</b>	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Mura</b>	<b>8</b>	<b>5</b>	<b>5</b>
Hrvatska ukupno	11	5	5
Froufe i sur., 2015	14	5	4

Usljed mutacija na mjestima vezanja mikrosatelitnih početnica moguće je pretpostaviti da neki aleli u istraživanim populacijama nisu umnoženi. Takvi se aleli nazivaju nul-alelima, a njihovo postojanje dovodi do krive procjene udjela heterozigotnih jedinki u populaciji i time do prividnog manjka heterozigota. Prisutnost im je ustanovljena na 2 lokusa, ali frekvencija nije visoka. Rezultati naših analiza kao i analiza Froufe i sur., 2015 su prikazani u Tablici 12. Frekvencija nul-alela je najveća za lokus LPL6 dok za lokus LPL40 nisu zabilježeni.

**Tablica 12.** Frekvencije nul-alela po lokusima u istraživanim populacijama.

	LPL6	LPL26	LPL40
<b>Korana</b>	<b>0,11</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
<b>Mura</b>	<b>0,00</b>	<b>0,09</b>	<b>0,00</b>
Velika Britanija (Froufe i sur., 2015)	0,00	0,00	0,00
Portugal (Froufe i sur., 2015)	0,00	0,00	0,00
Finska (Froufe i sur., 2015)	0,00	0,07	0,17
Švedska (Froufe i sur., 2015)	0,00	0,10	0,00

Najniža vrijednost genetičke raznolikosti (očekivane heterozigotnosti) nađena je za populaciju rakova iz Korane za lokus LPL26 i iznosi 0,271 (Tablica 13). Najveća očekivana heterozigotnost je nađena za lokus LPL6. Uočena heterozigotnost veća je od očekivane za obje populacije na lokusu LPL40, a manja na lokusu LPL6. Na lokusu LPL26 uočena

heterozigotnost je veća od očekivane ako gledamo rijeku Koranu, ali je manja za Muru. Populacija iz Mure pokazuje veće alelnu bogatstvo na svim analiziranim lokusima (Tablica 13).

**Tablica 13.** Parametri genetičke raznolikosti za pojedine lokuse.

Populacija	LPL6				LPL26				LPL40			
	$N_a$	$H_E$	$H_O$	$F_{IS}$	$N_a$	$H_E$	$H_O$	$F_{IS}$	$N_a$	$H_E$	$H_O$	$F_{IS}$
<b>Korana</b>	<b>7,4</b>	<b>0,764</b>	<b>0,552</b>	<b>0,294</b>	<b>2</b>	<b>0,271</b>	<b>0,323</b>	<b>-0,176</b>	<b>3</b>	<b>0,545</b>	<b>0,613</b>	<b>-0,109</b>
<b>Mura</b>	<b>8</b>	<b>0,697</b>	<b>0,591</b>	<b>0,175</b>	<b>5</b>	<b>0,414</b>	<b>0,318</b>	<b>0,254</b>	<b>5</b>	<b>0,62</b>	<b>0,682</b>	<b>-0,077</b>
Velika Britanija	7,8	0,853	1	-0,18	2,3	0,191	0,2	-0,05	3	0,545	0,667	-0,233
Portugal	6,2	0,844	0,933	-0,108	3,3	0,422	0,433	-0,027	2	0,452	0,467	-0,033
Finska	6,8	0,817	0,842	-0,032	2,3	0,246	0,182	0,266	3,4	0,525	0,273	0,487
Švedska	5,8	0,739	0,762	-0,032	1,8	0,15	0,08	0,473	3,3	0,61	0,68	-0,118

$N_a$  – alelnu bogatstvo

$H_E$  – očekivana heterozigotnost

$H_O$  – uočena heterozigotnost

$F_{IS}$  – koeficijent križanja u bliskom srodstvu

Srednja vrijednost očekivane heterozigotnosti za sve lokuse iznosi 0,526 za signalne rakove iz Korane, a 0,577 za one iz rijeke Mure (Tablica 14). Srednje vrijednosti uočene heterozigotnosti su manje za obje populacije te iznose 0,496 za Koranu odnosno 0,530 za Muru. Koeficijent križanja u bliskom srodstvu ( $F_{IS}$ ) je viši za populaciju rijeke Mure i iznosi 0,117, dok je za Koranu 0,003. Srednja vrijednost alelnog bogatstva za rijeku Muru iznosi 6, a za Koranu 4,13 (Tablica 14). Fiksacijski indeks za ispitivane populacije je najmanji za lokus LPL40, dok za preostala dva lokusa postiže vrlo slične vrijednosti (Tablica 15).

**Tablica 14.** Srednje vrijednosti parametara genetičke raznolikosti istraživanih populacija.

Populacija	$N_a$	$H_E$	$H_O$	$F_{IS}$
<b>Korana</b>	<b>4,13</b>	<b>0,526</b>	<b>0,496</b>	<b>0,003</b>
<b>Mura</b>	<b>6,00</b>	<b>0,577</b>	<b>0,530</b>	<b>0,117</b>
Velika Britanija	4,36	0,530	0,622	-0,154
Portugal	3,83	0,572	0,611	-0,056
Finska	4,16	0,529	0,432	0,240
Švedska	3,63	0,500	0,507	0,108

**Tablica 15.** Fiksacijski indeksi po lokusima u istraživanim populacijama.

	LPL6	LPL26	LPL40	Srednja vrijednost
<b><math>F_{ST}</math> (Korana/Mura)</b>	<b>0,039</b>	<b>0,035</b>	<b>0,004</b>	0,026
$F_{ST}$ (Froufe i sur., 2015)	0,102	0,027	0,253	0,127

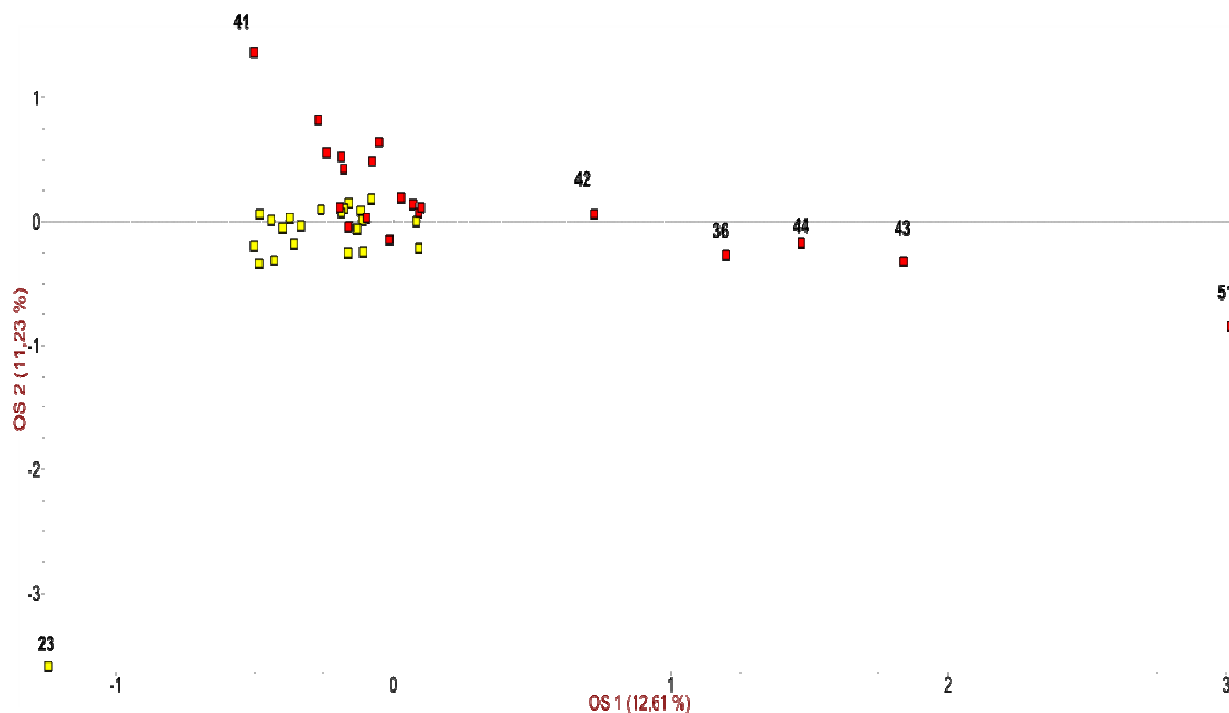
Značajno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže među hrvatskim uzorcima pronađeno je samo za lokus LPL6 za obje lokacije (Tablica 16).

**Tablica 16.** Odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže po lokusima. Crvenom bojom su označene statistički značajne vrijednosti ( $p < 0,05$ ).

	LPL6	LPL26	LPL40
<b>Korana</b>	<b>0,0034</b>	<b>0,5686</b>	<b>0,699</b>
<b>Mura</b>	<b>0,0013</b>	<b>0,2212</b>	<b>0,2015</b>
Froufe i sur., 2015	0,567	0,510	0,176

#### 4.2.3. Strukturiranje populacija

U svrhu grafičkog prikaza odnosa između analiziranih genotipova provedena je faktorijalna analiza korespondencije koja nije jasno odvojila dvije populacije (Slika 13). Većina jedinki grupirana je zajedno, iako se ipak može uočiti i veća raznolikost genotipova za rakove iz rijeke Mure. Naime, za rijeku Koranu svojim genotipom „odskake“ samo uzorak kar23, dok se za rijeku Muru radi o 6 rakova.



**Slika 13.** Prikaz rezultata faktorijalne analize korespondencije prema genotipu signalnog raka.

Žuti kvadratići predstavljaju uzorke iz Korane, a crveni iz Mure. Brojevima su prikazani uzorci koji se ističu svojim genotipovima (Tablica 10).

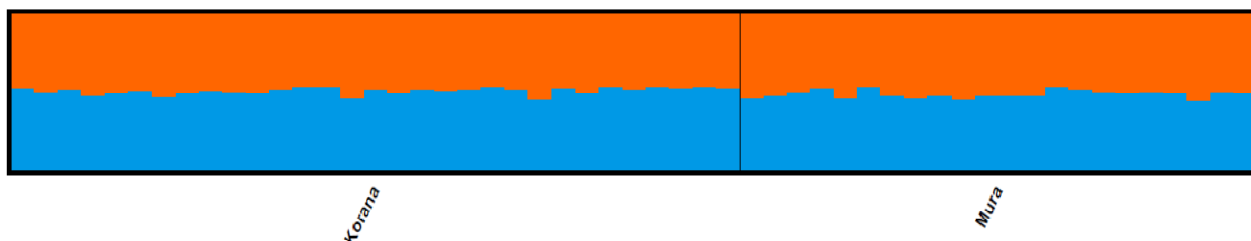


STRUCTURE analiza je pokazala da je najvjerojatniji broj genetskih grupa (K) 1 za istraživane uzorke. Rezultati su prikazani u Tablici 17.

**Tablica 17.** Rezultat STRUCTURE analize. K s najvećom vrijednosti je označen crvenom bojom.

K	Reps	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	Ln''(K)
<b>1</b>	<b>10</b>	<b>-378.740000</b>	<b>0.333999</b>	—	—
2	10	-391.860000	4.823139	-13.120000	11.980000
3	10	-416.960000	21.147324	-25.100000	24.010000
4	10	-418.050000	27.223121	-1.090000	18.000000
5	10	-437.140000	18.846644	-19.090000	—

Vizualizacija je pokazala da sve jedinke pripadaju istoj grupi. Vidljivo je da ne postoji jasna podjela uzoraka iz rijeke Korane i Mure (Slika 14).



**Slika 14.** Prikaz rezultata analize programom STRUCTURE + CLUMPAK. Jedinke su poredane redom kao u Tablici 10, a crna crta razgraničava jedinke iz dvije rijeke.

#### 4.3. MITOHONDRIJSKA DNA – 16S rRNA

##### 4.3.1. Uspješnost PCR reakcije

Gel elektroforeza je pokazala da je fragment 16S rRNA uspješno umnožen na ukupno 9 od 10 korištenih uzoraka tako da su u konačnici analizirane 4 jedinke iz Mure i 5 iz Korane.

##### 4.3.2. Analiza sekvenci DNA

U analizama je korišteno 9 eksperimentalno dobivenih nukleotidnih sekvenci te 824 sekvence signalnog raka i 4 sekvence vanjskih grupa preuzete iz baze GenBank (Tablica 5). Ustanovljeno je da postoji 81 jedinstveni haplotip na temelju postojećih sekvenci iz baze GenBank (Larson i sur, 2012), a analize su pokazale da sve naše novo dobivene sekvence

pripadaju nekom od već postojećih haplotipova. Ustanovljeno je da sve jedinke iz rijeke Korane pripadaju istom haplotipu (H25), dok se rijeka Mura pokazala znatno raznolikijom jer sve jedinke pripadaju različitim haplotipovima (H11, H19, H28 i H33). Ovim je istraživanjem utvrđeno postojanje 5 različitih haplotipova signalnih rakova na području Hrvatske. Svi korišteni haplotipovi, sekvence i njihovi pristupni brojevi te pripadnost određenoj vrsti, odnosno grupi prikazani su u Tablici 18.

Ukupna duljina sravnjenih nukleotidnih sekvenci je iznosila 443 nukleotida (parova baza) uključujući i prazna mjesta u sravnjenju. Vrijednost sačuvanih mjesta (C; eng. *conserved sites*) bila je 339, varijabilnih mjesta (V, eng. *variable sites*) 101, a parsimonijski informativnih mjesta (Pi, *parsimony informative sites*) 58.

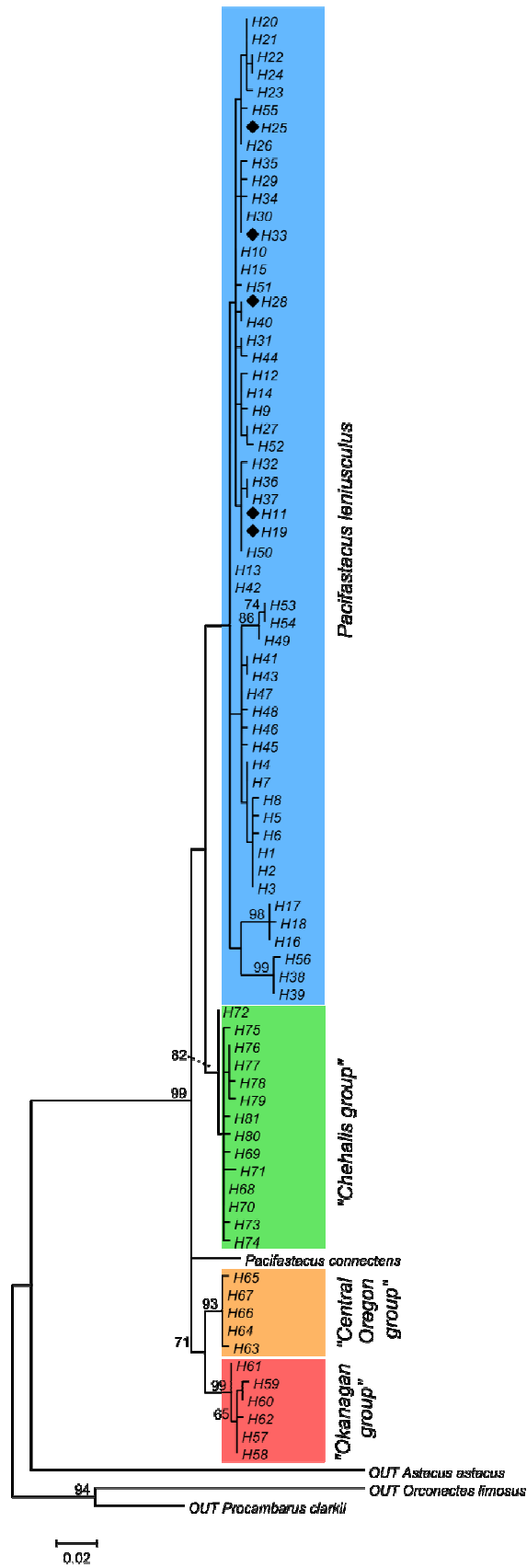
Provjeren je i nukleotidni sastav sekvenci u programu MEGA 6.06 (Tamura i sur., 2013) te je uočeno da pokazuje vrlo male varijacije. Srednja vrijednost timina je 35,7 %, citozina 10,5 %, adenina 36,7 % te guanina 17,1 %.

**Tablica 18.** Prikaz korištenih haplotipova s pripadajućim pristupnim brojevima i lokalitetom uzoraka.

Uzorak	Haplotipovi	GenBank pristupni brojevi	Vrsta	Lokalitet
kar1	H25	JX077802	<i>P. leniusculus</i>	Korana (Karlovac)
kar2	H25	JX077802	<i>P. leniusculus</i>	Korana (Karlovac)
kar3	H25	JX077802	<i>P. leniusculus</i>	Korana (Karlovac)
kar4	H25	JX077802	<i>P. leniusculus</i>	Korana (Karlovac)
kar5	H25	JX077802	<i>P. leniusculus</i>	Korana (Karlovac)
mar1	H11	JX077924	<i>P. leniusculus</i>	Mura (Sveti Martin na Muri)
mar2	H19	JX077901	<i>P. leniusculus</i>	Mura (Sveti Martin na Muri)
mar3	H28	JX077793	<i>P. leniusculus</i>	Mura (Sveti Martin na Muri)
mar5	H33	JX077745	<i>P. leniusculus</i>	Mura (Sveti Martin na Muri)
Larson i sur., 2012	H1-H56	JX077385-JX077955	<i>P. leniusculus</i>	n/a
Larson i sur., 2012	H57-H62	JX077304-JX077384	"Okanagan group"	n/a
Larson i sur., 2012	H63-H67	JX077265-JX077303	"Central Oregon group"	n/a
Larson i sur., 2012	H68-H81	JX077132-JX077264	"Chehalis group"	n/a
Larson i sur., 2012	OUT <i>Pacifastacus connectens</i>	JX077131	<i>Pacifastacus connectens</i>	n/a
n/a	OUT <i>Orconectes limosus</i>	KP205431	<i>Orconectes limosus</i>	n/a
n/a	OUT <i>Procambarus clarkii</i>	KJ645829	<i>Procambarus clarkii</i>	n/a
n/a	OUT <i>Astacus astacus</i>	GU727618	<i>Astacus astacus</i>	n/a

#### 4.3.3. Filogenetska rekonstrukcija

Odabrani optimalni evolucijski model bio je T92+G - Tamura-3 parametar (Tamura, 1992). Filogenetsko stablo je konstruirano primjenom statističke metode najveće vjerojatnosti (eng. *Maximum Likelihood*, ML) i ukorijenjeno vanjskim grupama. Ono je pokazalo da iako hrvatski uzorci predstavljaju različite haplotipove svi pripadaju u jedinstvenu grupu vrste *Pacifastacus leniusculus*. Na Slici 16 prikazano je dobiveno filogenetsko stablo. Stablo je kondenzirano na način da nisu prikazane vrijednosti samoučitanja („bootstrap“) manje od 50%, a haplotipovi koji pripadaju analiziranim populacijama iz Korane i Mure prikazani su znakom ♦.



**Slika 15.** Filogenetsko stablo dobiveno metodom najveće vjerojatnosti za 16S rRNA. Rombom su prikazani haplotipovi uzoraka iz Hrvatske, a brojevi iznad čvorova prikazuju podržanost grananja.

## 5. RASPRAVA

### 5.1. MORFOMETRIJA

Morfološke karakteristike su do nedavno uglavnom korištene samo za identifikaciju pojedinih vrsta slatkovodnih rakova, utvrđivanje spolnog dimorfizma i razlikovanje juvenilnih i odraslih jedinki. S ciljem identifikacije jedinki su napravljeni i determinacijski ključevi vođeni morfološkim osobinama. Međutim, razlike u morfologiji rakova se mogu pojaviti ne samo među različitim vrstama, nego i među odvojenim populacijama iste vrste kao posljedica adaptacija na lokalne uvjete staništa (Sint i sur., 2005). Stoga je uključivanjem velikog broja mjerenih morfometrijskih značajki na velikom uzorku morfometrijska analiza postala široko korišten i pouzdan alat u usporedbama populacija i utvrđivanju značajnih razlika između njih (Maguire i Dakić, 2011; Sint i sur., 2005).

Istraživanje je provedeno na 47 jedinki prikupljenih iz rijeka Mure i Korane. U obje populacije ulovljeno je značajno manje ženki, nego mužjaka. Razmjer broja ženki i mužjaka u uzorku je vjerojatno posljedica vremena uzorkovanja; rakovi su sakupljeni početkom i sredinom lipnja kad ženke često još nose jajašca prilijepljena ispod zatka (Holdich i sur., 2014) te su stoga i manje aktivne. Općenito slabiji ulovi jedinki tijekom zime i proljeća su često zabilježeni za slatkovodne rakove, a mogu se pripisati slabijoj aktivnosti uzrokovanoj hladnoćom jer je poznato da je aktivnost rakova pozitivno korelirana s temperaturom vode (Grandjean i sur., 2000; Bubb i sur., 2002; Capurro i sur., 2007). Time se može objasniti i relativno slab ukupan ulov tijekom ovog istraživanja jer je temperatura vode bila ispodprosječno niska za to doba godine. Najveća brojnost jedinki se očekuje od kasnog ljeta do jeseni što je vezano uz potragu za hranom i pojačanom aktivnošću vezanom za sezonu parenja (Mason, 1970).

Izmjerene su ukupno 22 morfometrijske značajke kao što je rađeno i u nekim ranijim istraživanjima rakova iz porodice Astacidae (Maguire i Dakić, 2011; Sint i sur., 2005). Najveća jedinka bila je ženka iz rijeke Korane s ukupnom dužinom od 131,67 mm što je nešto veće od uobičajene dužine do 12 cm za ženski spol. Najmanja jedinka je također ženka iz Korane s dužinom od 81,23 mm. Najveći mužjak je bio dužine 128,98 mm i ulovljen je u rijeci Muri. Nije utvrđena statistički značajna razlika u dužini tijela između mužjaka i ženki, a prosječna dužina za oba spola bila je ~ 10,5 cm.

Rezultati T-testa su pokazali da postoje značajne razlike između mužjaka i ženki u veličini i obliku klijesta te abdomena. Dobivene razlike su bile očekivane i mogu se pripisati spolnom dimorfizmu što je karakteristično za deseteronožne rakove (Grandjean i sur., 1997;

Grandjean i Souty-Grosset, 2000; Sterissl i Hodl, 2002). Naime, nakon postizanja spolne zrelosti mužjacima brže i jače rastu kliješta, dok je za ženke karakteristično da im brže raste zadak (kao adaptacija na nošenje jaja).

Normalizirani podaci su korišteni kako bi se analiziralo razlikuju li se mužjaci i ženke u mjerenim morfometrijskim značajkama između dviju populacija. Pokazano je da postoje puno veće razlike između mužjaka ispitivanih populacija, nego između ženki. Mužjaci iz Mure i Korane pokazuju statistički značajne razlike u čak 13 od 22 ispitivane karakteristike, dok se kod ženki samo razlika u širini kliješta (CLW) pokazala statistički značajnom. Najmanja p-vrijednost u analizi mužjaka dobivena je za širinu cefalotoraksa prije cervikalne brazde (CEW) što tu osobinu čini statistički najznačajnijom u razlikovanju mužjaka ovih populacija, a izuzetno nisku vrijednost pokazuje i širina glave ispred cervikalne brazde (CGW). Čak i da je p-vrijednost postavljena na 0,01, što se također uobičajeno koristi, opet bi postojala statistički značajna razlika u 7 karakteristika mužjaka, dok za ženke u tom slučaju nebi bilo statistički značajne razlike.

S obzirom da su u istraživanje uključene samo dvije populacije nije bilo moguće provesti diskriminantnu analizu (Sint i sur., 2005, Maguire i Dakić, 2011) i sa sigurnošću utvrditi da li su populacije Mure i Korane jasno odvojene na temelju mjerenih morfometrijskih značajki. Nadalje, broj ženki u uzorku je bio mali što također otežava analize i jedino što se može jasno utvrditi je da se mužjaci značajno razlikuju u mjerenim morfometrijskim značajkama, a te razlike mogu biti ili posljedica prilagodbe na različite uvjete staništa, ili posljedica genetske strukture jedinki (Maguire i Dakić, 2011).

## 5.2. MIKROSATELITI

S obzirom na lošu amplifikaciju lokusa LPL22 u konačnici su analizirana 3 lokusa. Taj se lokus nije mogao uspješno genotipizirati na više od polovice uzoraka te je stoga isključen iz analiza. U istraživanjima Froufe i sur. (2015) također je utvrđeno da ovaj lokus nije u potpunosti optimiziran budući da su frekvencije nul-alela tog lokusa iznosile i do 0,36 za pojedine istraživane populacije, a postojalo je i bitno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže s p vrijednosti 0.

Svi istraživani lokusi pokazali su se polimorfni, a najveći broj alela je utvrđen za lokus LPL6. Preostala dva lokusa imaju jednak broj zabilježenih alela (Tablica 11). Za jedinke iz murske populacije zabilježeno je ukupno 18 alela, a za populaciju iz rijeke Korane njih 13. Ukupan broj različitih alela bio je 21 tako da je kod signalnih rakova iz Mure prisutno gotovo 86 % nađenih alela, dok je postotak za rijeku Koranu dosta manji. Usporedbom s

rezultatima iz rada Froufe i sur. (2015) vidljivo je da je broj alela po lokusima sličan zabilježenima za populacije iz Velike Britanije, Portugala, Finske i Švedske. Lokus LPL40 pokazuje čak malo veću polimorfnost kod rakova iz hrvatskih rijeka jer je broj uočenih alela 5, a za navedene europske države je zabilježeno njih 4. Lokus LPL6 pak pokazuje nešto manji broj zabilježenih alela, njih 11, dok je u spomenutom radu zabilježeno 14 različitih alela. Ukupan broj alela koji su zabilježili Froufe i sur. (2015) za populacije signalnih rakova s područja Velike Britanije, Portugala, Finske i Švedske bio je 23.

Postojanje nul-alela dovodi do krive procjene udjela heterozigotnih jedinki u populaciji i time do prividnog povećanja broja homozigota. U ovom istraživanju nul-aleli su zabilježeni na 2 lokusa (Tablica 12). Frekvencija je najveća za lokus LPL6 za koji Froufe i sur. (2015) nisu zabilježili postojanje nul-alela, dok ovdje nisu zabilježeni za lokus LPL40 koji je imao najveću frekvenciju prisutnosti nul-alela u radu spomenutih autora (Tablica 12). Međutim, sve te vrijednosti nisu visoke i kreću se od 0,09 do 0,11.

Srednja vrijednost očekivane heterozigotnosti iznosi 0,526 za signalne rakove iz Korane, a 0,577 za one iz rijeke Mure. Srednja očekivana heterozigotnost rakova iz rijeke Mure najveća je do sad zabilježena u Europi. Naime, Froufe i sur. (2015) su prvi opisali genetičku raznolikost signalnih rakova sa područja nekoliko europskih država. Srednje vrijednosti dobivene u njihovom radu bile su 0,530 za Veliku Britaniju, 0,572 za Portugal, 0,529 za Finsku te 0,5 za Švedsku. Visoka očekivana vrijednost za signalne rakove iz Mure je logična jer su rakovi tamo već dugo prisutni te je do njihovog unosa došlo u nekoliko navrata. Uspjeh invazivnih vrsta ovisi o broju jedinki u svakom unosu vrste (eng. *propagule size*) i broju samih unosa (eng. *propagule number*) iz autohtonog areala. Kako se broj jedinki i unosa povećava veći je i introdukcijski pritisak vrste (eng. *propagule pressure/introduction effort*) (Lockwood i sur., 2005). Važna je veličina inicijalne ishodišne populacije jer male populacije imaju veću šansu izumiranja zbog utjecaja okolišne ili demografske stohastičnosti te Allee efekta (Korsu i Huusko, 2009). Iako alohtone populacije uobičajeno imaju nisku genetičku raznolikost u odnosu na autohtone, porast broja propagula podiže razinu varijabilnosti (Lockwood i sur., 2005). Dapače, Kolbe i sur. (2004) su pokazali da ukoliko propagule potječu iz različitih, genetički odvojenih područja i populacija, novonastale alohtone populacije mogu imati i veću genetičku raznolikost od autohtonih populacija.

Pojedinačno najniža vrijednost genetičke raznolikosti (očekivane heterozigotnosti) nađena je za populaciju rakova iz Korane za lokus LPL26 i iznosi 0,271, a najveća očekivana heterozigotnost je procijenjena za lokus LPL6 za obje populacije hrvatskih rijeka. Najviša vrijednost iznosi 0,764 za populaciju iz rijeke Mure. Ti rezultati slažu se s rezultatima Froufe i

sur. (2015) koji su pokazali slične vrijednosti (Tablica 13). Najveću očekivanu heterozigotnost za lokus LPL6 ima populacija rakova iz Velike Britanije i ona iznosi 0,853. Veću očekivanu heterozigotnost od hrvatskih populacija za taj lokus imaju i Portugal i Finska nakon kojih slijedi Mura, Švedska te na kraju Korana (Tablica 13). Nešto manja vrijednost hrvatskih populacija može se protumačiti i zabilježenim nul-alelima na tom lokusu, a koji nisu zabilježeni u prethodnom istraživanju. Također, unos ove invazivne vrste prvo je bio u skandinavskim i zapadnoeuropskim zemljama odakle je slijedilo daljnje širenje Europom te je stoga tamo očekivana veća vrijednost heterozigotnosti. Genetička raznolikost generalno je veća u izvorišnim populacijama, nego u onim novijima (Reiland i sur., 2002; Jamieson, 2010) osobito uz pretpostavku da je tijekom dužeg vremena moglo doći i do više unosa. U druge europske zemlje unesen je manji broj jedinki iz ishodišno unesenih populacija u Europu pa je stoga zaliha gena također manja. Takve populacije prolaze kroz efekt osnivača (eng. *founder effect*), jedinke nose samo dio genetičke raznolikosti matične populacije te i njihovi potomci imaju nižu razinu genetičke raznolikosti. Analiza rakova iz rijeke Mure pokazuje i najveće alelno bogatstvo u odnosu na sve istražene populacije (Tablica 13); vjerojatno također zbog ranog i opetovanog unosa u tu rijeku.

Srednje vrijednosti uočene heterozigotnosti manje su od očekivanih za populacije signalnih rakova iz Korane i Mure. Slično je i s populacijama iz Finske i Švedske, dok je veća uočena heterozigotnost zabilježena za populacije iz Velike Britanije i Portugala.

Pojedinačno je uočena heterozigotnost manja od očekivane na lokusu LPL6 za obje populacije, ali je veća od očekivane za lokus LPL40. Generalno manju uočenu heterozigotnost potencijalno možemo pripisati postojanju srođivanja (eng. *inbreeding*), odnosno parenju između bliskih srodnika koje dovodi do gubitka genetičke raznolikosti i povećavanja udjela homozigota. Postojanje srođivanja potvrđuju i neke pozitivne vrijednosti koeficijenta križanja u bliskom srodstvu ( $F_{IS}$ ). Srednje vrijednosti koeficijenta po svim lokusima također su pozitivne s tim da je vrijednost puno manja za rakove iz rijeke Korane (Tablica 14). Naime,  $F_{IS}$  je pozitivan ako u populaciji postoji manje heterozigota, a negativan ako se radi o velikom udjelu heterozigota (Allendorf i Luikart, 2007). Prema dostupnim podacima srođivanje je prisutno i kod finskih i švedskih populacija. Finska populacija pokazuje najveće vrijednosti koeficijenta križanja u bliskom srodstvu (Tablica 13 i 14). Ujedno se radi o najstarijim alohtonim populacijama signalnog raka te je stoga za očekivati da tijekom vremena raste stopa srođivanja.



Izračunate pojedinačne i srednje vrijednosti očekivane i uočene heterozigotnosti za hrvatske populacije uglavnom podupiru tvrdnju da je populacija signalnih rakova iz rijeke Mure nešto raznolikija od populacije iz rijeke Korane, no razlika u vrijednostima nije velika.

Fiksacijski indeks kao mjera genetske divergencije između subpopulacija ukazuje na genetsku strukturiranost vrste. Vrijednost može varirati od 0 do 1. Manje vrijednosti pokazuju da sve populacije imaju podjednake frekvencije alela, odnosno da vjerojatno postoji njihova povezanost kroz parenje, dok vrijednost 1 označava da se radi o različitim alelima i da populacije ne dijele istu zalihu gena. Vrijednosti fiksacijskih indeksa po lokusu za usporedbu populacija iz Mure i Korane su niske i pokazuju malen stupanj diferencijacije između ovih populacija. Srednja vrijednost po svim lokusima iznosi samo 0,026, dok srednja vrijednost fiksacijskog indeksa koja uspoređuje populacije Velike Britanije, Portugala, Finske i Švedske iznosi 0,127 što se prema Hartlu i Clarku, 1997 smatra srednjim do visokim stupnjem različitosti (Tablica 15). S obzirom na geografsku udaljenost ispitivanih država i očekivano je da je razlika među tim populacijama veća, a i ukazuje da su možda prvotno unesene jedinke pripadale odvojenim različitim populacijama iz Sjeverne Amerike, dok vrijednosti dobivene za hrvatske populacije ukazuju na možebitnu povezanost originalno unesenih jedinki.

U ovom je istraživanju značajno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže uočeno za lokus LPL6 što se uglavnom može pripisati postojanju nul-alela na istom lokusu. Općenito na odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže mogu utjecati selekcija, migracije, mutacije, genetski drift i parenje koje nije slučajno, odnosno nepostojanje panmiksije.

Niti faktorijalna analiza korespondencije niti STRUCTURE analiza ne odvajaju jasno populacije signalnih rakova iz Korane i Mure. Najvjerojatniji broj genetskih grupa prema STRUCTURE analizi je 1. Naime, prema rezultatima i vizualizaciji sve jedinke pripadaju istoj grupi. To govori da bi ishodište hrvatskih populacija moglo biti isto. U rijeku Muru signalni rak je stigao preko Slovenije iz Austrije, a s obzirom da se za Koranu zna da je ilegalno unesen moglo se raditi o unosu iz rijeke Mure. Froufe i sur. (2015) su STRUCTURE analizom pod istim uvjetima pokazali da se radi o 3 različita genetička klastera pri čemu jedan zajedno čine Velika Britanija i Finska, drugi Portugal i treći Švedska. Populacije signalnih rakova Velike Britanije i Finske vjerojatno imaju isto ishodište iz švedskog mrijestilišta Simontorp (Henttonen i Huner, 1999). Velik dio švedskih i finskih populacija potječe iz jezera Tahoe (SAD), no Froufe i sur. (2015) navode kako se u njihovom radu u slučaju Švedske radi o prvim introdukcijama iz jezera Natoma (SAD) što bi moglo objasniti postojanje razlike između švedske i finske populacije (Froufe i sur., 2015).

### 5.3. MITOHONDRIJSKA DNA- 16S rRNA

Analiza mitohondrijske DNA, odnosno gena za 16S rRNA provedeno je na malom broju jedinki kao dodatna provjera i potvrda rezultata. Kao što je već navedeno signalni rakovi iz Korane i Mure iako pripadaju različitim, već poznatim haplotipovima, svi su grupirani u jedinstvenu grupu vrste *Pacifastacus leniusculus* (Slika 15). Larson i sur. (2012) napravili su veliko istraživanje signalnih rakova s područja Britanske Kolumbije u Kanadi i saveznih država SAD-a Idaho, Nevada, Oregon i Washington. Time su ustanovili da signalni rak nije jedinstvena vrsta, nego da se radi o kompleksu vrsta. Ukupno postoje 4 različite grupe; uz spomenutu grupu *P. leniusculus* postoje i kriptične grupe Chehalis, Central Oregon i Okanagan (Larson i sur., 2012).

Najmanje grupe bile su Central Oregon i Okanagan koje su obuhvaćale 5, odnosno 6 haplotipova, ali je grupa Central Oregon ujedno bila genetski raznolikija. Najraznolikijom se pokazala najveća grupa *P. leniusculus* koja je obuhvaćala čak 56 haplotipova.

U ovom istraživanju rakovi iz rijeke Korane pripadaju samo jednom jedinstvenom haplotipu, dok je kod uzoraka iz rijeke Mure svaki analizirani rak imao svoj haplotip čime se može zaključiti da su raznolikiji.

Odvajanje u ove grupe dobro je podržano i s obzirom na visoke „bootstrap“ vrijednosti može se zaključiti da se u slučaju grupa Chehalis, Central Oregon i Okanagan radi o monofiletskim grupama, dakle grupama čiji članovi potječu od istog pretka karakterističnog samo za tu grupu. S obzirom na nisku podržanost grupe *P. leniusculus* na filogenetskom stablu ne može se ustanoviti radi li se o monofiletskoj ili parafiletskoj grupi.

S obzirom da topologija stabla pokazuje da svi uzorci ispitani u ovom istraživanju pripadaju istoj grupi može se zaključiti da analiza mitohondrijske DNA također ne odvajava ove dvije populacije signalnih rakova. Međutim, analiza je rađena na jako malom broju jedinki i napravljena samo jednom metodom; metodom najveće vjerojatnosti. Za bolju vjerodostojnost dobivenih rezultata uz ovu koriste se i druge metode: metoda susjednog sparivanja (eng. *Neighbor Joining*, NJ), metoda najveće štedljivosti (eng. *Maximum Parsimony*, MP) i Bayesian analiza (eng. *Bayesian analysis*, BA). Ukoliko bi sve te metode konstruirale filogenetska stabla s gotovo istom topologijom, podržanošću i duljinom grana moglo bi se sa većom sigurnošću potvrditi ove rezultate.

Iako je analiza gena za 16S rRNA ovdje korištena kao dodatna metoda usporedbe s mikrosatelitima i morfometrijskom analizom rezultati se poklapaju jer niti jedna korištena metoda nije jasno odvojila dvije ispitivane populacije signalnih rakova.

#### 5.4. UKUPNA RAZNOLIKOST SIGNALNOG RAKA U HRVATSKOJ

Niti jedna od korištenih metoda jasno ne odvajaju populacije signalnih rakova u dvije različite grupe. Međutim, i analiza mikrosatelita kao i analiza gena za 16S rRNA ukazuju na nešto veću genetičku raznolikost populacije rakova iz rijeke Mure. Tome u prilog idu veće zabilježene ukupne vrijednosti očekivane i uočene heterozigotnosti kao i prisutnost većeg broja haplotipova u toj populaciji.

U odnosu na Europu, genetička raznolikost hrvatskih populacija je uglavnom nešto manja. Ukupna (srednja) uočena heterozigotnost veća je u svim zemljama osim Finske gdje je zabilježen i značajan stupanj križanja u bliskom srodstvu (Tablica 14; Froufe i sur., 2015). Švedska populacija također pokazuje nešto manju raznolikost od populacije iz rijeke Mure, ali kao što je prije pretpostavljeno razlog se može naći u činjenici da se u istraživanju radilo s prvom, inicijalno unesenom populacijom na područje te države. Otada je vrsta proširena i unesena na mnogobrojna područja Švedske i za očekivati je da je raznolikost veća.

#### 5.5. UTJECAJ I INVAZIVNI USPJEH

Najveća raznolikost signalnih rakova zabilježena je za Veliku Britaniju u koju je signalni rak introduciran 1970-ih godina. Pogodni klimatski uvjeti, izostanak predatora i slaba kompeticija s drugim vrstama omogućili su uspostavljenje brojnih populacija signalnih rakova u Velikoj Britaniji (Johnson i sur., 2011). Tamo ima najveći utjecaj na autohtone populacije bjelonogog raka – *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858) te je prisutnost i širenje signalnih rakova dovelo do drastičnog smanjenja populacija bjelonogog raka za čak 70% (Sibley i sur., 2011).

Sličan primjer je prisutan i na području austrijske pokrajine Koruške gdje je signalni rak u kompeticiji sa riječnim i potočnim rakom. Analizirane su populacije rakova na nekoliko lokaliteta i uočeno je da se tijekom 9 godina (2000.-2009.) broj populacija signalnih rakova povećao za 48, dok je broj populacija autohtonih rakova smanjen za više od 20 (Weinländer i Füreder, 2009).

Smanjenje broja populacija autohtonih vrsta rakova zbog utjecaja invazivnih vrsta rakova zabilježeno je i na području Hrvatske, osobito za populacije riječnog i uskoškarog raka (Maguire i sur., 2011).

Uspjeh signalnog raka leži i u tome što se smatra vrstom koja ima karakteristike i K i r-vrsta. Karakteristike koje ga povezuju sa r-vrstama su visok fekunditet, sposobnost prilagodbe na različita staništa i okolišne uvjete te relativno brz rast. S druge strane dug životni vijek i ne

tako rano spolno sazrijevanje ga čine i vrstom s K strategijom (Lindqvist i Huner, 1999). Sve europske autohtone vrste rakova se smatraju isključivo K-vrstama („spore vrste“). Uz to se ističu i različiti biološki i ekološki faktori signalnog raka već spomenuti u uvodu, nedovoljno snažna zakonska legislativa te ilegalni unosi kojima čovjek pomaže širenju ove invazivne vrste.

Jednom kad se populacija signalnog raka uspostavi njezino iskorjenjivanje je gotovo nemoguće provesti. Neki postojeći biocidi su ujedno i jako skupi i djeluju i na druge vodene organizme pa se rijetko mogu primijenjivati. Postavljanje vrša i zamki eventualno može imati pozitivan učinak na nekoj manjoj, lokalnoj razini, ali uglavnom se time može smanjiti brojnost, ali nikako i ukloniti populacije. Jedna od metoda je i upotreba zamki s različitim feromonima kao mamcima što se pokazalo relativno korisnim jer su feromoni vrsno specifični pa dolazi do hvatanja isključivo selektirane vrste (Stebbing i sur., 2003).

## 6. ZAKLJUČAK

- Morfometrijska analiza ne daje u potpunosti jasne rezultate odvajanja populacija signalnih rakova iz Korane i Mure.
- Lokus LPL22 nema visok stupanj amplifikacije, pokazuje visoku frekvenciju nul-alela te ga stoga nije preporučljivo koristiti.
- Rezultati analize mikrosatelita i mitohondrijske DNA ukazuju na veću genetičku raznolikost signalnih rakova iz rijeke Mure u odnosu na rakove iz rijeke Korane, ali zapravo ne odvajaju te dvije populacije.
- Rezultati morfometrijske analize djelomično se poklapaju s analizom mikrosatelita i gena za 16S rRNA.
- Genetička raznolikost signalnog raka u hrvatskim rijekama manja je od zabilježene genetičke raznolikosti vrste u Velikoj Britaniji, Portugalu i Švedskoj.
- Ovo istraživanje omogućuje praćenje raznolikosti signalnog raka u Hrvatskoj tijekom vremena, daje doprinos saznanjima o genetskoj raznolikosti vrste na razini Europe i pruža temelj za buduća slična istraživanja.
- U budućim istraživanjima trebalo bi analizirati veći broj jedinki po populaciji uz korištenje većeg broja mikrosatelitnih biljega te dodatnih mitohondrijskih biljega (npr. COI) uz gen za 16S rRNA i te rezultate povezati s morfometrijskom analizom čime bi se dobila cjelovita slika o raznolikosti populacija signalnih rakova u Hrvatskoj.

## 7. LITERATURA

- Allendorf F. W., Luikart G. (2007) Population Subdivision. Conservation and the Genetics of Populations. Blackwell Publishing, 197-227.
- Allendorf F. W. (2002) Genetics and the Persistence of Small Populations. U: Liberg O. (ur.) Genetics aspects of viability in small wolf populations with special emphasis on the Scandinavian wolf population. Report from an International Expert Workshop (Liberg, O.). Färna Herrgård, 44.
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N., Bonhomme F. (1996-2004) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Bubb D. H., Lucas M. C., Thom T. J. (2002) Winter movements and activity of signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* in an upland river, determined by radio telemetry. *Hydrobiology* **483**, 111-119.
- Capurro M., Galli L., Mori M., Salvidio S., Arillo A. (2007) The signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) (Crustacea: Decapoda: Astacidae), in the Brugneto Lake (Liguria, NW Italy). The beginning of the invasion of the River Po watershed? *Aquatic Invasions* **2**, 17-24.
- Chapuis M. P., Estoup A. (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 621–631.
- Crandall K. A., Buhay J. E. (2008) Global diversity of crayfish (Astacidae, Cambaridae, and Parastacidae-Decapoda) in freshwater. *Hydrobiologia* **595**, 295–301.
- Diéguez-Uribeondo J., Cerenius L., Dyková I., Gelder S., Henntonen P., Jiravanichpaisal P., et al. (2006) Pathogens, parasites and ectocommensals. U: Souty-Grosset C. & Holdich D. M. & Noël P. Y. & Reynolds J. D. & Haffner P. (ur.) Atlas of crayfish in Europe. Patrimoines naturels **64**. Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, 131-149.
- Edgar R. C. (2004) Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* **32**, 1792-1797.

- Edsman L., Schröder S. (2009) Åtgärdsprogram för Flodkräfta 2008–2013 (*Astacus astacus*). *Fiskeriverket och Naturvårdsverket* **5955**, 67.
- Ellergren H. (2004) Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature reviews Genetics* **5**, 435-445.
- Emerson B. C., Hewitt G. M. (2005) Phylogeography. *Current Biology* **15**, 367-371.
- Fetzner J. W., Jr. (2005) The crayfish and lobster taxonomy browser: A global taxonomic resource for freshwater crayfish and their closest relatives. Accessed: 15 October 2015.
- Frankham R., Ballou J. D., Briscoe D. A. (2002) Introduction to Conservation Genetics, Cambridge University Press. Cambridge.
- Frankham R. (1996) Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conservation Biology* **10**, 1500–1508.
- Froufe E., Varandas S., Teixeira A., Sousa R., Filipova L., Petrussek A., Edsman L., Lopes-Lima M. (2015) First results on the genetic diversity of the invasive signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) in Europe using novel microsatellite loci. *Journal of Applied Genetics* **56**, 375-380.
- Gan H. M., Lee Y. P., Grandjean F., Austin C. M. (2014) The complete mitogenome of the Delcore Crayfish, *Orconectes limosus* (Rafinesque, 1817). Neobjavljena studija (preuzeto 25.10.2015. iz NCBI GenBank baze).
- Gherardi F. (2007) Understanding the impact of invasive crayfish. U: Biological invaders in inland waters: Profiles, distribution, and threats. Springer, Netherlands, 507-542.
- Goudet, J. (2001) FSTAT, A Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices (Version 2.9.3.2). <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
- Grandjean F., Cornuault B., Archambault S., Brandmard M., Otrebsky G. (2000) Life history and population biology of the white-clawed crayfish, *Austropotamobius pallipes*, in a brook from the Poitou-Charentes Region (France). *Bulletin Française de la Pêche et de la Pisciculture* **356**, 55-70.

- Grandjean F., Souty-Grosset C. (2000) Genetic and morphological variation in the endangered crayfish species, *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet) (Crustacea, Astacidae) from the Poitou-Charentes region (France). *Aquatic Sciences*, **62**, 1-19.
- Grandjean F., Souty-Grosset C., Raimond R., Holdich D. (1997) Geographical variation of mitochondrial DNA between populations of the white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes*. *Freshwater Biology* **37**, 493-501.
- Hagelberg E., Gray I. C., Jeffreys A. J. (1991) Identification of skeletal remains of a murder victim by DNA analysis. *Nature* **352**, 427-429.
- Hall B. G. (2007) *Phylogenetic Trees Made Easy: A How-To Manual*, Third Edition. Sinauer Associates Inc, Sunderland.
- Hartl D. L., Clark A. G. (1997) *Principles of population genetics*, Third edition. Sinauer Associates Inc, Sunderland.
- Henttonen P., Huner J. V. (1999) The introduction of alien species of crayfish in Europe: a historical introduction. U: Gherardi F., Holdich D. M. (ur.) *Crayfish in Europe as alien species. How to make the best of a bad situation?* AA Balkema, Rotterdam, Brookfield, 13–22.
- Holdich D. M., James J., Jackson C., Peay S. (2014) The North American signal crayfish, with particular reference to its success as an invasive species in Great Britain. *Ethology Ecology & Evolution* **26:2-3**, 232-262.
- Holdich D. M., Reynolds J. D., Souty-Grosset C., Sibley P. J. (2009) A review of the ever increasing threat to European crayfish from non-indigenous crayfish species. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, **394-395**, art. no. 11.
- Holdich D. M., Haffner P., Noël P. Y., Carral J., Füreder L., Gherardi F., et al. (2006) Species files. U: Souty-Grosset C. & Holdich D. M. & Noël P.Y. & Reynolds J.D. & Haffner P. (ur.) *Atlas of crayfish in Europe*. Patrimoines naturels **64**. Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, 49-129.
- Holdich D. M. (2002) *Biology of freshwater crayfish*, Blackwell Science, Oxford.



- Holdich D. M., Harlioglu, M. M., Firkins, I. (1997) Salinity adaptations of crayfish in British Waters with particular reference to *Austropotamobius pallipes*, *Astacus leptodactylus* and *Pasifastacus leniusculus*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **44**, 147-154.
- Holdich D. M., Rogers W. D., Reader J. P. (1995) Crayfish Conservation, 250 pp. Final Project Record for National Rivers Authority R&D contract 378/N&Y. Bristol: NRA.
- Hudina S., Žganec K., Lucić A., Trgovčić K., Maguire I. (2013) Recent invasion of the karstic river systems in Croatia through illegal introductions of the signal crayfish. *Freshwater Crayfish* **19** (1), 21–27.
- Hudina S., Faller M., Lucić A., Klobučar G., Maguire I. (2009) Distribution and dispersal of two invasive crayfish species in the Drava River basin, Croatia. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* **394-395** (09), 1-11.
- Hwang U. W., Kim W. (1999) General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *The Korean journal of parasitology* **37**, 215-228.
- Jadan M., Coz-Rakovac R., Topić-Popović N., Strunjak-Perović I. (2010) Molecular characterization of the Croatian noble crayfish (*Astacus astacus* L.) population based on sequences from mitochondrial 16S rRNA and COI genes. Neobjavljena studija (preuzeto 25.10.2015. iz NCBI GenBank baze).
- Jamieson I. G. (2010) Founder effects, inbreeding, and loss of genetic diversity in four avian reintroduction programs. *Conservation Biology* **25**, 115–123.
- Jarne P., Lagoda P. J. L. (1996): Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution* **11**, 424–429.
- Johnsen S. I., Taugbøl T. (2010) NOBANIS – Invasive Alien Species Fact Sheet – *Pasifastacus leniusculus*. – From: Online Database of the European Network on Invasive Alien Species – NOBANIS [www.nobanis.org](http://www.nobanis.org).

- Johnson M. F., Rice S. P., Reid I. (2011) Increase in coarse sediment transport associated with disturbance of gravel river beds by signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*). *Earth Surface Processes and Landforms* **36** (12), 1680–1692.
- Kashi Y., Soller M. (1999) Functional roles of microsattellites and minisattellites. U: Goldstein D. B., Schlötterer C. (ur.) *Microsattellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, Oxford, 10-23.
- Kopelman N. M., Mayzel J., Jakobsson M., Rosenberg N. A., Mayrose I. (2015) Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular Ecology Resources* **15** (5), 1179-1191.
- Korsu K., Huusko A. (2009) Propagule pressure and initial dispersal as determinants of establishment success of brook trout (*Salvelinus fontinalis* Mitchell 1814) *Aquatic Invasions* **4** (4), 619-626.
- Kouba A., Petrusek A., Kozák P. (2014) Continental-wide distribution of crayfish species in Europe: update and maps. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* **413** (05).
- Larson E. R., Abbott C. L., Usio N., Azuma N., Wood K. A., Herborg L-M., Olden J. D. (2012) The signal crayfish is not a single species: cryptic diversity and invasions in the Pacific Northwest range of *Pacifastacus*. *Freshwater Biology* **57**, 1823-1838.
- Lewis S. (2002) *Pacifastacus*. U: Holdich, D. M. (ur.) *Biology of Freshwater Crayfish*, 1<sup>st</sup> edn. Blackwell Science, London, 511-534.
- Li Y., Korol A. B., Fahima T., Beiles A., Nevo E. (2002) Microsattellites: Genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology* **11**, 2453-2465.
- Lindqvist O. V., Huner J. V. (1999) Life history characteristics of crayfish: What makes some of them good colonizers? U: Gherardi F., Holdich D. M. (ur.) *Crayfish in Europe as alien species. How to make the best of a bad situation?* AA Balkema, Rotterdam, Brookfield, 23-30.
- Lockwood J. L., Hoopes M. F., Marchetti M. P. (2007) *Invasion ecology*. Blackwell Publishing.

- Lockwood J. L., Cassey P., Blackburn T. (2005) The propagule pressure in explaining species invasions. *Trends in Ecology and Evolution* **20**, 223-228.
- Maguire I., Dakić L. (2011) Comparative analyses of *Astacus leptodactylus* morphological characteristics from Croatia and Armenia. *Biologia* **66** (3), 491-498.
- Maguire I., Jelić M., Klobučar G. (2011) Update on the distribution of freshwater crayfish in Croatia. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* **401**, 31.
- Maguire I., Klobučar G. I. V., Marčić Z., Zanella D. (2008) The first record of *Pacifastacus leniusculus* in Croatia. *Crustaceana* **77**, 25-49.
- Martin J. W., Davis G. E. (2001) An updated classification of the recent Crustacea. *Natural History Museum of Los Angeles County Contributions in Science* **39**, 1–124.
- Mason J. C. (1970) Copulatory behaviour of the crayfish, *Pacifastacus trowbridgii* (Stimpson). *Canadian Journal of Zoology* **48**, 969-976.
- Moxon E. R., Wills C. (1999) DNA microsatellites: agents of evolution? *Scientific American* January, 72-77.
- Narodne novine 144/13 (22.11.2013.) Pravilnik o proglašavanju divljih svojti zaštićenim i strogo zaštićenim
- Narodne novine 80/13 (28.6.2013.) Zakon o zaštiti prirode
- Oidtmann B., Heitz E., Rogers D., Hoffmann R. W. (2002) Transmission of crayfish plague. *Diseases of Aquatic Organisms* **52**, 159–16735.
- Olsson K., Stenroth P., Nyström P., Granéli W. (2009) Invasions and niche width: does niche width of an introduced crayfish differ from a native crayfish? *Freshwater Biology* **54**, 1731– 1740.
- Oxnard C. E. (1978) One biologist's view of morphometrics. *Annual Review of Ecology and Systematics* **9**, 219-241.
- Patwardhan A., Ray S., Roy A. (2014) Molecular Markers in Phylogenetic Studies – A Review. *Phylogenetic & Evolution Biology* **2** (2).

- Peakall R., Smouse P. E. (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* **28**, 2537–2539.
- Peay S., Holdich D. M., Brickland J. (2010) Risk assessments of non-indigenous crayfish in Great Britain. *Freshwater Crayfish* **17**, 109–122.
- Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945–959.
- Quan A. S., Pease K. M., Breinholt J. W., Wayne R. K. (2014) Origins of the invasive red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) in the Santa Monica Mountains. *Aquatic Invasions* **9**, 211–219.
- Raymond M., Rousset F. (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**, 248–249.
- Reiland J., Hodge S., Noor M. A. F. (2002) Strong founder effect in *Drosophila pseudoobscura* colonizing New Zealand from North America. *Journal of Heredity* **93**, 415–420.
- Schlötterer C. (1998) Microsatellites. U: Hoelzel A. R. (ur.) Molecular Genetic Analysis of Populations, A Practical Approach. 2nd edn. Oxford University Press, Oxford, 237–261.
- Shibata D. (1999) Microsatellite analysis of human tumours. U: Goldstein D. B., Schlötterer C. (ur.) Microsatellites: Evolution and Applications. Oxford University Press, Oxford, 266–274.
- Sibley P. J., Holdich D. M., Richman N. (2011) Monitoring the global status of crayfish, with particular reference to the white-clawed crayfish, 42–52. U: Rees M. et al., (ur.) Species survival: securing white-clawed crayfish in a changing environment. Proceedings of a conference held on 16th and 17th November 2010 in Bristol, UK. Bristol: Bristol Conservation & Science Foundation.

- Simon C., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H., Flook, P. (1994) Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America* **87**, 651-701.
- Sint D., Dalla Via J., Füreder L. (2005) Morphological variations in *Astacus astacus* L. and *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet) populations. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* **376-377**, 637–652.
- Souty-Grosset C., Holdich D. M., Noel P. Y., Reynolds J. D., Haffner P. (2006) Atlas of crayfish in Europe. Museum National d’Histoire Naturelle, Paris.
- Stebbing P. D., Watson G. J., Bentley M. G., Fraser D., Jennings R., Rushton S. P., Sibley P. J. (2003) Reducing the threat: the potential use of pheromones to control invasive signal Crayfish. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* **370-371**, 219-224.
- Streissl F., Hodl W. (2002) Growth, morphometrics, size at maturity, sexual dimorphism and condition index of *Austropotamobius torrentium* Shcrank. *Hydrobiologia* **477**, 201-208.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**, 2725-2729.
- Tamura K. (1992) Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C - content biases. *Molecular Biology and Evolution* **9**, 678-687.
- Taylor C. A. (2002) Taxonomy and conservation of native crayfish stocks. U: Holdich D. M. (ur.) Biology of freshwater crayfish. Blackwell science, Oxford, 236-257.
- Vrezec A., Jaklič M., Govedič M. (2013) Distribution patterns of indigenous and non-indigenous crayfish in Slovenia. Book of abstracts, Regional crayfish meeting CrayCro: 26th–28th September, 2013, Rovinj, Croatia, 31.
- Wan Q. H., Wu H., Fujihara T., Fang, S. G. (2004) Which genetic marker for which conservation genetics issue? *Electrophoresis* **25**, 2165–2176.

Weinländer M., Füreder L. (2009) The continuing spread of *Pacifastacus leniusculus* in Carinthia (Austria). *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* **394-395**, 17.

Williamson M. (1996) Biological invasions. Chapman & Hall, London.

Wright D. (2007) Logistics of shipboard and dockside testing of ballast water treatment systems in the United States. U: Gerhardi F. (ur.) Biological invaders in inland waters: Profiles, distribution, and threats. Springer, Netherlands, 657-668.

[www.faunaeur.org](http://www.faunaeur.org), pristupljeno 05.10.2015.

## 8. ŽIVOTOPIS

### OSOBNI PODACI

Ime i prezime        Tatjana Mijošek  
Datum rođenja        22.01.1992.  
Adresa                I. Kukuljevića 7, 10340 Vrbovec  
Mobilni telefon        0995496228  
E – mail                t.mijosek@gmail.com

### OBRAZOVANJE

2013. - danas Prirodoslovno-matematički fakultet - diplomski studij eksperimentalne biologije; modul zoologija, Zagreb  
2010. - 2013. Prirodoslovno-matematički fakultet - preddiplomski studij biologije, Zagreb  
2006. - 2010. Srednja škola Vrbovec - opća gimnazija

### OSOBNJE VJEŠTINE

- Strani jezici: engleski - iskusni korisnik  
   njemački - početnik
- Računalne vještine: dobro vladanje alatima Microsoft Office™ (Word™, Excel™ i PowerPoint™)

### DODATNE INFORMACIJE

#### **Stipendije**

2013./2014 i 2014./2015. - dobitnica stipendije za izvrsnost Sveučilišta u Zagrebu

#### **Priznanja i nagrade**

21. travnja 2015. - pohvalnica Fakultetskog vijeća za izuzetan uspjeh u studiju  
21. travnja 2013. - pohvalnica Fakultetskog vijeća za izuzetan uspjeh u studiju  
9. ožujka 2010. - priznanje za osvojeno 2. mjesto na županijskom natjecanju iz biologije  
14. ožujka 2008. - priznanje za osvojeno 2. mjesto na županijskom natjecanju iz biologije  
7. ožujka 2008. - priznanje za osvojeno 2. mjesto na županijskom natjecanju iz matematike

#### **Projekti**

Noć biologije - znanstveno-popularni projekt studenata biologije PMF-a u svrhu popularizacije znanosti (održavanje različitih igara, radionica, predavanja, seminara i zanimljivih aktivnosti jednom godišnje)

#### **Demonstrature**

Ljetni semestar 2015. - demonstratura iz kolegija Ponašanje životinja na diplomskom studiju zoologije  
Ljetni semestar 2013. - demonstratura iz kolegija Histologija i histokemija na preddiplomskom studiju biologije

### **Laboratorijska stručna praksa**

Ljetni semestar 2013. - laboratorijska stručna praksa u laboratoriju za kralježnjake PMF-a

### **Volontiranje**

Ožujak 2015. – kolovoz 2015. - volontiranje u Botaničkom vrtu (pripomoć u brizi o nasadima, popisivanju kamenjara, brizi o posjetiteljima, inventuri zbirki i biblioteke..)

Kolovoz 2013. - volontiranje u udruzi «Blue World» s ciljem zaštite dobrih dupina Jadrana



## **9. PRILOZI**

Prilog 1. Rezultati Pearsonovog korelacijskog testa za usporednu analizu morfometrijskih značajki s lijeve i desne strane tijela rakova.

Prilog 2. Rezultati T-testa za usporednu analizu morfometrijskih značajki za mušjake i ženke rakova.

**Prilog 1.** Rezultati Pearsonovog korelacijskog testa za usporednu analizu morfometrijskih značajki s lijeve i desne strane tijela rakova. Crvenom bojom su označene statistički značajne korelacije između lijeve i desne strane.

Varijabla	Korelacija, crvenom bojom su označene statistički značajne korelacije, $p < 0,05$					
	CLL	CFL	CPL	CLW	CLH	CEF
CLLR	0,952172	0,961030	0,897159	0,850086	0,821624	0,925672
CFLR	0,933147	0,962967	0,875272	0,834588	0,805690	0,926529
CPLR	0,892032	0,878218	0,866880	0,761677	0,721596	0,788440
CLWR	0,905439	0,905698	0,848866	0,851546	0,811627	0,898414
CLHR	0,892229	0,890111	0,860781	0,828100	0,808519	0,876290
CEFR	0,898964	0,921796	0,850819	0,844964	0,798546	0,991936

**Prilog 2.** Rezultati T-testa za usporednu analizu morfometrijskih značajki za mužjake i ženke rakova. Crvenom bojom su označene statistički značajne razlike koje odvajaju mužjake i ženke.

Variable	T-tests; Grouping: spol. Grupa 1: ž, Grupa 2: m										
	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
CLLR	38,9829	47,7423	-2,90233	45	0,005717	17	30	6,29163	11,46869	3,322776	0,014263
CFLR	23,2294	27,7650	-2,44520	45	0,018455	17	30	4,30604	6,90672	2,572688	0,050282
CPLR	11,6276	15,7957	-3,69027	45	0,000602	17	30	2,04536	4,37855	4,582702	0,002376
CLWR	15,9141	19,6650	-3,02546	45	0,004094	17	30	2,84168	4,62874	2,653228	0,043578
CLHR	8,0347	10,2333	-3,49076	45	0,001091	17	30	1,31853	2,39174	3,290414	0,015011
CEFR	42,7518	44,7117	-1,13378	45	0,262889	17	30	5,01058	6,03847	1,452373	0,436445
ROL	14,5006	14,6580	-0,24667	45	0,806284	17	30	2,29284	1,98905	1,328785	0,491124
ROW	7,8041	8,1900	-1,13648	45	0,261770	17	30	1,11540	1,12017	1,008569	1,000000
HEW	15,9071	15,8297	0,11957	45	0,905354	17	30	1,88312	2,25771	1,437402	0,449700
HEL	19,7424	20,4533	-0,78774	45	0,434978	17	30	2,28294	3,29253	2,080038	0,125703
CGW	21,5288	22,2167	-0,68775	45	0,495143	17	30	2,97471	3,45839	1,351640	0,533342
CPW	24,9841	26,1150	-0,93133	45	0,356651	17	30	3,57529	4,21590	1,390457	0,493813
ARL	14,8135	15,5377	-1,05612	45	0,296549	17	30	2,12331	2,32991	1,204070	0,711235
ARW	7,1112	7,1943	-0,23953	45	0,811779	17	30	1,06882	1,18281	1,224658	0,683658
CPH	23,0912	23,6150	-0,47979	45	0,633698	17	30	3,31729	3,74148	1,272093	0,623593
ABL	39,0376	38,0533	0,80850	45	0,423056	17	30	4,28701	3,84930	1,240355	0,595586
CEW	18,0835	18,3370	-0,32484	45	0,746806	17	30	2,50364	2,60642	1,083784	0,890884
ABW	28,5371	24,7653	2,91232	45	0,005566	17	30	5,53443	3,36785	2,700476	0,019460
ABH	16,3435	16,4853	-0,16823	45	0,867154	17	30	3,45602	2,31802	2,222880	0,059727
TEL	14,2806	13,8767	0,69319	45	0,491754	17	30	2,02594	1,85813	1,188776	0,664405
TEW	12,9341	12,8270	0,21248	45	0,832690	17	30	1,70664	1,63469	1,089959	0,812805
TL	105,0729	104,6310	0,12061	45	0,904537	17	30	11,77041	12,23252	1,080062	0,896943