

# Mogućnost infekcije invazivne strane vrste mramornog raka, *Procambarus virginalis* Lyko, 2017 uzročnikom račje kuge, *Aphanomyces astaci* Schikora, 1906

---

Zekirovski, Jana

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:792001>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-26**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Jana Zekirovski

**Mogućnost infekcije invazivne strane vrste mramornog raka,  
*Procambarus virginalis* Lyko, 2017 uzročnikom račje kuge,  
*Aphanomyces astaci* Schikora, 1906**

**The possibility of infection of the invasive marbled crayfish,  
*Procambarus virginalis* Lyko, 2017 with crayfish plague  
pathogen, *Aphanomyces astaci* Schikora, 1906**

Završni rad

Preddiplomski studij Znanosti o okolišu  
(Undergraduate Study of Environmental Sciences)

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen na zoologijskom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod voditeljstvom doc.dr.sc. Sandre Hudina.

# Sadržaj

1.UVOD .....	1
2.MATERIJALI I METODE .....	5
2.1. Opis životinja korištenih u eksperimentu .....	5
2.2. Izolacija DNA .....	5
2.3. PCR-test za otkrivanje patogena <i>A. astaci</i> .....	6
2.4. Elektorforeza u agaroznom gelu .....	7
3. REZULTATI .....	9
4. RASPRAVA .....	11
5.ZAKLJUČAK .....	15
6. LITERATURA .....	16
7.SAŽETAK .....	20
8.SUMMARY .....	21
9.ŽIVOTOPIS .....	22
10.PRILOZI .....	23

## 1.UVOD

Mramorni rak (*Procambarus virginalis* Lyko, 2017) je vrsta otkrivena 1990-tih godina u Njemačkoj u akvarističkoj razmjeni (Vogt, 2020). Pripada u podkoljeno rakova (Crustacea) u red deseteronožnih rakova (Decapoda). Bliski mu je srodnik vrsta autohtona za Floridu *Procambarus fallax* (Hagen, 1870) u čiju je podvrstu donedavno svrstavan (*Procambarus fallax* forma *virginalis*). Zbog svojeg specifičnog izgleda (prošarani egzoskelet koji podsjeća na uzorak mramora) ubrzo je prozvan *Mramorkrebs*, odnosno mramorni rak (Vogt, 2020).



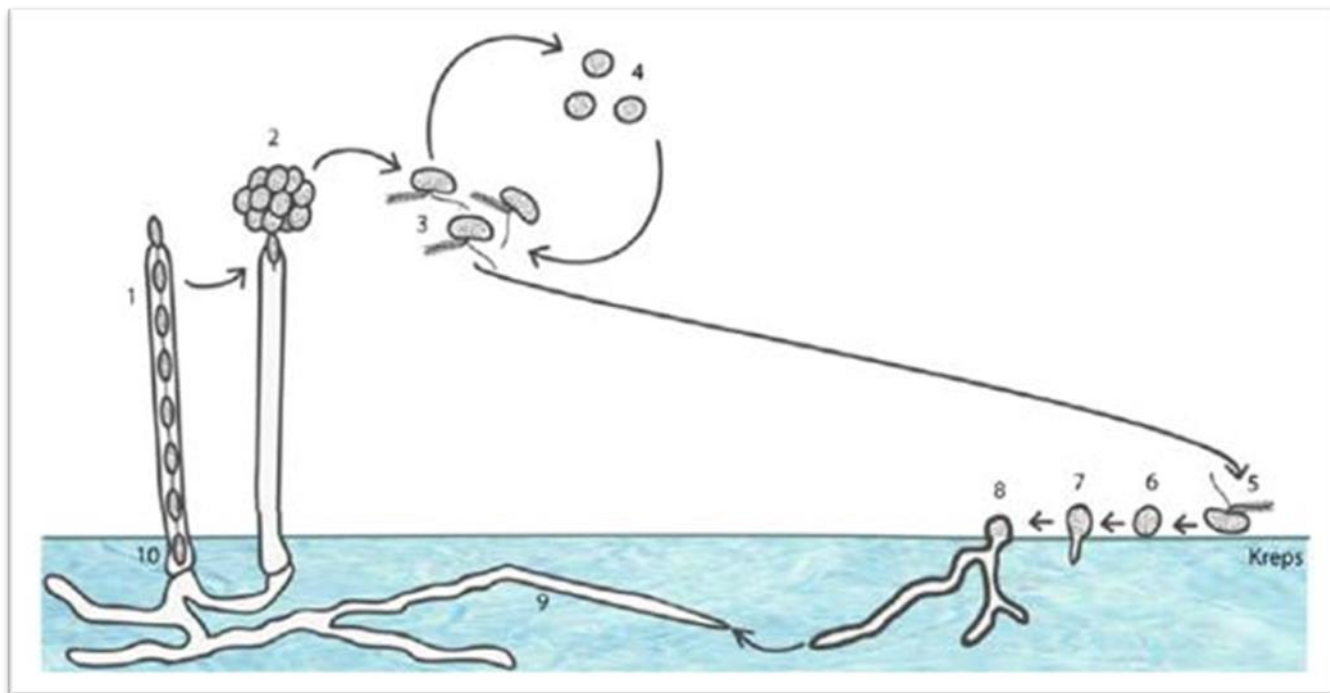
Slika 1: mramorni rak (*Procambarus virginalis*), (autor fotografije: Sandra Hudina)

Ono što mramornog raka razlikuje od ostalih deseteronožnih rakova je način razmnožavanja. Naime on se razmnožava partenogenezom što znači da su za razmnožavanje potrebne samo ženke te mužjaci ove vrste nisu poznati. To mramornog raka čini odličnim modelnim organizmom u biologiji, ali i uspješnom invazivnom stranom vrstom (Hossain i sur., 2018). Uz razliku u načinu razmnožavanja mramorni se rak od drugih europskih vrsta razlikuje u veličini koja je znatno manja od ostalih vrsta, i iznosi 32-40 mm u doba reproduktivne zrelosti. Za usporedbu s drugim uspješnim invazivnim stranim vrstama deseteronožnih rakova u Europi, kod vrste *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) ta veličina iznosi između 45 i 90 mm (Alcorlo i sur., 2008), a kod vrste *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) 70-90 mm (Capurro i sur., 2015), dok kod zavičajnih europskih vrsta kao što je *Astacus astacus* (Linnaeus, 1758) iznosi 70-90 mm (Kozak i sur., 2015).

Također, mramorni rak ima značajno kraće vrijeme dostizanja reproduktivne zrelosti koje iznosi samo pola godine dok kod ostale europske i veliki dio sjevernoameričkih vrsta spolnu zrelost dostiže u razdoblju između 3-5 godina (Hossain i sur., 2018). Nadalje fekunditet mramornog raka (50-700 jaja) je veći naspram zavičajnih europskih vrsta rakova (npr. 80-200 kod vrste *A. astacus*) i drugih invazivnih stranih vrsta rakova (npr. 200-400 kod vrste *P. leniusculus*; Hossain i sur., 2018). Također imaju relativno kratak inkubacijski period od 20-42 dana koji im omogućuje i više generacija godišnje, za razliku od europskih vrsta koje imaju inkubacijski period u rasponu od 240-270 dana te jednu generaciju godišnje (Hossain i sur., 2018). Invazivna strana vrsta iz istog roda, *P. clarkii*, ima sličan fekunditet (< 900 jaja) i period inkubacije (21-30 dana) kao mramorni rak samo što je vrsta veća od mramornog raka (Hossain i sur., 2018). U Europi su trenutno pronađene uspostavljene populacije mramornog raka u prirodi u 15 zemalja (Vogt, 2021). Te su populacije uspostavljene zbog puštanja jedinki u prirodu iz akvarističke razmjene u kojoj je ova vrsta prvi puta otkrivena i opisana 1995. godine (Vogt, 2020.) Što se ostatka svijeta tiče u Africi su pronađene uspostavljene populacije u prirodi na Madagaskaru te u Izraelu, Japanu i na Tajvanu (Vogt, 2021).

Uz ranije navedeno kraće generacijsko vrijeme, brže dostizanje spolne zrelosti i veći fekunditet koje ovoj vrsti daju kompetitivnu prednost nad zavičajnim vrstama rakova, mramorni rak je i potencijalni prijenosnik bolesti račje kuge, čiji je uzročnik vrsta *Aphanomyces astaci* Schikora, 1906. Ova vrsta spada u koljeno Oomycota odnosno algašica te u razred Saprolegniales. U Europu je stigla sredinom 19. stoljeća s američkim vrstama rakova. Sjeverno-američke vrste rakova su na nju većinom otporne jer su uz nju ko-evoluirale te služe kao njezini prijenosnici, dok su europske vrste osjetljive te ovaj patogen dovodi do značajnog pada njihovih populacija (Orlić i sur., 2021). Račja kuga se prenosi se horizontalno među srodnim vrstama pokretnim zoosporama koje preživljavaju isključivo u slatkoj vodi. Nakon pričvršćivanja na kutikulu, zoospora odbacuje bič i stvara ciste, nakon čega dolazi do klijanja i prodiranja u kutikulu raka. Kod vrsta otpornih na račju kugu dolazi do brzog imunskog odgovora koji se očituje u aktivaciji kaskade profenoloksidaze kojom se stvara melanin koji sprječava daljnje prodiranje račje kuge u tijelo raka, međutim kod manje otpornih vrsta hife se granaju i prodiru dublje u tkiva domaćina. U procesu kaskade profenoloksidaze se u nizu (kaskadi) reakcija uz pomoć

djelovanja enzima aktivira i stvara kapsula oko stranog tijela, u ovom slučaju hifa *A. astaci*, i time sprječava daljnje prodiranje patogena u organizam kod otpornih vrsta s brzim imunskim odgovorom (Beck i Habicht, 1996). Posljednja faza infekcije je sporulacija i otpuštanje zoospora (Söderhäll i Cerenius, 1999).



Slika 2: životni ciklus *Aphanomyces astaci*. Sporangij (1) sa sporama u obliku kugle (2) iz koje se pokretne zoospore (3) otpuštaju u vodu. Ako ne nađu pogodnog domaćina stvaraju ciste (4) ili kemotaksijom pronalaze prigodnog domaćina (5) i stvaraju ciste na kutikuli domaćina (6) nakon čega počinju klijati (7) i prodiru kroz kutikulu domaćina (8). Micelij se širi do unutrašnjosti domaćina (9) što dovodi do smrti domaćina. Nakon smrti domaćina dolazi do ponovne produkcije sporangija (10). Preuzeto iz: Vrålstad i sur., 2006.

Do danas je opisano nekoliko genotipskih grupa *Aphanomyces astaci* (Jussila i sur., 2021). Genotipska grupa A je izolirana iz roda *Astacus*, dok su ostale su genotipske grupe izolirane iz američkih vrsta te su iz vrste *P. leniusculus* (signalni rak) izolirane genotipske grupe B i C, dok je iz vrste *P. clarkii* (crveni močvarni rak) izolirana genotipska grupa D. Genotipska grupa E je izolirana iz vrste *Faxoinus limosus* (bodljobrađi rak) (Rafinesque, 1817) (Svoboda i sur., 2017).

Kod mramornog raka nije zabilježena nova genotipska grupa karakteristična za ovu vrstu, no izolirana je genotipska grupa D koja zaražava vrstu *P. clarkii* (Keller i sur., 2014), što pokazuje kako mramorni rak može biti vektor račje kuge. No, tolerancija na ostale sojeve račje kuge trenutno nije istražena za mramornog raka, a poznato je kako različiti sojevi mogu biti različito virulentni za istu vrstu. Primjerice zaražavanje signalnog raka izolatima genotipa As i Psl pokazalo je da signalni rak nije uvijek otporan čak na izolat karakterističan za vrstu (Psl), te da As izolat dovodi do ranijeg i većeg mortaliteta jedinki signalnog raka naspram izolata Psl (Aydin i sur., 2014).

S obzirom da različite sjevernoameričke vrste pokazuju varijabilnu toleranciju na različite sojeve račje kuge, cilj praktičnog dijela ovog rada bio je ispitati toleranciju mramornog raka na izolat PEC8 genotipa Psl (genotip grupa B), koji je izoliran s invazivne strane vrste signalnog raka. Ispitujemo taj soj zbog toga što je signalni rak jedna od najuspješnijih invazivnih vrsta u Europi te je prisutan u više od 29 zemalja (Kouba i sur., 2014), te postoji velika vjerojatnost da se mramorni rak nađe u kontaktu sa signalnim rakom i njegovim sojem račje kuge. U Hrvatskoj je signalni rak prisutan u rijekama Korani, Dravi i Muri (Dragičević i sur., 2020). Populacija signalnog raka u rijeci Dravi samo je 400 m udaljena od za sada jedine zabilježene lokacije mramornog raka u Hrvatskoj u jezeru Šoderica (Samardžić i sur., 2014). Kako je prisutnost račje kuge u populaciji signalnog raka u rijeci Dravi zabilježena (Maguire i sur., 2016), očekujemo kako je vrlo izgledno da mramorni rak već je ili bude zaražen ovim genotipom.



## 2. MATERIJALI I METODE

### 2.1. Opis životinja korištenih u eksperimentu

Istraživanje je provedeno u sklopu HRZZ projekta „Promjene sastava patogena i imunološkog odgovora tijekom širenja areala uspješnih invazivnih vrsta slatkovodnih rakova“ (HRZZ UIP 2'017-05-1720). Na terenu u jezeru Šoderica su prije ovog eksperimenta prikupljene ženke s jajima i juvenilnim jedinkama te su držane u laboratoriju do otpuštanja juvenilnih jedinki. Te juvenilne jedinke su nakon toga premještene u zasebne posude.

Ukupno 55 juvenilnih jedinki mramornog raka zaraženo je različitim koncentracijama zoospora patogena račje kuge, genotip Psl. Od ukupnog broja jedinki, 15 jedinki mramornog raka služilo je kao kontrola i nije bilo zaraženo, 20 je zaraženo koncentracijom od 7500 spora/mL te je 20 jedinki zaraženo koncentracijom od 15000 spora/mL. Jedinke su žrtvovane nakon nekoliko ciklusa zaražavanja te je na njima provedena detekcija patogena račje kuge. Pokus se odvijao u 4 koraka: produkcija zoospora *A. astaci*, zaražavanje, mjerenje jedinki i na kraju potvrda infekcije koja se odvija kroz kasnije opisane procese izolacije DNA, PCR-testa i elektroforeze koji su predstavljeni u ovom završnom radu. Izolat PEC8 patogena *A. astaci* korišten u ovom pokusu dobiven je od suradnika u Francuskoj, prof. dr. sc. Frédérica Grandjeana, Sveučilište u Poitiersu. Uzgojen je na krutoj i tekućoj hranjivoj podlozi sa dodanim antibioticima oksolinskom kiselinom i ampicilinom kako bi se spriječio rast bakterija, a prema protokolu opisanom u Makkonen i sur. (2012).

### 2.2. Izolacija DNA

Nakon provedbe eksperimenta (koji nije dio ovog završnog rada), DNA je izolirana iz komadića kutikule i uropoda prethodno zaraženih mramornih rakova. Izolirana je pomoću kompleta za izolaciju DNA NucleoSpin Microbial DNA (Macherey Nagel, Njemačka). Korišten je protokol za izolaciju gram pozitivnih i negativnih bakterija uz dodatak još jedne

filtracije sa završnim produktom izolacije iz protokola radi povećanja konačne koncentracije DNA. Korišteni su uređaji navedeni u Tablici 1.

Tablica 1 : Uređaji korišteni za izolaciju DNA i PCR

Naziv	Namjena u istraživanju	Proizvođač
LSE Vortex Mixer	Korišten po protokolu izolacije DNA	Corning Inc., SAD
Centrifuga Centric 200R	Korištena po protokolu izolacije DNA	Domel, Slovenija
Clean View UV Cabinet	Uređaj u kojem se Priprema PCR reakcija	Cleaver Scientific, UK
Alpha Cyclor 1 PCR max	Uređaj za izvođenje PCR reakcije	PCR max, UK
Mini-Centrifuge CD-1008	Spin down nakon miješanja sastojaka PCR reakcije	PHOENIX Instrument, Njemačka

### 2.3. PCR-test za otkrivanje patogena *A. astaci*

U izoliranim uzorcima DNA je metodom lančane reakcije polimerazom (eng. *Polymerase Chain Reaction*) analizirana prisutnost patogena *A. astaci*. Lančana reakcija polimerazom je *in vitro* replikacija DNA molekule. Sastoji se od tri koraka koji se ponavljaju u više ciklusa. Ti koraci se odvijaju u PCR uređaju (PCR max, UK), a oni su denaturacija kalupa DNA, prijanjanje početnica i elongacija. U PCR reakciji korištene su početnice uzvodna početnica 42 i nizvodna početnica 640. Ove početnice umnažaju ITS regiju 5.8 rRNA gena patogena račje kuge, *Aphanomyces astaci* (Pavić, 2018).

Ukupna reakcijska smjesa od 27  $\mu$ L za jednu reakciju sadržavala je :

-DNA kalup	3 $\mu$ L
-EmeraldAmp MAX PCR Master Mix (TAKARA, Japan)	12,5 $\mu$ L
-10 mM uzvodna početnica 42 (konačna koncentracija 0,5 $\mu$ M)	1,25 $\mu$ L
-10 mM nizvodna početnica 649 (konačna koncentracija 0,5 $\mu$ M)	1,25 $\mu$ L
-deionizirana voda	9 $\mu$ L

Za provođenje PCR-a koristila sam protokol razvijen u radu Oidtmann i sur.(2006). Početna denaturacija je trajala 5 minuta na 96°C nakon čega je slijedilo 35 ciklusa. Jedan ciklus sadrži 1 minutu denaturacije na 96°C , pa 1 minutu na 61°C za prijanjanje početnica te na kraju 1 minutu za elongaciju lanaca na 72 °C. Na kraju slijedi završna elongacija lanaca od 5 minuta na 72°C. Za pozitivnu kontrolu je korišten izolat *A. astaci* PEC8, a za negativnu je korištena deionizirana voda umjesto DNA kalupa.

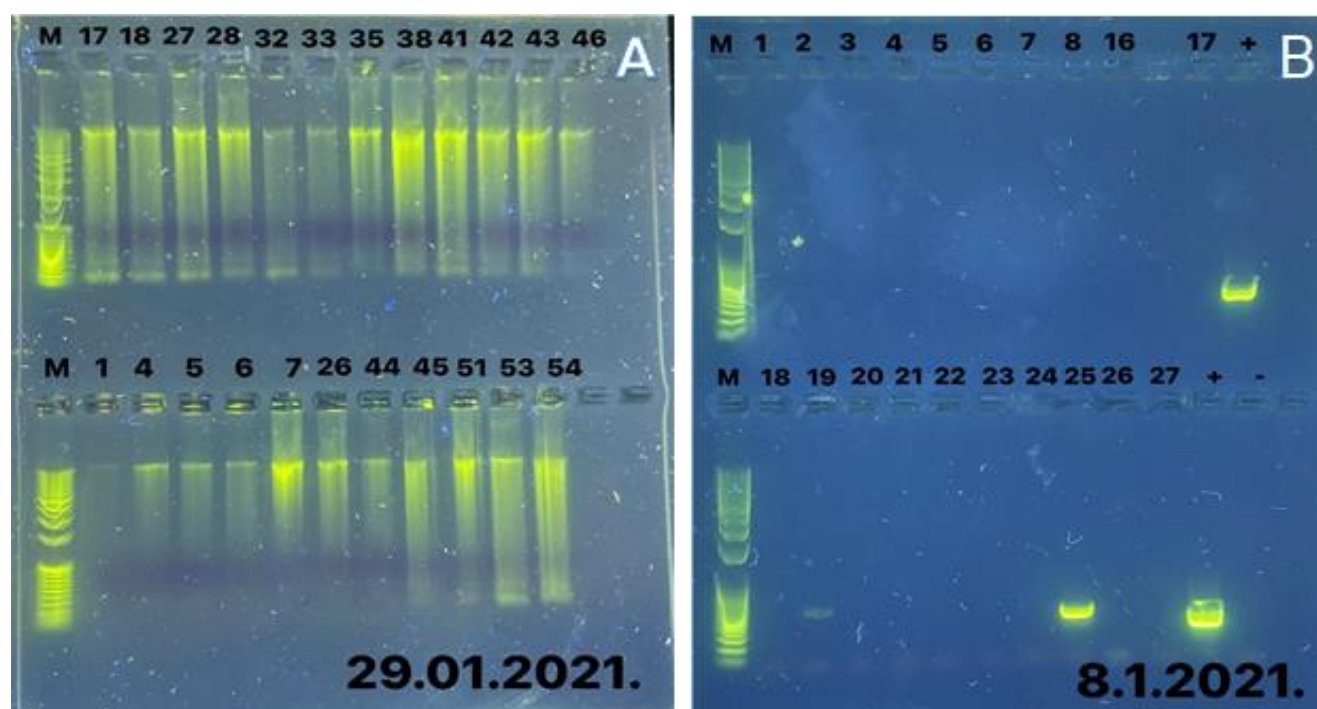
#### 2.4. Elektroforeza u agaroznom gelu

Elektroforeza je metoda kojom se DNA molekula može odvajati, identificirati i purificirati. To je moguće zbog toga što je molekula DNA negativno nabijena te se može odvajati u električnom polju u kojem postoji protok struje. Agarozni gelovi su kompleksne mreže polimera agaroze, oni su porozni te ovisno o koncentraciji agaroze mogu razdvajati molekule različitih veličina. Elektroforezom u agaroznom gelu su analizirani fragmenti DNA dobiveni PCR-om i izolacijom DNA.

Elektroforeza je rađena na izoliranoj genomskoj DNA kako bi se utvrdila uspješnost provedene izolacije. Elektroforeza je napravljena i nakon amplifikacije PCR-testom kako bi se utvrdila prisutnost patogena *A. astaci*. Kako bi se napravio agarozni gel, agarosa se otapa u TAE (tris acetat EDTA) puferu. Za elektroforezu nakon PCR-a se korišten je i 2%-tni agarozni gel, a nakon izolacije DNA 1%-tni agarozni gel. Odgovarajuća količina agaroze (0,8 g za 1%-tni odnosno 1,6 g za 2%-tni agarozni gel) se stavlja u 80 mL TAE pufera te se dodaje 8 µL boje za vizualizaciju DNA (GelStar™). Otopina je ohlađena na 60°C te je izlivena u kadicu za elektroforezu. Kod elektroforeze nakon izolacije DNA je za vizualizaciju molekula DNA dodana boja za nanošenje uzoraka (MassRuler DNA Loading Dye 6x, Thermo Fisher Scientific, SAD). Elektroforeza je provedena u električnom polju napona 100V u 1xTAE puferu 45 minuta kod fragmenata nakon izolacije DNA i 50 minuta nakon PCR-testa. Sve boje i marker korištene prilikom elektroforeze navedene su u tablici 2.

Tablica 2: korištene boje i marker korišteni za elektroforezu u agaroznom gelu

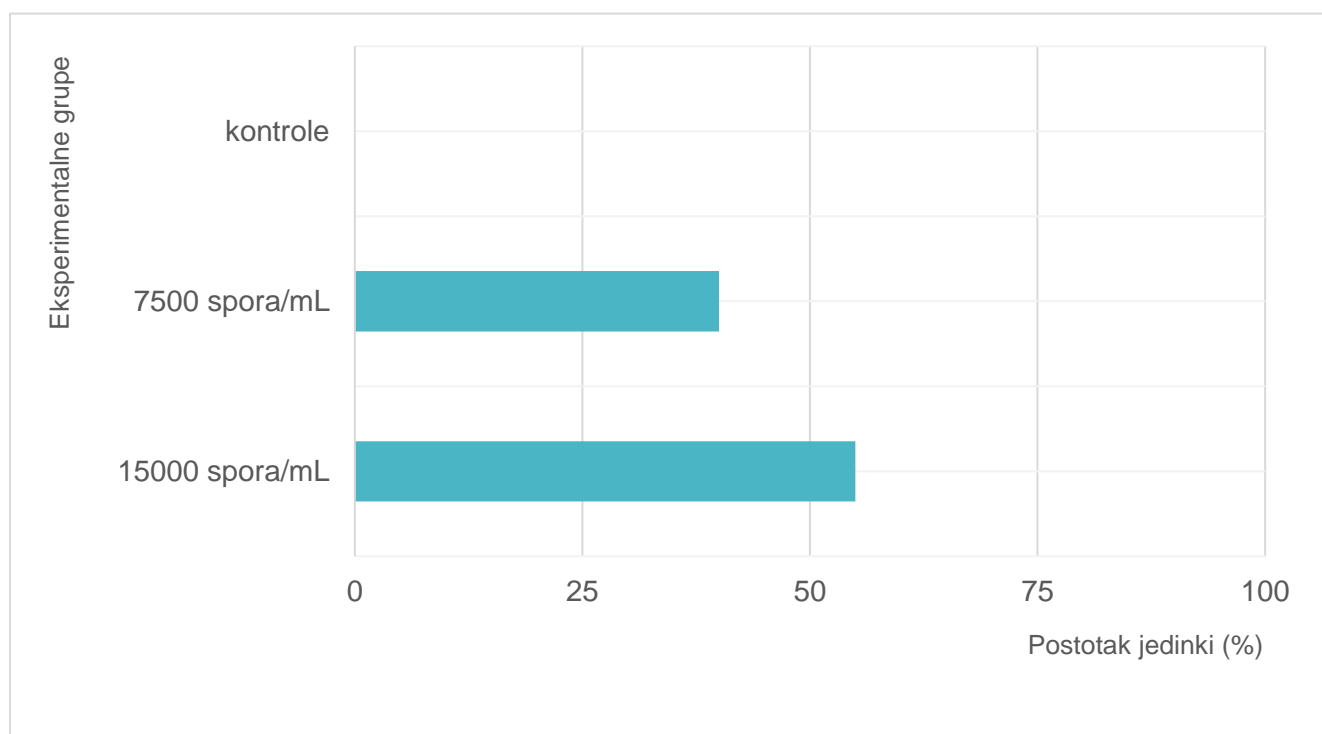
Naziv	Namjena u istraživanju	Proizvođač
GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain 10,000X	Boja za vizualizaciju DNA	Lonza, Švicarska
MassRuler DNA Loading Dye 6x (Loading buffer)	Boja za vizualizaciju DNA nakon izolacije	Thermo Fisher Scientific, SAD (Sastoji se od 3 mL 30%-tnog glicerola, 25 mg brom-fenol-blue 0.25%-tne boje i destilirane vode do 10 mL.)
SimplyLoad™ Tandem DNA ladder	Marker	Lonza, Švicarska



Slika 3: Agarozni gel nakon izolacije DNA (A) i nakon PCR-testa (B). Brojevi na obje slike predstavljaju šifre uzoraka ispitanih nakon izolacije DNA odnosno PCR-testa dok + i – na slici B predstavljaju pozitivnu (+) i negativnu (-) kontrolu. Na slici A vidljiva je obojena i ionirana DNA (razmaz uzorka je prisutan zbog koraka mehaničke lize stanica kuglicama, sukladno korištenom protokolu za izolaciju mikrobne DNA). Na slici B vidljiva je prisutnost patogena *A. astaci* na uzorku broj 25 kao i na pozitivnim kontrolama (+). (autor fotografije: Jana Zekirovski).

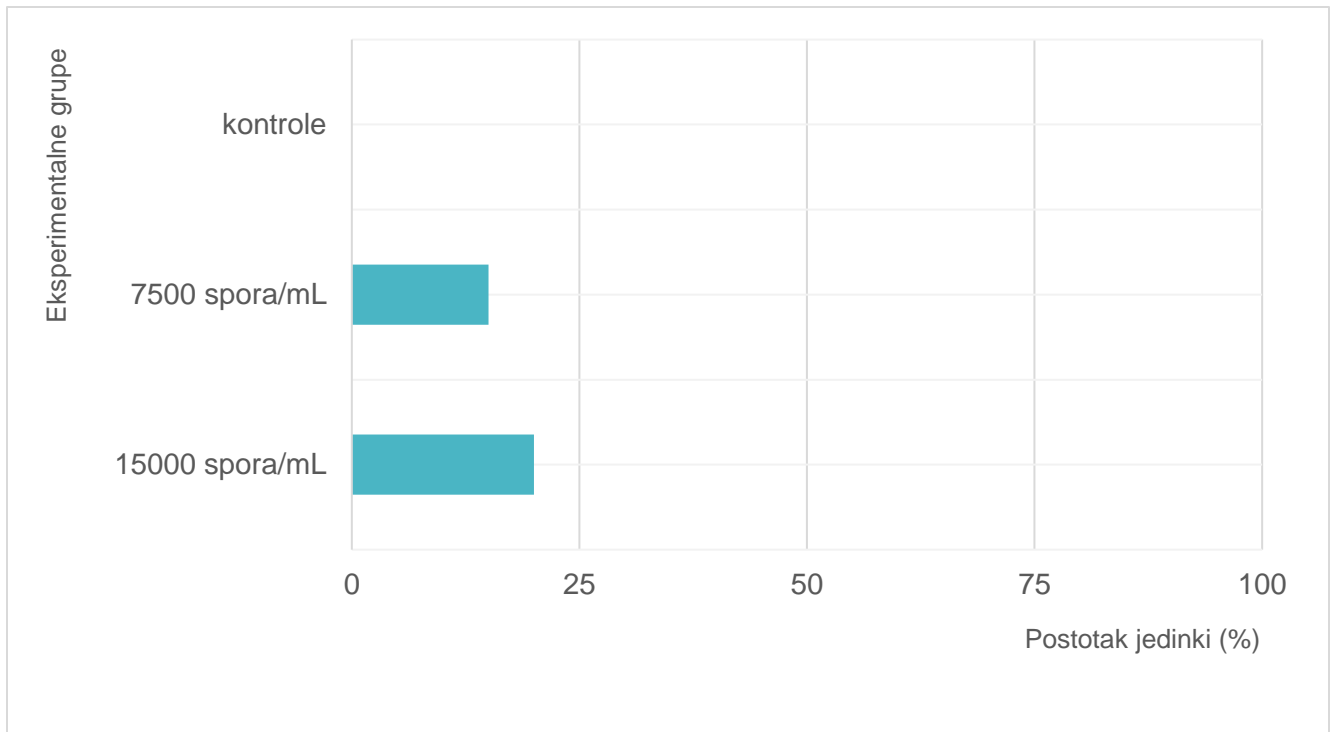
### 3. REZULTATI

Nakon provedenog pokusa PCR-testom je utvrđeno da niti jedna od kontrola nije imala prisutan patogen račje kuge. U eksperimentalnoj grupi zaraženoj koncentracijom od 7500 spora/mL kod 8 od 20 jedinki (40%) zabilježena je prisutnost patogena račje kuge, dok je u grupi koja je bila zaražena koncentracijom od 15000 spora/mL, patogen zabilježen kod 11 od 20 jedinki (55%) (Slika 4).



Slika 4: Postotak jedinki u 3 različite eksperimentalne grupe kod kojih je zabilježena prisutnost patogena račje kuge *A. astaci* upotrebom PCR-a.

Što se tiče smrtnosti jedinki od račje kuge tijekom eksperimenta iz kontrolne grupe niti jedna jedinka nije uginula. U eksperimentalnoj grupi zaraženoj koncentracijom od 7500 spora/ml uginule su 3 od 20 jedinki (15%), a u eksperimentalnoj grupi zaraženoj koncentracijom od 15000 spora/ml uginule su 4 od 20 jedinki (20%) (Slika 5).



Slika 5: Postotak uginulih jedinki u 3 različite eksperimentalne grupe za vrijeme trajanja eksperimenta.

#### 4. RASPRAVA

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati mogućnost infekcije mramornog raka genotipom Psl račje kuge kako bi se s time povezano mogla utvrditi i moguća opasnost za autohtone vrste na područjima na kojima ova invazivna strana vrsta obitava. Ispitali smo mogućnost infekcije genotipom Psl jer mramorni rak nema svoj specifičan genotip *A. astaci* s obzirom na neutvrđeno porijeklo (vrsta je nastala u akvaristici), ali s obzirom da je ova vrsta srodna postojećoj sjevernoameričkoj vrsti *P. fallax* i s obzirom da je poznato da su sjevernoameričke vrste relativno tolerantne na bolest račje kuge (Boštjančić i sur., 2021) očekivali smo da će i mramorni rak potencijalno biti otporan na genotip Psl, što je pokazano i nedavnim istraživanjem u kojem je zaražen mali broj jedinki mramornog raka jednokratno i s nižim koncentracijama patogena i u kojem nije zabilježen mortalitet mramornog raka (Boštjančić i sur., 2021). S obzirom da su istraživanja pokazala da su razne sjevernoameričke vrste različito otporne na genotipove ovog patogena (Vogt, 2020), i s obzirom na relativno visoke koncentracije te uzastopno zaražavanje primjenjeno u ovom istraživanju, očekivali smo određenu razinu mortaliteta jedinki mramornog raka izloženih genotipu Psl u ovom istraživanju.

U radu Keller i sur. (2014) je prvi puta zabilježena prisutnost patogena *A. astaci*, genotipa Pc, kod vrste mramorni rak. Ovom je genotipu originalni domaćin *P. clarkii*. Rezultati tog rada su pokazali veću kako je patogen bio prisutan kod 70% jedinki mramornog raka koje su uzgojene u laboratoriju. U ovom radu riječ o eksperimentalnom zaražavanju koje je rezultiralo kroničnom infekcijom kod 40-55% jedinki, što nam potencijalno govori da je genotip Psl manje virulentan od genotipa Pc za mramornog raka, ili da naš eksperimentalni dizajn nije bio okolišno relevantan .

Genotip Ps je prema radu Aydin i sur. (2014) izazvao podjednaku smrtnost kod vrste *P. leniusculus* (signalni rak) kao soj As. Genotip As spada u genotipsku grupu A te je prvotno izoliran iz predstavnika roda *Astacus*. Smatra se kako je ovaj genotip prvi dospio u Europu. Isto tako ovaj soj je značajno manje virulentan od soja Psl, te izaziva kroničnu infekciju u otprilike 30% slučajeva kod jedinki iz populacija u prirodi (Viljamaa-Dirks, 2016). Istraživanje u radu Aydin i sur. (2014) provedeno na drugoj invazivnoj vrsti,

signalnom raku, ali rezultati govore o njegovoj značajnoj zarazi genotipom As koji se u prirodi smatra najmanje virulentnim. U navedenom radu jedinke signalnog raka su uzete iz prirode i korištene za eksperiment. Virulentnost ovih genotipova se u tom radu istraživala radi mogućeg mortaliteta od određenih sojeva čak i kod vrsta koje su inače poznati vektori račje kuge. Ovo bi moglo biti povezano s mramornim rakom iz razloga što je kao i signalni rak mogući prijenosnik račje kuge te može biti kronično inficiran i ostalim različitim sojevima patogena *A. astaci*, kao što je vidljivo iz ovog istraživanja i postojećih literaturnih podataka.

Mogućnost prijenosa račje kuge s drugih invazivnih vrsta, kao što je *P. clarkii*, na autohtone europske vrste već je istražen (Rezinciuc i sur., 2014). PCR metodama je utvrđeno kako su europske vrste zaražene svim genotipskim grupama, ali u radu Rezinciuc i sur. (2014) prevladava genotipska grupa D. Stoga mramorni rak kao invazivna vrsta i potencijalni vektor raznih genotipova račje kuge, može predstavljati opasnost za autohtone vrste, osim zbog svoje ranije opisane kompetitivne prednosti, i zbog mogućnosti širenja različitih sojeva patogena *A. astaci*. Prijenos ovog patogena, kako je navedeno u uvodu, izuzetno je opasan za autohtone vrste koje nemaju dovoljno brzi imunski odgovor na infekciju, te je ona za njih uglavnom letalna. Jedna od autohtonih vrsta za koju bi ovo moglo predstavljati problem je zavičajna i ugrožena vrsta riječnog raka, *A. astacus*, koji je zabilježen u jezeru Šoderica i koji je zaštićen na nacionalnoj razini Zakonom o zaštiti prirode (N.N. br. 80/13) i Pravilnikom o strogo zaštićenim vrstama (N.N. br.144/2013). Također je zaštićen na međunarodnoj razini Dodatkom III Konvencije o zaštiti europskih divljih vrsta i prirodnih staništa (Bernska konvencija) te Dodatkom V Direktive o zaštiti prirodnih staništa i divlje faune i flore.

Što se mramornog raka tiče njegova invazivnost i ponašanje uspoređeno je u radu Linzmaier i sur. (2018) s vrstom *F. limosus* (bodljobradi rak), koja pripada u invazivne strane vrste rakova koje su dugo prisutne u Europi. Ovo istraživanje je pokazalo kako su mramorni rakovi u bili dominantni u antagonističkim interakcijama s vrstom *F. limosus* čak i kada su jedinke mramornog raka bile manje od jedinki bodljobradog raka. Isto tako praćeno je i njihovo ponašanje u slučaju prijetnje iz okoliša, kao što su predatori ili kompeticija s drugim vrstama, te su mramorni rakovi na nju reagirali skrivanjem i



izbjegavanjem dok su mušjaci bodljibradog raka reagirali većinom agresivno na prijetnje. S druge strane ženke bodljibradog raka su isto kao i mramorni rakovi reagirali skrivanjem odnosno izbjegavanjem prijetnje. To je i logično očekivati s obzirom da su sve jedinke mramornog raka ženke. Što je ovdje neobično su ranije navedene antagonističke interakcije s mušnjacima u kojima su jedinke mramornog raka bile uspješnije. U ovom istraživanju je zaključeno kako mramorni rak mogao ugroziti čak i druge invazivne vrste zbog izrazito dobre prilagodljivosti uvjetima okoliša.

U radu objavljenom ove godine (Vogt, 2021) razmatra se moguća korist uzgoja mramornog raka u akvakulturi. Zaključeno je kako bi zbog svojeg partenogenetskog načina razmnožavanja, mogao biti dobar i konstantan izvor hrane i proteina za mnogo ljudi u siromašnijim zemljama. Ipak jedan od nedostataka njegovog uzgoja je maksimalna masa do koje jedinka dolazi koja iznosi oko 50 g dok je to kod vrste *P. clarkii* između 60 i 80 g u prosjeku. Vrsta *P. clarkii* se već koristi u akvakulturi te je jeftina u odnosu na druge vrste slatkovodnih rakova. Na primjer cijena kilograma vrste *P. clarkii* kreće se između 5 i 10 američkih dolara, dok je cijena kilograma najveće vrste na slici 6, *Cherax tenuimanu* (Smith, 1912) , između 30 i 70 američkih dolara (Vogt, 2021). Ovaj odnos veličina raznih vrsta koje se koriste u akvakulturi čija je posljedica i njihova cijena prikazan je u prilogu 1. Što se uzgoja mramornog raka u akvakulturi tiče to bi jedino bilo isplativo u prirodnim jezerima sa hranom koja se već tamo nalazi što bi gotovo sigurno rezultiralo bijegom jedinki te bi im omogućilo daljnju invaziju tog područja. Uz to moguće je da bi se u slučaju uzgoja, populacije okolnih vrsta u području potencijalno zarazile račjom kugom, te je zaključeno kako, za sada, uzgoj mramornog raka nije isplativ.

Sve ove usporedbe sa ostalim invazivnim vrstama ukazuju na to kako mramorni rak ima veći potencijal za invaziju te time i za širenje račje kuge. Upravo zbog njegove invazivnosti uzgoj u slobodnoj akvakulturi u prirodnom jezeru se doima relativno rizičan zbog gotovo sigurnog bijega vrste te time i stvaranja novih populacijama na mjestima gdje ove vrste nije nužno bilo. Također dokazane relativne tolerancije na dva virulentna genotipa račje kuge, te zbog bioloških karakteristika vezanih uz reprodukciju (partenogenetsko razmnožavanje, kratko generacijsko vrijeme, rano dostizanje spolne zrelosti, visok

fekunditet) ova vrsta ukoliko dođe u kontakt s patogenom, u vrlo kratkom vremenu može uspostaviti velike populacije koje onda mogu biti značajan izvor patogena u prirodi.

## 5.ZAKLJUČAK

U ovom radu dan je pregled o mramornom raku te je ispitana mogućnost zaraze genotipom Psl koji je karakterističan za invazivnu stranu vrstu signalnog raka, *P. leniusculus*. Pregledom literature je ustavljeno kako mramorni rak nema karakteristični i specifični genotip uzročnika bolesti račje kuge. Dokazano je da je moguća kronična zaraza mramornog raka genotipom Psl. Korištenjem visokih koncentracija patogena i uzastopnim zaražavanjem došlo je do mortaliteta 20% jedinki na višoj koncentraciji patogena što nam dodatno govori relativno dobroj otpornosti mramornog raka na ovaj genotip. Kod grupe sa nešto manjom koncentracijom spora mortalitet jedinki iznosio je 15%. Ispitivanje uspješnosti zaraze pokazalo je da je kod 63 % zaraženih jedinki u obje ispitane grupe patogen bio prisutan 6 tjedana nakon infekcije što govori da su te jedinke koje su preživjele infekciju bile kronično zaražene i kao takve mogu biti vektori patogena na druge jedinke mramornog raka i druge autohtone vrste. U slučaju Hrvatske, najvjerojatniji je prijenos račje kuge na autohtonu vrstu riječnog raka koji je zabilježen u jezeru Šoderica u kojem obitava i mramorni rak.

## 6. LITERATURA

Alcorlo P., Geiger W., Otero M.(2008): Reproductive biology and life cycle of the invasive crayfish *Procambarus clarkii* (Crustacea: Decapoda) in diverse aquatic habitats of South-Western Spain: Implications for population control. *Fundamental and Applied Limnology* **173/3**: 197–212.

Aydin H., Koko H.I., Makkonen J., Kortet R.(2014): The signal crayfish is vulnerable to both the As and the Psl-isolates of the crayfish plague. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* **413**: 03.

Beck G., Habicht S.G.(1996):Immunity and the Invertebrates. *Scientific American* **275** (5): 60–66.

Bernska konvencija (2002) Europska direktiva o zaštiti prirodnih staništa i divlje faune i flore.[https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/LSU/?uri=CELEX:21979A0919\(01\)](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/LSU/?uri=CELEX:21979A0919(01)) (20.08.2021.)

Boštjančić L.L., Francesconi C., Rutz C., Hoffbeck L., Poidevin L., Kress A., Jussila J., Makkonen J., Feldmeyer B., Bálint M., Lecompte O., Theissinger K. (2021): Comparative transcriptome analysis of noble crayfish and marbled crayfish immune response to *Aphanomyces astaci* challenges. *BioRxiv-pretisak*.

Capurro M., Galli L., Mori M.(2015): Reproductive cycle of *Pacifastacus leniusculus* (Dana) (Crustacea: Decapoda) from the Brugneto Lake (Liguria, northwest Italy). *Italian Journal of Zoology* **82**: 3.

Cvitanić M.(2017): Reproductivni ciklus invazivnog mramornog raka *Procambarus fallax* (Hagen, 1870) *f. virginalis* u jezeru Šoderica. Diplomski rad.

Dragičević P., Faller M., Kutleša P., Hudina S.(2020): Update on the signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) range expansion in Croatia: a 10-year report. *BioInvasions Records* **4**: 793–807.

Europska direktiva o zaštiti prirodnih staništa i divlje faune i flore (1992). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:31992L0043> (20.08.2021.)

Hossain S., Patoka J., Kouba A., Burič M.(2018): Clonal crayfish as biological model: a review on marbled crayfish. *Biologia* **73**: 841-855.

Hossain S., Kouba A., Burič M.(2019): Morphometry, size at maturity, and fecundity of marbled crayfish (*Procambarus virginalis*). *Zoologischer Anzeiger* **281**: 68-75.

Jussila J., Edsman L., Maguire I., Dieguez-Uribeondo J., Theissing K.(2021): Money Kills Native Ecosystems: European Crayfish as an Example. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 9. doi: 10.3389/fevo.2021.648495.

Keller N.S., Pfeiffer M., Roessink I., Schulz R., Schrimpf A.(2014): First evidence of crayfish plague agent in populations of the marbled crayfish (*Procambarus fallax forma virginalis*). *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* **414**: 15.

Kouba A., Petrusek A., Kozak P.(2014): Continental-wide distribution of crayfish species in Europe: update and maps. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* **413**: 05.

Kozák P, Ďuriš Z, Petrusek A, Buřič M, Horká I, Kouba A, Polícar T.(2015): Crayfish biology and culture. University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Fisheries and Protection of Waters, Vodňany, Czech Republic.

Linzmaier S.M., Goebel L.S. , Ruland F., Jeschke J.M.(2017): Behavioral differences in an over-invasion scenario: marbled vs. spiny-cheek crayfish. *Ecosphere* **9**: 9.

Maguire I., Jelić M., Klobučar G., Delpy M., Delaunay C., Grandjean F.(2016): Prevalence of the pathogen *Aphanomyces astaci* in freshwater crayfish populations in Croatia. *Dis Aquat Organ* **11;118**: 45-53.

Makkonen J., Jussila J., Kortet R., Vainikka A., & Kokko H. (2012): Differing virulence of *Aphanomyces astaci* isolates and elevated resistance of noble crayfish *Astacus* against crayfish plague. *Diseases of Aquatic Organisms*, **102(2)**: 129–136.

Narodne Novine (2013) Pravilnik o strogo zaštićenim vrstama. Narodne novine 144/13.

Narodne Novine (2013) Zakon o zaštiti prirode. Narodne novine 80/13.

Oidtman B., Geiger S., Steinbauer P., Culas A., Hoffmann R. W.(2006): Detection of *Aphanomyces astaci* in North American crayfish by polymerase chain reaction. Diseases of Aquatic Organisms **72**: 53-64.

Orlić K., Šver L., Burić L., Kazazić S., Grbin D., Maguire I., Pavić D., Hrašćan R., Vladušić T., Hudina S., Bielen A.(2021): Cuticle-associated bacteria can inhibit crayfish pathogen *Aphanomyces astaci*: Opening the perspective of biocontrol in astaciculture. Aquaculture **533**.

Pavić D.(2018): Praćenje stanja bolesti račje kuge u Nacionalnom parku Plitvička jezera. Diplomski rad, 44.

Rezinciuc S., Galindo J., Montserrat J., Dieguez-Uribeondo J.(2014): AFLP-PCR and RAPD-PCR evidences of the transmission of the pathogen *Aphanomyces astaci* (Oomycetes) to wild populations of European crayfish from the invasive crayfish species, *Procambarus clarkii*. Fungal Biology **7**: 612-620

Samardžić M., Lucić A., Maguire I., Hudina S.(2014): The First Record of the Marbled Crayfish (*Procambarus fallax* (Hagen, 1870) *f. virginialis*) in Croatia. Crayfish news **4**: 1.

Svoboda J., Mrugala A., Kozubikova-Balcarova E., Petrussek A.(2017): Hosts and transmission of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci*: a review. Journal of Fish Diseases broj **40**: 127–140.

Viljamaa-Dirks S.(2016): Epidemiology of crayfish plague. Doctoral dissertation, Helsinki University.

Vogt G.(2020): Biology, ecology, evolution, systematics and utilization of the parthenogenetic marbled crayfish, *Procambarus virginialis*. Crayfish: Evolution, Habitat and Conservation Strategies : 137-227.

Vogt G.(2021): Evaluation of the suitability of the parthenogenetic marbled crayfish for aquaculture: potential benefits versus conservation concerns. Hydrobiologia **848**: 285-298

Vrålstad, T., Håstein, T., Taugbøl, T., Lillehaug, A.(2006): Krepsepest - smitteforhold i norske vassdrag og forebyggende tiltak mot videre spredning av krepsepest. Veterinærinstituttets rapportserie **6**: 1-25.

## 7.SAŽETAK

*Procambarus virginalis* (Lyko, 2017) je invazivna strana vrsta nepoznatog podrijetla s uspostavljenim populacijama u prirodi zabilježenim u 15 europskih zemalja. Ova vrsta ima veći fekunditet od autohtonih te od ostalih invazivnih stranih vrsta rakova. Uz to ima specifičan način razmnožavanja za deseteronožne rakove, razmnožava se partenogenetski, što je jedan od bitnijih faktora u uspjehu njezine invazije. Uz to je i mogući prijenosnik patogena *Aphanomyces astaci*, uzročnika bolesti račje kuge. američke vrste koje su ko-evoluirale s ovim patogenom su relativno tolerantne na njega te od njega ne ugibaju, dok su europske vrste manje tolerantne na njega te kod njih infekcija većinom dovodi do visokih stopa mortaliteta. U ovom radu se razmatra mogućnost zaraze mramornog raka patogenom račje kuge. S obzirom da je podrijetlo mramornog raka nepoznato i da je on srodan s vrstom *Procambarus fallax* mogao bi biti relativno otporan na patogen i time prenositi bolest račje kuge. U ovom radu sam eksperimentalno određivala mogućnost zaraze mramornog raka koncentracije patogena doze i opetovano zaražavanje dovode do mortaliteta u 15-20% slučajeva. Ovi rezultati ukazuju kako je mramorni rak potencijalni vektor različitih virulentnih genotipova račje kuge, čime predstavlja dodatnu opasnost za autohtone vrste rakova.

Ključne riječi: mramorni rak; račja kuga; invazivna vrsta



## 8.SUMMARY

*Procambarus virginalis* (Lyko, 2017) is an emerging invasive alien species of an unknown origin, with established populations in the wild in 15 European countries. This species has high fecundity compared to other native and invasive crayfish species and also reproduces by parthenogenesis, which significantly contributes to its invasion success. Additionally, marbled crayfish is a potential carrier of the crayfish plague pathogen, the oomycete *Aphanomyces astaci*. American crayfish species have co-evolved with the pathogen and are relatively tolerant to the infection, while European species are less resistant, and the infection usually leads to high mortality. Here, the potential of infection of marbled crayfish with the crayfish plague pathogen has been assessed. Because marbled crayfish origin is unknown, but closely related to the American species *Procambarus fallax*, it could be prone to the *A. astaci* infection and could act as its carrier. Here, I assessed experimentally the possibility of its infection by the virulent genotype B isolated from another successful invader, the signal crayfish. The results of the experiment have shown that chronic infection with the pathogen occurred in 40-55% of cases (depending on applied pathogen load) and that high pathogen load in combination with repeated infection leads to a mortality rate of 15-20%. These results show marbled crayfish is a potential vector of different virulent crayfish plague genotypes, and through disease transmission may exert an additional negative impact on native crayfish species.

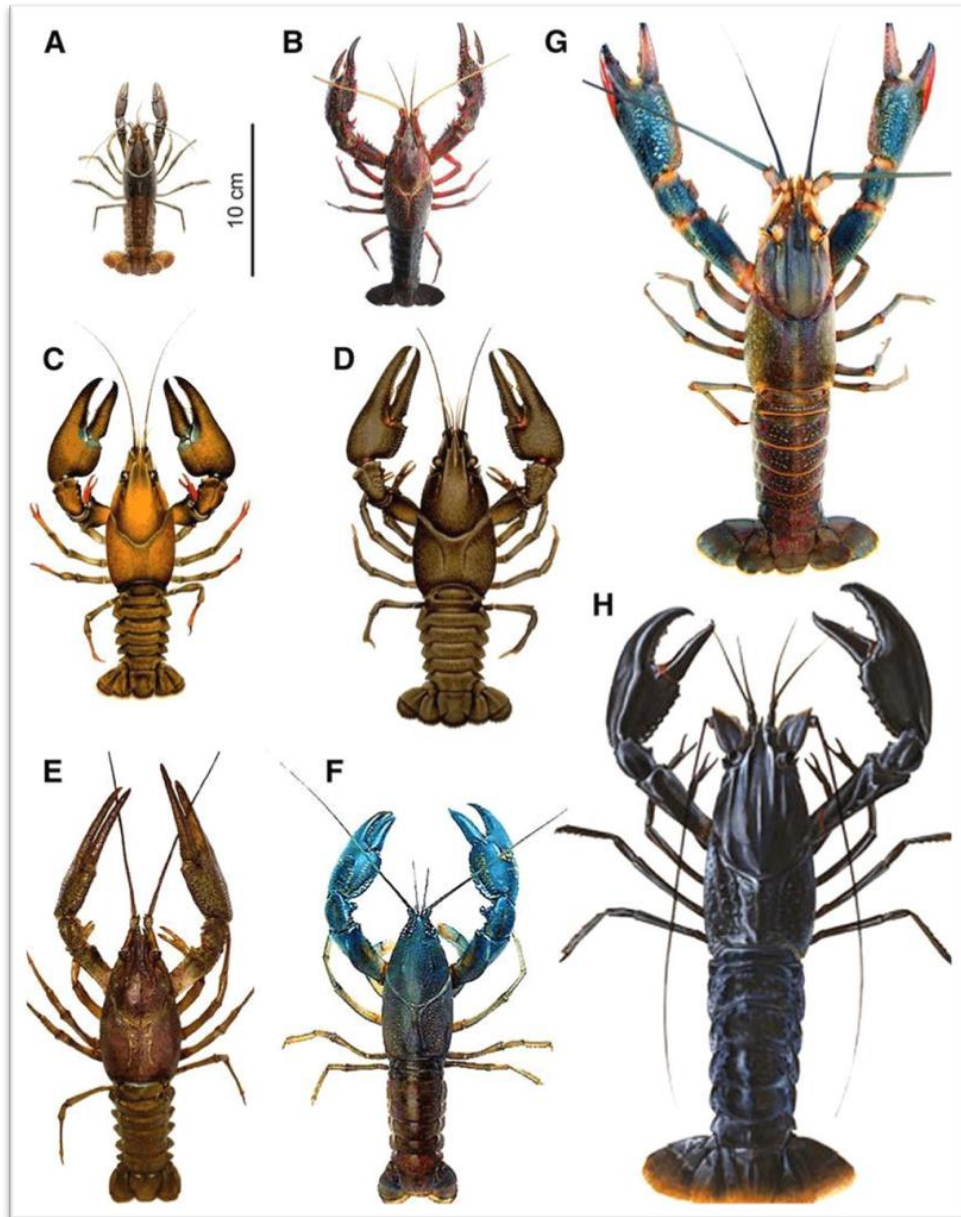
Keywords: marbled crayfish; crayfish plague; invasive species

## 9. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Zagrebu 29. lipnja 1999. godine. Završila sam OŠ Zapruđe i IX. Gimnaziju u Zagrebu. Upisala sam preddiplomski studij Znanosti o okolišu 2018. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

U sklopu kolegija Protista sam sudjelovala u programu Biostudologije s održanim predavanjem Kako žive alge? Abiotički i biotički čimbenici 2019. godine. Iste godine sam sudjelovala i u Noći biologije na Zavodu za molekularnu biologiju s radionicom vezanom uz biotehnologiju.

## 10.PRILOZI



Prilog 1: Usporedba veličine tijela mramornog raka A i mužjaka vrsta koje se koriste u akvakulturi. B-*Procambarus clarkii*, C-*Pacifastacus leniusculus*, D-*Astacus astacus*, E-*Pontastacus leptodactylus*, F-*Cherax destructor*, G-*Cherax quadricarinatus*, H-*Cherax tenuimanus*. Na slici je prikazano koliko bi zbog veličine tijela bilo neisplativo u odnosu na ostale vrste koristiti mramornog raka u akvakulturi, uz još ranije navedene razloge. Preuzeto iz: Vogt, 2021.