

Filogenija vrste *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858) na osnovi analize biljega 16S i COI na mitohondrijskoj DNA

Futo, Momir

Master's thesis / Diplomski rad

2009

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:650517>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-18**



Repository / Repozitorij:

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



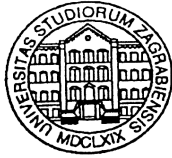
SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Momir Futo

**Filogenija vrste *Austropotamobius pallipes*
(Lereboullet, 1858) na osnovi analize biljega
16S i COI na mitohondrijskoj DNA**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2009.



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

DIPLOMSKI RAD

Filogenija vrste *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858) na osnovi analize biljega 16S i COI na mitohondrijskoj DNA

MOMIR FUTO

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Zoologijski zavod

Rooseveltov trg 6

Zagreb

Filogenetski odnosi unutar populacija slatkovodnih rakova vrste *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858) još nisu u potpunosti razjašnjeni. Novija istraživanja ukazuju na postojanje vrste-kompleksa, odnosno postojanje dva ili više taksona u okviru sadašnje vrste *A. pallipes* koji bi se u budućnosti mogli zasebno izdvojiti na razinu vrste. Cilj ovog istraživanja je dokazati ovu hipotezu i odrediti filogenetski status jedinki uzorkovanih na teritoriju Hrvatske.

U ovom diplomskom radu istražuju se filogenetski odnosi 76 jedinki vrste *Austropotamobius pallipes* uzorkovanih na 22 lokacije u Hrvatskoj, Bosni i Hercegovini i Austriji. Istraživanje je provedeno na temelju varijabilnosti u DNA sekvencama mitohondrijskih gena za 16S rRNA i COI. Genske sekvence ekstrahirane iz uzorkovanih jedinki uspoređene su sa homolognim sekvencama korištenim u ranijim istraživanjima na ovim životinjama širom Europe. Za analizu rezultata primijenjeni su statistički filogenetski programi koji se baziraju na stanjima karaktera i matrici genske udaljenosti.

Dobiveni rezultati potvrdili su pretpostavku da se unutar kompleksa vrste *A. pallipes* nalaze dva taksona koji odgovaraju razini vrste te nekoliko taksona koji odgovaraju razini podvrste; omogućili su bolje razumijevanje filogenetskih odnosa između populacija rakova u Hrvatskoj i populacija u ostatku Europe te su omogućili određivanje vremena odvajanja pojedinih populacija na istraženom području jugoistočnog Balkanskog poluotoka.

Diplomski rad ima: 90 stranica, 20 slika, 20 tablica, 96 literaturnih navoda, izvornik je hrvatski

Rad je pohranjen u: Središnjoj biološkoj knjižnici

Gljučne riječi: filogenija, *Austropotamobius pallipes*, 16S rRNA, COI, mitohondrijska DNA

Mentor: doc. dr. sc. Ivana Maguire

Suvoditelj: doc. dr. sc. Damjan Franjević

Ocjenjivači: doc. dr. sc. Ivana Maguire, prof. dr. sc. Božena Mitić, doc. dr. sc. Zdravko Dolenc

Zamjena: prof. dr. sc. Mirjana Kalafatić

Rad prihvaćen: 11.11.2009.



University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

GRADUATION THESIS

Phylogeny of *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858) based on the analysis of 16S and COI mitochondrial DNA markers

MOMIR FUTO

Faculty of Science
Department of Biology
Division of Zoology
Rooseveltova trg 6
Zagreb

Phylogenetic relations within populations of *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858) are yet not fully understood. Recent research reveals a possible existence of species-complex, that is, a multiple taxa existence within a single species that is today known as *Austropotamobius pallipes*. The aim of this study is to verify that hypothesis and if necessary suggest a differentiation of the species-complex into two separate species. The second intention is to put the Croatian crayfish into the right phylogenetic context.

Phylogenetic relations between 76 *A. pallipes* individuals, sampled from 22 localities in Croatia, Bosnia and Herzegovina and Austria were studied in this graduation thesis. The analysis of *A. pallipes* populations is based on DNA sequence variations of mitochondrial genes for 16S rRNA and COI. The extracted gene sequences were compared with homologous sequences that were used in other studies of this species all over Europe. Phylogenetic studies were carried out using statistical phylogenetic analysis by means of different character state and distance matrix methods.

The results of this research showed that the species-complex *Austropotamobius pallipes* consists of two distinct species and a few subspecies. Also they are a contribution to a better understanding of relations between Croatian and European populations and they specify the time of divergence within population in the Southeast Balkan Peninsula.

Graduation thesis contains: 90 pages, 20 figures, 20 tables, 96 references, the original is written in Croatian language

Thesis is deposited in: Central biological library

Keywords: phylogeny, *Austropotamobius pallipes*, 16S rRNA, COI, mitochondrial DNA

Supervisor: Assist. Prof. Ivana Maguire

Assistant supervisor: Assist. Prof. Damjan Franjević

Reviewers: Assist. Prof. Ivana Maguire, Prof. Božena Mitić, Assist. Prof. Zdravko Dolenc

Substitute reviewer: Prof. Mirjana Kalafatić

Thesis accepted: November 11, 2009

Ovaj diplomski rad izrađen je u **Laboratoriju za molekularnu evoluciju i taksonomiju životinja** Zoologijskog zavoda, Biološkog odsjeka, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu pod voditeljstvom **doc. dr. sc. Ivane Maguire** te suvoditeljstvom **doc. dr. sc. Damjana Franjevića** u sklopu Sveučilišnog diplomskog studija pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem se svojoj mentorici **doc. dr. sc. Ivani Maguire** i svojem suvoditelju **doc. dr. sc. Damjanu Franjeviću** na iskrenoj i svesrdnoj pomoći oko izrade ovog diplomskog rada te što su se uvijek našli tu kada je trebalo. Također, zahvaljujem **izv. prof. dr. sc. Göranu Klobučaru** za vrijedne sugestije te **dipl. ing. Mateju Faleru** zbog pomoći oko terenskog dijela istraživanja. I na posljetku, hvala tebi tata što zbog tebe jednom davno zavoljeh prirodu i hvala tebi mama što zbog tebe danas postajem biolog.

I. UVOD

Proučavajući povijesne dokumente, na prve pisane tragove o slatkovodnim rakovima nailazimo već prije nekih 2300 godina kada ih spominje Aristotel u svojim djelima. Carl von Linné ih u sedamnaestom stoljeću smatra kukcima neprikladnim za prehranu (Westman, 1911). Da je Linné jednim dijelom bio u krivu, potvrđuju mnogi dokazi, kako pisani tako i oni prenošeni s koljena na koljeno širom Europe. Još od Srednjeg vijeka pa sve do danas, slatkovodni rakovi igraju važnu ulogu u gastronomskim, ali i kulturološkim te socijalnim aspektima europske povijesti. Šireći se, kao prehrambeni proizvodi, po samostanima, ali i po dvorovima, rakovi postaju važan dio prehrane među aristokracijom, ali i sirotinjom Srednjeg vijeka. Danas ovi rakovi posebno mjesto zauzimaju na jelovnicima skandinavskih naroda. Osim prehrane, slatkovodni rakovi te

njihovi pojedini dijelovi tijela, osobito „račje oči” odnosno gastroliti, bili su posebno cijenjeni u pučkoj medicini stoljećima (Swahn, 2004).

Interes za slatkovodne rakove kao predmet bioloških, znanstvenih proučavanja započeo je 1879. godine kada je Huxley objavio prvo izdanje knjige „The crayfish – An introduction to the study of zoology”. Od tada služe kao modelni organizam u zoološkim istraživanjima. Odigrali su ključnu ulogu, primjerice, u istraživanju vida te neuralnoj fiziologiji (Edwards i sur., 1999), dok njihova bitna uloga u molekularnoj evoluciji i ekologiji raste iz dana u dan.

U proteklih 150 godina, veliki utjecaj na pojedine vrste slatkovodnih rakova ima ubrzano širenje ljudske populacije koje je povezano s napretkom tehnologije i fizičkim mijenjanjem prirodnih vodotokova. Osim izravnih antropogenih faktora, na status ovih životinja u fauni Europe, pa samim tim i u fauni Hrvatske, u velikoj mjeri utječu razne bolesti specifične ovim životinjama koje su na europski kontinent unešene zajedno sa vrstama iz Sjeverne Amerike. Danas su ovi rakovi globalno poznati i sve se više zna o njihovoj ekološkoj ulozi u funkcioniranju i bioraznolikosti slatkovodnih ekosistema.

Evolucija slatkovodnih rakova i prelazak iz slane u slatku vodu odvijao se tijekom Perma, prije otprilike 265 milijuna godina. Najstariji poznati predstavnik porodice Astacidae datira iz razdoblja Jure prije 145 do 200 milijuna godina, a najstariji nalaz roda *Austropotamobius* datira iz razdoblja Krede prije 65,5 do 145 milijuna godina (Souty-Grosset i sur., 2006). Zbog činjenice da slatkovodni rakovi općenito slabo podnose povišeni salinitet, njihovo globalno rasprostranjivanje moralo se odvijati dok su kontinenti bili spojeni u jednu cjelinu. Za razumijevanje rasprostranjivanja širom Europe, u obzir se moraju uzeti geološki događaji koji su se odvijali tijekom Paleogena i Neogena, i to: odvajanje Europe i Sjeverne Amerike, povlačenje Turgaškog mora i spajanje Azije s Europom, presušivanje Mediterana (Mesinska kriza), ciklusi ledenih doba, ponovno naseljavanje poslije ledenih doba i na posljetku antropogeni utjecaji. Najjači utjecaj na današnju rasprostranjenost imala su ledena doba, ali njihov točan utjecaj na rasprostranjivanje nije u potpunosti poznat zbog male količine fosilnih dokaza. Upravo taj problem moderna znanost nastoji riješiti kroz molekularna te filogenetska istraživanja.

Određivanje filogenije neke vrste te njena genetička identifikacija ključni su koraci za uspjeh u očuvanju te vrste. U današnje vrijeme zbog povećanog gubitka i degradacije slatkovodnih staništa diljem svijeta, očuvanje slatkovodnih vrsta postaje prioritet (Erwin, 1991). Genetička varijabilnost je naširoko priznata kao komponenta prirodne biološke raznolikosti, te ju štiti nekoliko međunarodnih konvencija i zakona

(Mills i Soluè, 1992). Filogenetska je analiza odlična metoda za otkrivanje procesa koji utječu na genetički sastav neke vrste. Pomoću nje se mogu razotkriti povijesni događaji, poput fragmentacija staništa, koji su imali utjecaj na strukturu populacije neke vrste ili su uzrok njene specijacije. Na kraju, zahvaljujući molekularno-biološkim tehnikama, filogeografske studije nam omogućuju otkrivanje evolucijski bitnih jedinica (Evolutionary Significant Units (ESU)), tj. onih populacija koje su recipročno monofiletske za mitohondrijsku DNA koja pokazuje bitnu divergenciju u frekvenciji alela kod nuklearnih lokusa (Moritz, 1994).

Taksonomske revizije slatkovodnih rakova Europe predmet su brojnih taksonomskih istraživanja koja se tijekom godina provode među astakolozima. U novije vrijeme odgovori na to pitanje pokušavaju se dati uz korištenje modernih molekularno bioloških tehnika. Ta se istraživanja uglavnom provode na mitohondrijskoj DNA, a posebno su zanimljivi 16S rRNA i COI geni.

Jedan od novijih primjena korištenja molekularno filogenetskih metoda u astakologiji je istraživanje koje je proveo Iaconelli (2001), a koje otkriva da u vrste *Austropotamobius pallipes* podjedinica I mitohondrijske citokrom-oksidge (COI) pokazuje veću varijabilnost od sekvenci 16S rRNA. Verovnik i sur. (2005) pokazali su veliki značaj COI genskih sekvenci za filogeografsku analizu kod još jednog europskog slatkovodnog raka, vrste *Asellus aquaticus*. Gen COI se dakle smatra dobrim biljegom za istraživanje genealogije i geografske rasprostranjenosti mitohondrijskih DNA haplotipova roda *Austropotamobius*. Što se tiče gena za 16S rRNA, on se zbog svojih karakteristika, o kojima će biti riječi u nastavku ovog rada, također pokazao vrlo korisnim u proučavanjima filogenije različitih rodova deseteronožnih rakova što potvrđuju brojna istraživanja (Ovendon i sur., 1997; Tam i Kornfield, 1998; Crandall i sur., 1999; Tong i sur., 2000; Grandjean i sur., 2000; Franjević, 2006).

Stoga i ovaj rad teži postati doprinosom u rasvjetljavanju filogenetskih tajni vrste *Austropotamobius pallipes* kroz istraživanje sekvenci mitohondrijskih gena koji kodiraju 16S rRNA i podjedinicu I citokrom-oksidge, COI. Poseban naglasak bit će stavljen na populacije koje naseljavaju vode dinaridskog krša te njihov odnos prema nekim drugim europskim populacijama.

1. LITERATURNI PREGLED

1.1. Porodica Astacidae

Porodica Astacidae jedina je porodica unutar podreda Pleocyemata čiji su pripadnici autohtoni na euroazijskom kontinentu, zapadno od Urala (Holdich, 2002). Porodica Astacidae u Europi je zastupljena s dva roda: *Austropotamobius* i *Astacus*, te pet vrsta: *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858) - bjelonogi rak, *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803) - potočni rak ili rak kamenjar, *Astacus astacus* (Linnaeus, 1758) - riječni ili plemeniti rak, *Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823 - uskoškari, turski ili barski rak i *Astacus pachypus* (Rathke, 1837). To su jedine autohtone europske vrste. Njihova je brojnost u stalnom opadanju, a kao glavni razlozi toga smatraju se: bolesti kao npr. račja kuga, unos kompetitivnih alohtonih vrsta, gubitak prirodnih staništa, velika opterećenost prirodnih staništa otpadnim vodama i nekontrolirani izlov. Krajem 19. stoljeća zbog gospodarskog uzgoja su na europski kontinent unesene američke vrste *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852), *Oroconectes limosus* (Rafinesque, 1817) i *Procambarus clarkii* (Girard, 1852). U to vrijeme nije bilo poznato da navedene unešene vrste prenose gljivicu *Aphanomyces astaci* koja je uzročnik bolesti račje kuge, a na koju su same unešene vrste otporne. Na taj se način bolest vrlo brzo proširila među autohtonim rakovima po cijeloj Europi (Holdich i sur., 1995; Rogers i Holdich, 1995; Peay i Rogers, 1999). Osim toga američke vrste su se pokazale izuzetno invazivnim, te su usljed ekološke kompeticije djelomično istisnule autohtone europske vrste iz njihovih staništa. Zbog navedenih prijetnji opstanku europskih vrsta, *Austropotamobius pallipes*, *Austropotamobius torrentium* i *Astacus astacus* uvršteni su na IUCN-ovu Crvenu listu ugroženih vrsta. Svrstani su u kategoriju rizičnih vrsta (VU – vulnerable, B2bce+3bcd) što znači da nisu kritično ugroženi, ali postoji visoki rizik od izumiranja u ne tako dalekoj budućnosti. Rizik postoji zbog smanjivanja i promjenjivosti površine njihovog areala, kao i brojnosti subpopulacija i spolno zrelih jedinki. U Hrvatskoj su vrste *Astacus astacus*, *Austropotamobius pallipes* i *A. torrentium* zaštićene Zakonom o zaštiti prirode (NN 70/05; NN 139/08) što znači da ih se ne smije loviti niti uznemirivati, a za svako znanstveno proučavanje potrebno je pribaviti posebnu dozvolu Ministarstva kulture. Sve tri vrste uvrštene su u apendiks br. III Bernske konvencije po kojem je njihovo

iskorištavanje pod strogom kontrolom i nadzorom svake države, a vrste *Austropotamobius pallipes* i *A. torrentium* s uvrštene su i u Direktivu o staništima Europske unije.

1.2. Sistematski položaj vrste *Austropotamobius pallipes*

Sistematski položaj vrste *Austropotamobius pallipes* pojavljuje se kao tema brojnih debata u znanstvenim krugovima već dugi niz godina. Prema danas važećoj sistematici koja se za sada može donekle smatrati konsenzusom među astakolozima, vrsta *A. pallipes* svrstana je u sistematske kategorije kako je prikazano u Tablici 1.

Tablica 1. Sistematski položaj vrste *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858) prema Martin i Davis, 2001.

DOMENA:	Eukaryota – Whittaker & Margulis, 1978
CARSTVO:	Animalia – Linnaeus, 1758
PODCARSTVO:	Eumetazoa – Butschli, 1910
KOLJENO:	Arthropoda – Latreille, 1829
POTKOLJENO:	Crustacea – Brännich, 1772
RAZRED:	Malacostraca – Latreille, 1802
PODRAZRED:	Eumalacostraca – Grobben, 1892
NADRED:	Eucarida – Calman, 1904
RED:	Decapoda – Latreille, 1802
PODRED:	Pleocyemata – Burkenroad, 1963
INFRARED:	Astacidea – Latreille, 1802
NATPORODICA:	Astacoidea – Latreille, 1802
PORODICA:	Astacidae – Latreille, 1802
ROD:	<i>Austropotamobius</i> – Skorikow, 1908
VRSTA:	<i>Austropotamobius pallipes</i> (Lereboullet, 1858)

Slatkovodni rakovi Europe bili su predmetom brojnih taksonomskih revizija tijekom godina i u najjednostavnijim slučajevima bili su svrstani u jedan rod (*Astacus*) sa pet vrsta (Albrecht, 1983), a u najsloženijim slučajevima u pet rodova sa 19 vrsta (Starobogatov, 1995). Unutar roda *Austropotamobius* danas svrstavamo dvije vrste: *Austropotamobius pallipes* i *Austropotamobius torrentium* te se rasprave o intra i interspecijskim odnosima u taksonomiji ovih vrsta i dalje vode. Brojni autori predlažu da se obje vrste roda *Austropotamobius* smatraju kompleksima (Grandjean i sur., 2002; Barić i sur. 2005; Trontelj i sur., 2005).

1.3. **Filogenetski status vrste *Austropotamobius pallipes***

Od svih europskih slatkovodnih rakova, rod *Austropotamobius* vjerojatno je najistraživaniji rod i to zahvaljujući svojoj širokoj rasprostranjenosti. Filogenetski status i taksonomija unutar ovog roda i dalje su predmet debata usprkos sve brojnijim istraživanjima na tom polju (Grandjean i sur., 1998, 2002; Fratini i sur., 2005). Danas veliki broj astakologa rod *Austropotamobius* smatra rodom sa dvije vrste, *A. pallipes* i *A. torrentium* sa ukupno šest podvrsta. Današnji status kompleksa vrste *Austropotamobius pallipes* u protekloj dekadi sve češće biva osporavan i sve je više dokaza za to da se unutar tog kompleksa nalaze dva morfološki i genetički razdvojena taksona, *pallipes* i *italicus*. Znanstveni argumenti za podizanje taksona *italicus* na razinu vrste temelje se na molekularnim (alozimi i mtDNA) i morfološkim podacima (Karaman, 1961; Grandjean i sur., 2002; Fratini i sur., 2005). Iskustvo je pokazalo da kombinacija istraživanja na mtDNA te usporedne morfološke analize daju najbolje odgovore na slična pitanja.

Skupine *pallipes* i *italicus* razlikuju se međusobno oko 4% na razini 16S rRNA markera (3,6 do 5,4%). Koristeći konzervativnu mitohondrijsku kalibraciju od 2% divergencije sekvenci po milijun godina (Wilson i sur., 1985), taj podatak ukazuje na to da su skupine *pallipes* i *italicus* morale biti međusobno izolirane oko 2,5 milijuna godina. Kada analiziramo i usporedimo podatke drugih istraživanja na slatkovodnim rakovima kod kojih je isti marker bio korišten, ta otprilike 5%-tna divergencija ukazuje na diferencijaciju na razini vrste (Grandjean i sur., 2002). Odvojeni status vrsta *Austropotamobius pallipes* i *Austropotamobius italicus* prvobitno je predložen od strane Grandjean i sur. (2002), mada već i Karaman (1961) rakove Balkanskog poluotoka naziva

vrstom *A. italicus* i čak ih dijeli u nekoliko podvrsta (*Austropotamobius italicus carsicus*, *Austropotamobius italicus italicus*), doduše samo na razini razlike u morfološkim karakteristikama.

Istraživanja na alozimima su pokazala da je razlika između takosona *pallipes* i *italicus* relativno velika (Santucci i sur., 1997; Lörtscher i sur., 1997). Dobivene vrijednosti u ovim istraživanjima su na intra/interspecijskoj granici raspoznavanja nekog taksona kao zasebne vrste. Nadalje, Santucci i sur. (1997) su dokazali nedostatak tzv. F1 hibrida na simpatičkim područjima areala ova dva taksona, što ukazuje i na njihovu reproduktivnu izolaciju u prirodi.

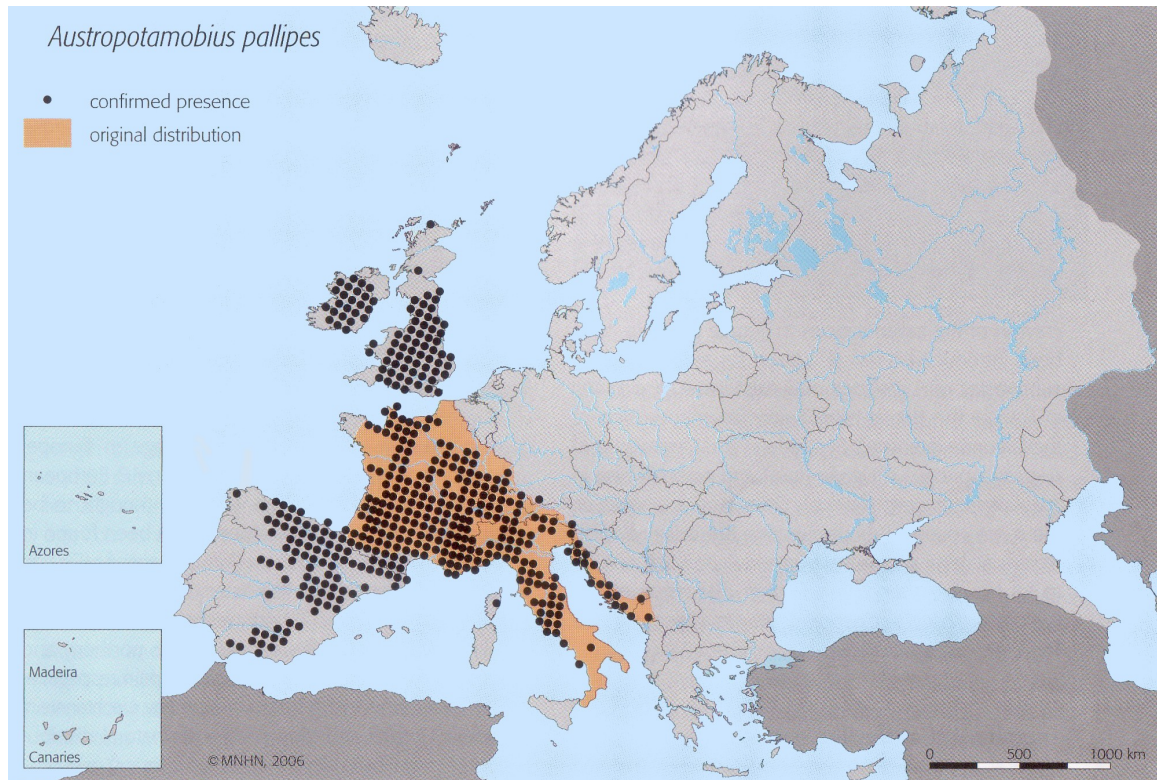
Što se morfoloških kriterija tiče, Laurent i Sussillon (1962) te Grandjean i sur. (1998) su pokazali da je A/R odnos (duljina od apeksa do rostruma) kod populacija uzorkovanih u Francuskoj i Engleskoj iznosila prosječno 0,22, dok je ta vrijednost kod balkanskih populacija te populacija u Italiji i Španjolskoj iznosila 0,29. Nadalje, broj trnova iza cervikalne brazde također je pružio potkrepu diferencijaciji na dvije odvojene morfološke skupine (Laurent i Sussillon, 1962; Albrecht, 1982; Grandjean i sur., 1998). Jedinke taksona *pallipes* imaju značajno veći broj trnova (u prosjeku 2,8) od taksona *italicus* (u prosjeku 1).

Ipak, druga, slična istraživanja pokazuju da se kod takosona *italicus*, ovisno o populaciji, može javiti i značajno veći broj trnova na merusu trećeg maksilipeda. Karaman (1961) navodi od 3 – 7 trnova na merusu trećeg maksilipeda i dodaje da su kod sjevernih dinaridskih populacija ovi trnovi veći i dolaze u većem broju nego kod južnih populacija, kod kojih su oni manji te dolaze u manjem broju. Maguire i sur. (2003) ne potvrđuju ovo u svojem istraživanju, te sve to upućuje na činjenicu da se samo broj i veličina trnova trećeg maksilipeda ne bi smjeli koristiti kao striktno determinacijsko svojstvo pri izdizanju taksona *italicus* na razinu vrste.

1.4. Distribucija vrste *Austropotamobius pallipes*

S prikaza rasprostranjenosti (Slika 1.) vidljivo je da je *Austropotamobius pallipes* široko rasprostranjena vrsta. Nalazi se u 18 europskih država i prirodno se rasprostire na tri glavna geografska područja u Europi. Prvu skupinu čini južni dio Europe odnosno dijelovi Pirinejskog poluotoka u Španjolskoj, južna Francuska, Švicarska te Apeninski

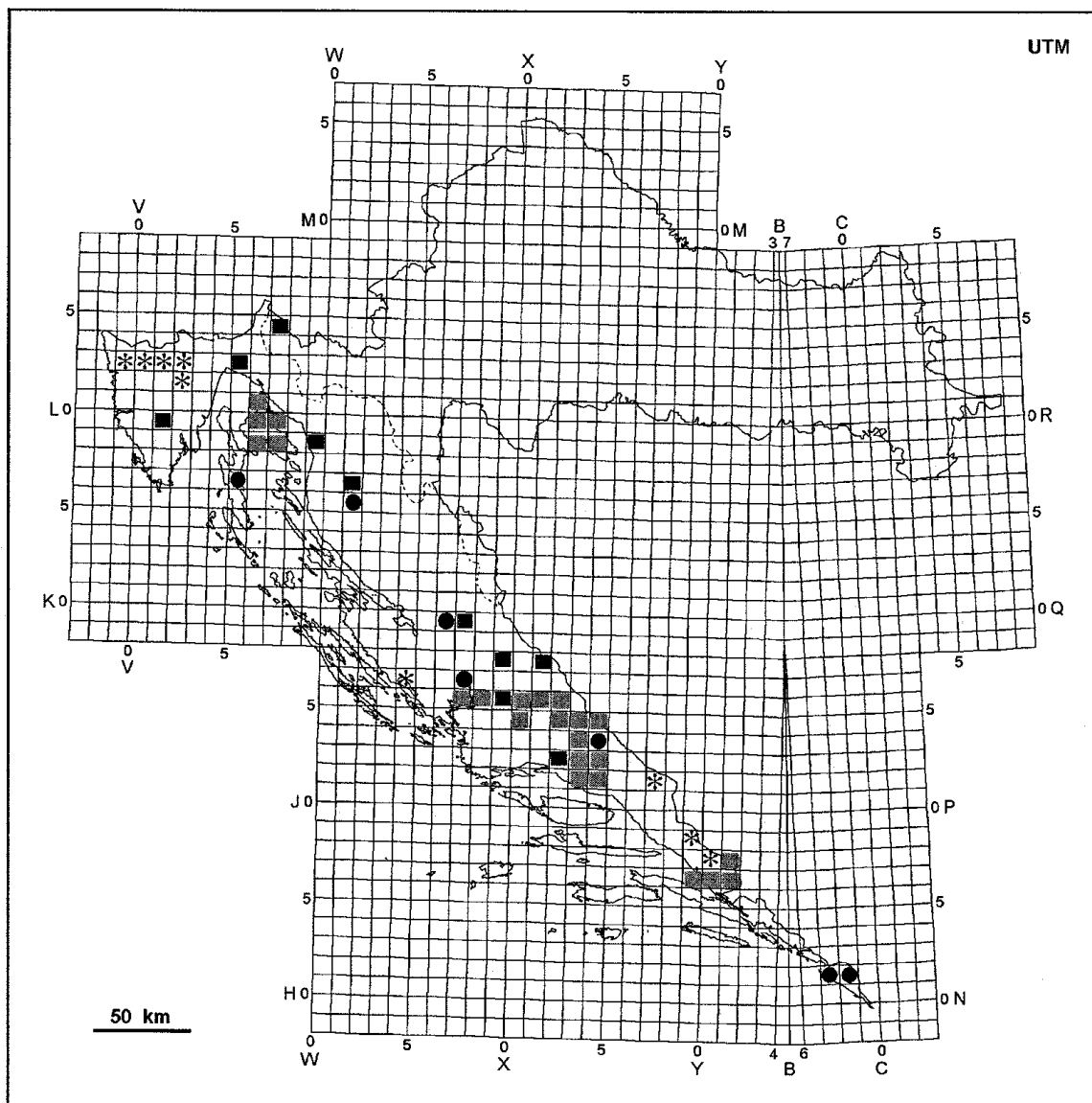
poluotok, druga skupinu, ujedno i najsjeverniju čini sjeverna Francuska i Velika Britanija te Irska i treću, najmanju skupinu čine uglavnom zemlje uz istočnu obalu Jadranskog mora, odnosno Slovenija, Hrvatska, Bosna i Hercegovina te Crna Gora.



Slika 1. Rasprostranjenost vrste *Austropotamobius pallipes* prema (Souty-Grosset i sur., 2006). Crne točkice označavaju potvrđene nalaze, a narančastom bojom prikazan je prvobitni areal rasprostranjenja vrste. Na mjestima gdje se nalaze crne točkice bez narančaste podloge, vrsta je antropogeno proširena.

Smatra se da je zapadna granica prostiranja vrste do nedavno bio Portugal, mada se u posljednje vrijeme čini da je tamo izumrla. 2004. godine po prvi put nisu pronađeni nalazi u koritu rijeke Angueira, sjeverni Portugal, tako da danas zapadnom granicom smatramo Španjolsku. Istočnu granicu predstavlja Crna Gora, rijeka Zeta, što ukazuje na nekadašnju hidrografsku povezanost rijeke Cetine u Hrvatskoj i rijeke Zete u Crnoj Gori (Souty-Grosset i sur., 2006). Sjevernu granicu rasprostranjenosti predstavljaju vodotokovi u Škotskoj, dok se južnom granicom smatraju nalazišta u Španjolskoj, iako postoje sporadični nalazi i u južnoj Italiji. Prirodnu rasprostranjenost vrste dodatno komplicira činjenica da je na mnogim mjestima ova vrsta raka rasprostranjena putem čovjeka. Za nalaze u Austriji, Engleskoj, Irskoj, Portugalu te zapadnoj Španjolskoj se u velikoj mjeri sumnja da su introducirani umjetnim putem, dok je za nalaze u Lihtenštajnu, Škotskoj i na Korzici to može reći s vrlo velikom sigurnošću.

Što se tiče rasprostranjenosti u Hrvatskoj, evidentno je da vrsta *Austropotamobius pallipes* nastanjuje vodotokove isključivo jadranskog sliva (Maguire i sur., 2003; Maguire i Gottstein, 2004) te da u crnomorskom slivu nije prisutna (Slika 2.). Istra, Kvarner, Dalmacija i dalmatinska Zagora te Dubrovačko zaleđe čine okosnicu rasprostranjenosti vrste u Hrvatskoj. To su većinom krška staništa, čistih, nezagađenih vodotokova s kompleksnim hidro-geografskim strukturama. Rakovi koji su predmet ovog istraživanja naseljavaju uglavnom lentička staništa s nešto sporijim tokom vode uz obale samih vodotokova.



Slika 2. Rasprostranjenost vrste *Austropotamobius pallipes* u Hrvatskoj na osnovi terenskog istraživanja, (crna zvjezdica), te iz literaturnih podataka i muzejskih uzoraka. Crni kvadratići označavaju točne lokacije opisane u povijesnim literaturnim navodima, sivi kvadratići označavaju literaturne navode koji ne daju točne lokalitete, crni kružići predstavljaju lokalitete preklapanja povijesnih literaturnih navoda te provedenog terenskog istraživanja. Isprekidana crta prikazuje granicu jadranskog i crnomorskog sliva. Stranice svakog kvadratića predstavljaju 10km. Crni kvadratić u kvadrantu sjeveroistočno od crte razgraničenja dva sliva predstavlja literaturni podatak koji je krivo bio determiniran kao *A. pallipes*, zapravo je vrsta *A. torrentium*. Preuzeto iz (Maguire i sur., 2003).

1.5. Biologija i ekologija vrste *Austropotamobius pallipes*

Vrsta *Austropotamobius pallipes* spada u deseteronožne rakove karakteristične građe, kao što je prikazano na Slici 3. Ti rakovi imaju čvrsti glavopršnjak koji je leđno srastao s glavom sa svih 8 pereomera. Postrani rubovi pereomera su slobodni te kao škržni pokrovi zatvaraju sa strane prostranu škržnu šupljinu. Na prednjem dijelu, glavopršnjak se produljuje u jači i dulji glavin šiljak, tzv. rostrum koji je kod ove vrste varijabilan s obzirom na duljinu. Oči se kod ove vrste nalaze na pokretnim drščima. Karakteristična su dva para bičeva na svakoj antenuli koji sadrže mnogobrojne osjetilne stanice. Antene imaju vrlo dugačak bič. Posljednji pereomerni sternit kod ove vrste je slobodno pokretan. Epistom ima oblik trokutaste pločice. Pleopodiji 6. kolutića su povećani i prošireni u uropodije. Uropodi skupa s telsonom čine repnu lepezu. Od pet pari pereopoda, samo četiri služe za hodanje. Prvi par ima razvijena kliješta koja služe za obranu i za hvatanje plijena. Determinacijski bitne značajke ove vrste su slijedeće: posjeduju jedan par postorbitalnih trnova, a iza cervikalne brazde imaju dobro razvijene trnove. Isto tako, ventralni rub stilocerita (egzopod antena) je gladak, bez trnova.



Slika 3. Vanjski izgled vrste *Austropotamobius pallipes* (Fotografija: Mišel Jelić)

Jedinke vrste *Austropotamobius pallipes* mogu živjeti preko deset godina (Souty-Grosset i sur., 2006). Spolnu zrelost ovi rakovi dostižu u pravilu nakon napunjene druge godine života, što uglavnom važi za mužjake te za jedinke koje žive na nešto nižim nadmorskim visinama i geografskim širinama.

S povećanjem nadmorske visine i geografske širine, rakovi spolno sazrijevaju kasnije, između 5. i 6. godine života, kada im minimalna ukupna duljina tijela iznosi uglavnom između 40 i 55 mm. Generalno, parenje nastupa u jesen. Ženke se brinu za oplođena jaja (između 50 i 200) preko zime pa sve do proljeća, kada nastupa izlijeganje. Mladi tijekom prve godine života prolaze kroz niz presvlačenja zbog intenzivnog rasta (njihov broj varira između sedam i osam), dok kod starijih rakova broj presvlačenja opada (u drugoj godini života do pet puta) te se zrele jedinke presvlače svega jednom do dva puta godišnje, ovisno u okolišu u kojem žive.

Vrsta *A. pallipes* dolazi u raznim tipovima slatkovodnih tekućica do 1500 m nadmorske visine, iako se, doduše vrlo rijetko, može pronaći i u stajaćicama. Ovi rakovi preferiraju staništa s obiljem vodenog bilja koje im koristi kao zaklon, mada nisu rijetki slučajevi kada se mogu pronaći i u muljevitim potocima te općenito vodotokovima s vrlo malo vegetacije. Pokazuju visok stupanj tolerancije na fluktuacije u temperaturi vode te u njenoj zasićenosti kisikom.

Kao i većina slatkovodnih rakova, vrsta *A. pallipes* spada u omnivorne životinje. U ispitivanjima prehranbenih navika ovih životinja ustanovljeno je da mlade životinje preferiraju uglavnom hranu životinjskog podrijetla, dok jedinke starije životne dobi pokazuju veću sklonost ka detritusu i potopljenom lišću različitih biljaka. Ipak, karnivorna prehrana se pokazuje kao vrlo bitna u svim stadijima života i neka ispitivanja na populacijama iz Irske pokazuju da bi upravo ova vrsta mogla biti najveći mesojed među svim slatkovodnim rakovima Europe (Souty-Grosset i sur., 2006). Na jelovniku ove vrste nalazi se široka lepeza mikro i makroavertebrata te akvatičkih makrofita. Velike populacije su pronađene u vodama gusto nastanjenim vrstama algi iz roda *Chara* te vrstom *Fontinalis antipyretica* koje predstavljaju glavni izvor hrane rakovima u takvim okolišima.

U načelu, vrsta *A. pallipes* ne koegzistira na istim životnim prostorima s drugim slatkovodnim vrstama rakova. Ipak, postoje dokazi da se sporadično ova vrsta može naći na istim staništima skupa sa vrstama *Astacus astacus* i *Austropotamobius torrentium* (Lachat i Laurent, 1988). Također se spominju staništa s mješovitim populacijama vrste *A. pallipes* i unešene vrste *Pacifastacus lenisculus* i u jednom istraživanju (Souty-Grosset

i sur., 2006) je dokazano da je populacija vrste *A. pallipes* u potpunosti nestala nakon samo pet godina pošto je vrsta *Pacifastacus lenisculus* introducirana, čini se zahvaljujući njenim superiornijim kompetitivnim sposobnostima u odnosu na vrstu *A. pallipes*. Detaljnija istraživanja koja bi to potvrdila još nisu provedena. U drugim slučajevima, ove dvije vrste mogu naseljavati isti vodotok, ali na njegovim različitim dijelovima, bez većih preklapanja areala.

1.6. Filogenija

Filogenija je znanstvena disciplina koja se bavi proučavanjem evolucijske prošlosti različitih taksonomskih kategorija. U svojim istraživanjima filogenija proučava srodstvene odnose između i unutar pojedinih vrsta odnosno taksona. Proučavanje se zasniva na morfološkim, fiziološkim i etološkim obilježjima pojedinih taksona. Osim na makroskopskoj razini, srodstveni inter i intraspecijski odnosi (odnosi između i unutar pojedinih vrsta) mogu se proučavati i na razini makromolekula tj. DNA i proteina. Time se bavi zasebna grana filogenije, tzv. molekularna filogenija. Rezultati istraživanja prikazuju se u obliku filogenetskog stabla odnosno filograma. Za opisivanje stupnjeva srodnosti taksona koje istražuje, filogenija koristi nekoliko mogućih odnosa između njihovih karakteristika. Sinapomorfija je odvedeno stanje koje dijele dva ili više potomaka, a naslijedili su ga od posljednjeg zajedničkog pretka. Pleziomorfija predstavlja ancestralno karakterno stanje koje je prisutno kod zajedničkog pretka taksona koji se istražuje. Seimpleziomorfija je ancestralno karakterno stanje koje dijele dva ili više taksona potomaka. Apomorfija je izvedeno karakterno stanje koje nije prisutno kod zajedničkog pretka taksona koji se istražuje, dok je autapomorfija izvedeno karakterno stanje unikatno za jedan takson. Na posljetku homoplazija predstavlja sličnosti koje su rezultat konvergencije, paralelizma i reverzne evolucije, a nisu rezultat nasljeđivanja od zajedničkog pretka (Tucić, 2003).

1.7. Molekularna evolucija

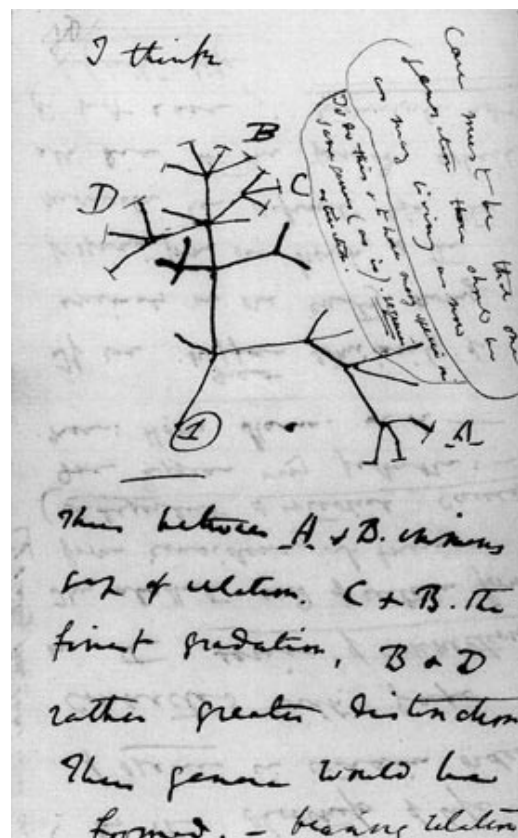
Molekularna evolucija se odvija na razini DNA, RNA i proteina. Kao posebna znanstvena disciplina počela se razvijati 1960. godine sa ciljem boljeg razumijevanja otkrića na području strukture i funkcije nukleinskih kiselina i proteina (Milankov, 2007). Korijen molekularne evolucije nalazi se u tri različite discipline: populacijskoj genetici, molekularnoj biologiji i evolucijskoj biologiji. U svojim istraživanjima ujedinjuje tri područja: prebiotsku evoluciju, evoluciju makromolekula i molekularnu filogeniju. Prebiotska evolucija bavi se proučavanjem razvoja života na Zemlji do pojave prvih organizama s karakteristikama živog bića. Evolucija makromolekula proučava učestalost i načine promjena u DNA sekvencama i proteinima te uzroke i posljedice evolucijskih promjena u tim molekulama dok se molekularna filogenija bavi proučavanjem evolucijske prošlosti organizama i makromolekula na osnovi podataka dobivenih proučavanjima na molekularno-biološkoj razini te njihovom statističkom obradom (Tucić, 2003).

1.7.1. Filogenetska stabla

Prema teoriji biološke evolucije koju je postavio i pomno opisao u svojoj knjizi „On the Origin of Species by Means of Natural Selection or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life” još 1859. godine Charles R. Darwin, a koja do dan danas u svojim vrlo malo izmijenjenim inačicama predstavlja krunu bioloških i općenito prirodoslovnih promišljanja o podrijetlu i raznolikosti organizama na Zemlji, svi oblici života potekli su od jednog zajedničkog pretka. Tako sve današnje oblike života pojmimo međusobno nedvosmisleno povezanim. Organizmi koji imaju mlađeg zajedničkog pretka su srodniji od organizama čiji je zajednički predak stariji. Evolucijski odnosi između grupa organizama ili gena prikazuju se pomoću filogenetskog stabla (Slika 4).

Suvremeno filogenetsko stablo je graf koji prikazuje međusobne evolucijske odnose skupina organizama ili gena. Glavni zadatak filogenetskih istraživanja je rekonstruirati točne genske veze između organizama i odrediti vrijeme divergencije koje je proteklo od kada su ti organizmi dijelili zajedničkog pretka. Svako filogenetsko stablo

sastoji se od čvorova i grana, a način grananja predstavlja topologiju stabla. Čvorovi na filogenetskom stablu predstavljaju taksonomske jedinice koje mogu biti populacije, vrste, jedinice ili geni. Na filogenetskom stablu postoje dva tipa čvorova: vanjski ili krajnji i unutarnji čvorovi. Vanjski čvorovi predstavljaju taksonomske jedinice koje proučavamo, dok unutarnji čvorovi predstavljaju hipotetske zajedničke pretke taksonomskih jedinica koje proučavamo. Ako iz unutarnjeg čvora izlaze dvije linije potomaka, takav čvor je bifurkatni, a ako izlazi više linija potomaka, čvor je multifurkatni.



Slika 4. Prvi nacrt ideje o filogenetskom stablu, kako ga je u svojim bilješkama nacrtao Charles R. Darwin. „*On Transmutation of Species*” svezak B (1837).

Grane ili ogranaci predstavljaju topologiju stabla. Razlikujemo dva tipa ogranaka: vanjske ili periferne i unutarnji ogranke. Vanjski ogranaci završavaju opisanim grupama, dok unutarnji ogranaci povezuju hipotetske pretke. Duljina ogranaka nam govori o trajanju evolucijskih procesa u toj razvojnoj liniji. Što je ogranak dulji, proteklo je više vremena od početka divergencije i nakupilo se više promjena na makromolekulama proučavanog organizama.

Postoje dva osnovna tipa filogenetskih stabala: ukorijenjeno i neukorijenjeno filogenetsko stablo. Kod ukorijenjenih stabala postoji jedinstveni čvor kojeg nazivamo

korijen. On predstavlja pretka svih taksonomskih jedinica koje proučavamo. Za razliku od ukorijenjenih, neukorijenjena filogenetska stabla nam govore o odnosima taksonomskih jedinica koje proučavamo, ali nam ništa ne govore o njihovim precima (Tucić, 2003).

Za ukorjenjivanje filogenetskih stabala koristi se tzv. vanjska grupa. Ona nije član analizirane grupe taksonomskih jedinica, nego je to neka relativno blisko srodna taksonomska jedinica za koju sa sigurnošću možemo reći da se odvojila u evolucijskoj prošlosti ranije od taksonomskih jedinica koje proučavamo. Vanjsku grupu izabiremo proizvoljno vodeći računa da ne bude u predalekoj vezi s ostalim taksonomskim grupama, ali i da ne bude previše srodna s taksonomskim grupama koje proučavamo, jer tada gubi svoju funkciju. Filogenetsko stablo možemo ukorijeniti i bez upotrebe vanjske grupe, pomoću srednje točke. Prilikom toga se polazi od pretpostavke da je učestalost evolucijskih promjena slična za sve promatrane taksonomske jedinice duž stabla. Ukorjenjivanje filogenetskog stabla bitan je proces jer nam omogućava razlikovanje pleziomorfnih (ancestralnih) osobina od apomorfnih (izvedenih) osobina. Vrijeme u evoluciji protječe jednosmjerno i nepovratno, tako da, iako morfologija ponekih vrsta ostaje ista, raznolikost genskih sekvenci kod tih vrsta nedvojbeno se tijekom vremena povećava (Milankov, 2007; Tucić, 2003).

1.7.2. Rekonstrukcija filogenetskog stabla

Kada se promišlja o nekakvom problemu u biologiji nužno je imati na umu riječi velikog rusko-američkog evolucijskog biologa Theodosiusa Dobzhanskog, kako „u biologiji nema ništa smisla ukoliko se ne promatra u svjetlu evolucije”. Prema teoriji evolucije sva živa bića potekla od istog zajedničkog pretka koji je živio prije otprilike 3,8 milijardi godina. Zbog dugotrajnih evolucijskih procesa, nekada srodni geni tijekom vremena postali su toliko različiti da pomoću njih ne možemo izvršiti pouzdanu filogenetsku rekonstrukciju. Za takve gene kažemo da su nehomologni. Velika sličnost nekih nehomolognih gena posljedica je sličnih evolucijskih procesa tj. sličnog selekcijskog pritiska, što dovodi do konvergentne ili paralelne evolucije. U konvergentnoj evoluciji, filogenetski daleko srodni organizmi, kao posljedicu na adaptaciju sličnim okolišima u kojima žive mogu pokazivati niz sličnih osobina, kako na morfološkoj, tako i na molekularnoj razini (Kalafatić, 1998). Osim toga veća sličnost sekvenci od očekivane

može se pojaviti i zbog povratnih mutacija, višestrukih mutacija na jednom lokusu ili paralelnih supstitucija.

Geni usko srodnih vrsta zovu se homologni geni i obično se razlikuju samo u točkastim mutacijama koje su najčešće na poziciji trećeg kodona. Iz toga proizlazi činjenica da treća pozicija na kodonu ima bržu evolucijsku stopu od prve i druge pozicije i iz tog razloga ima veće značenje u filogenetskim istraživanjima. Mutacijska stopa je kod nukleotidnih sekvenci i proteina različita. Nukleotidne sekvence mutiraju brže, pa su bolje za određivanje evolucijskih odnosa među srodnim vrstama, dok su proteinske sekvence bolje za utvrđivanje srodstvenih odnosa na višim sistematskim kategorijama (Hall, 2001).

Za opisivanje filogenetskih odnosa između pojedinih taksonomskih jedinica filogenetskog stabla upotrebljavaju se razni pojmovi. Monofiletska grupa npr. predstavlja onu skupinu u kojoj su svi članovi porijeklom od jednog zajedničkog pretka koji je karakterističan isključivo za tu grupu. U sistematici takve monofiletske grupe zovemo kladi. Parofiletska grupa je ona u kojoj se nalaze i članovi koji nisu porijeklom od najmlađeg zajedničkog pretka. Te grupe karakterizira pleziomorfija. Polifiletska grupa je ona kod koje su vrste porijeklom od više zajedničkih predaka koji su i precima vrstama klasificiranim u druge grupe. Ona je rezultat pogrešne upotrebe homoplazijskih karakteristika pri izradi filogenetskih stabala (Milankov, 2007).

1.7.3. Metode molekularne filogenije

Za rekonstrukcije filogenetskih stabala ne postoji jedinstvena metoda koja bi bila prihvatljiva u svim slučajevima niti najbolja metoda za pojedini slučaj. Umjesto toga koristi se nekoliko različitih metoda i pristupa u filogenetskoj rekonstrukciji kako bi se povećala vjerodostojnost dobivenih rezultata. Metode filogenetske rekonstrukcije možemo podijeliti u četiri glavne grupe. Prvu grupu čine metode bazirane na matrici udaljenosti (eng. *Distance Matrix*) i koriste se za rekonstrukciju stabala na principu analize klastera i minimalne evolucije. „Klasteriranjem” se traži najmanja međusobna razlika između dva člana u matrici udaljenosti i to stablo se daje kao najvjerojatnije. Drugu skupinu čini metoda najveće vjerojatnosti (Maximum likelihood - ML) (Felsenstein, 1973; 1981) koja predstavlja kompleksnu i računalno zahtjevnu metodu.

Algoritam najveće vjerojatnosti proučava vjerojatnost pojavljivanja svake moguće nukleotidne pozicije (baze) ili aminokiseline u ancestralnom (unutarnjem) čvoru i rekonstruira vjerojatnost strukture stabla iz tih vjerojatnosti. Na posljetku, izabire se stablo koje je najvjerojatnije. Trećoj skupini pripada metode najveće štedljivosti (Maximum parsimony - MP) (Swoford, 2001). Ova metoda bazira se na filozofskom principu poznatom kao Okamova oštrica koji pretpostavlja da se, kada se neki fenomen želi objasniti putem dvije ili više hipoteza, kao najbolja hipoteza uzima ona koja je i najjednostavnija. Ova metoda nastoji pronaći filogenetsko stablo takve topologije da je za njegovo objašnjenje potreban najmanji mogući broj promjena karaktera tj. mutacija i nastoji rekonstruirati stablo primjenjujući najmanji broj promjena karaktera kako bi se objasnili svi čvorovi. Dvije najveće kvalitete Bayesian analize (BA) (Mau i sur., 1999), pripadnice četvrte skupine, pored ostalih sličnih tipova analiza, a prije svega u odnosu na analizu metodom najveće vjerojatnosti, leže u sposobnosti algoritma da traži grupe najboljih stabala, a ne jedno najbolje stablo, kao i u mogućnosti izmjene informacija tijekom analize među više neovisnih potraga za najboljom grupom stabala. Bayesian analiza je također i analiza koja je bazirana na stanju karaktera, dakle inkorporira svaki ostatak u sravnjenju u filogenetsku analizu. Kod kodirajućih sekvenci skup naredbi dodatno omogućuje vaganje prve, druge i treće pozicije u kodonskom tripletu.

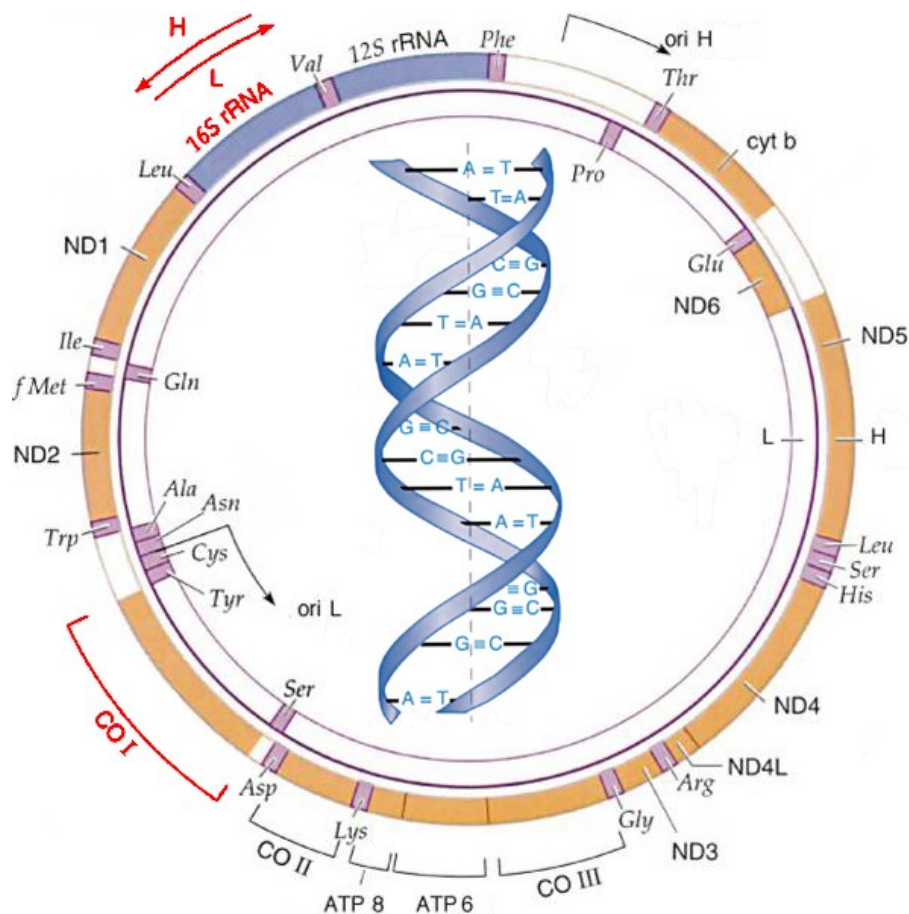
1.8. Mitohondrijska DNA

Mitohondriji su elipsoidni stanični organeli dužine oko 0,5 μm i širine 0,2 μm . Eukariotska stanica sadrži od nekoliko stotina do nekoliko tisuća mitohondrija, svaki sa nekoliko kopija vlastite DNA. Zbog lakoće izolacije, velikog broja kopija, nepostojanja genske rekombinacije, nasljeđivanja isključivo po majčinoj liniji te relativno brze evolucije u odnosu na jezgrinu DNA, mitohondrijska DNA (mtDNA) se često koristi za određivanje filogenetskih odnosa na različitim taksonomskim razinama (Simon i sur., 1994; Schubart i sur., 2000).

Smatra se da su mitohondriji nekada bili slobodno živuće bakterije koje su stupile u endosimbiotski odnos s drugim prokariotskim stanicama dajući pretka današnje eukariotske stanice. Te novonastale stanice koje su imale formiranu jezgru pružale su mitohondrijima okruženje bogato nutrijentima, a za uzvrat su od mitohondrija dobile

način za stvaranje energije posredstvom kisika, tzv. oksidativna fosforilacija. To svojstvo se pokazalo ključnim za preživljavanje tih stanica u novonastaloj oksidirajućoj atmosferi. Kasnije dolazi do redukcije genoma mitohondrija zbog premještanja pojedinih gena iz mitohondrija u jezgru.

Osim što su sličnih dimenzija prokariotska i mtDNA imaju još niz zajedničkih osobina. Mitohondrijska DNA najčešće je kružna dvolančana molekula koja se sastoji od 14 do 42 tisuće parova baza (Slika 5.). Kružni oblik molekule je prvi mehanizam koji je pružio zaštitu od egz nukleaza koje razgrađuju slobodne krajeve linearnih DNA molekula. Mitohondrijski genom ima vrlo malo nekodirajuće DNA, geni su gusto zbijeni s vrlo malo introna unutar samih gena. Mitohondrijske DNA iz životinjskih stanica kodiraju 13 proteinskih molekula, 22 molekule transportne RNA i 2 molekule ribosomalne RNA (16S rRNA i 12S rRNA). Iako geni zauzimaju većinu mitohondrijskog genoma, ipak postoji nekodirajuća regija veličine od oko 1200 parova baza tzv. d-Loop ili kontrolna regija koja se nalazi s obje strane dogovorene „0“ pozicije. U toj regiji se nalaze signali koji kontroliraju sintezu RNA i DNA molekule. Zbog toga što akumulira točkaste mutacije 10 puta više nego jezgrina DNA, mtDNA se naziva još i hipervarijabilna regija.



Slika 5. Shematski prikaz molekule mtDNA; crvenom bojom obilježeni su geni za COI i 16S rRNA.

1.8.1. Mitohondrijski gen za 16S rRNA

Gen za 16S rRNA se nalazi na mitohondrijskoj DNA, a kodira RNA velike podjedinice mitohondrijskih ribosoma. Veličina mu iznosi 1542 para baza, te je konzerviran u primarnoj strukturi, što znači da se nije puno mijenjao tijekom evolucijske prošlosti mtDNA. Sekvence iz regije 16S rRNA mitohondrijskog gena pokazale su se iznimno korisnim prilikom proučavanja filogenetskih odnosa kod rodova deseteronožnih rakova (Tam i sur., 1998; Grandjean i sur., 2000; Largiadèr i sur., 2000; Fratini i sur., 2005; Franjević, 2006). Upotrebom gena za 16S rRNA, za razliku od gena za COI, dobivaju se posebno kvalitetni podaci kod rekonstrukcije događaja filogenetske prošlosti nekog taksona koje su se odigrale u relativno davnoj evolutivnoj prošlosti. 16S rRNA gen ima brzo i sporo evoluirajuće regije i mnogo korisnih informacija o filogenetskim odnosima između organizama različitog sistematskog ranga, od razine populacije do razine porodice. Ovaj gen za rRNA često se upotrebljava u molekularno filogenetskim istraživanjima, usprkos tome što se značajan broj različitih gena nalazi i u sastavu jezgrine DNA. Razlog je to što je za razliku od jezgrinih gena, mitohondrijski gen za rRNA mnogo jednostavnije građe i nalazi se samo u jednoj kopiji u genomu. Osim toga jezgrina rRNA evoluira mehanizmom usklađene evolucije, što znači da se supstitucija u jednoj kopiji brzo širi na ostale, te dovodi do znatnih problema u filogenetskim istraživanjima i ponekad navodi na krive zaključke o filogeniji pojedinih organizama (Hanckok i sur., 1988; Hillis i Dixon, 1991).

1.8.2. Mitohondrijski gen za podjedinicu I citokrom-oksidge, COI

Gen za citokrom-oksidge I se nalazi također na mitohondrijskoj DNA, a kodira podjedinicu I kompleksa citokrom-oksidge *c* koja je dio elektronskog transportnog lanca u procesu oksidativne fosforilacije. Njegova aminokiselinska sekvenca je visoko konzervirana među koljenima što omogućava jednostavno sravnjivanje sekvenci i izradu univerzalnih početnica. Zbog visoke konzerviranosti, aminokiselinske supstitucije su rijetke među vrstama, ali tihe (istoznačne) promjene imaju jednaku učestalost kao i u svim ostalim genima mitohondrijske DNA. Aminokiselinske sekvence citokrom-oksidge I korisne su za istraživanje puno davnijih evolucijskih događaja, odnosno onih koji su se

dogodili prije događaja koje ispituje pomoću gena za 16S rRNA. Ovaj gen se smatra jednim od najkorisnijih molekularno-filogenetskih biljega iz nekoliko razloga. Kao terminalni katalizator u mitohondrijskom respiratornom lancu, citokrom-oksidaza I je dobro biokemijski istražena te je zaključeno da je njena veličina i struktura sačuvana kod svih aerobnih organizama (Sarastre, 1990). Budući da je citokrom-oksidaza I uključena i u prijenos elektrona i translokaciju protona kroz membranu, poznato je da sadrži velik broj različitih funkcionalnih domena (Gennis, 1992). Druga bitna karakteristika ovog gena kao filogenetskog biljega je da kodira najveću od tri proteinske podjedinice kompleksa citokrom-oksidaze *c*. Citokrom-oksidaza I veličine je približno 511 aminokiselina za razliku od svega 228 aminokiselina kod citokrom-oksidaze II ili 261 aminokiselina kod citokrom-oksidaze III (Clary i Wolstenholme, 1985). Time je omogućena amplifikacija i sekvenciranje puno većeg broja nukleotida unutar istog funkcionalnog kompleksa što je izuzetna prednost u filogenetskim istraživanjima. Prednosti gena za COI prepoznali su mnogi istraživači koji se bave problematikom filogenije rakova (Utevsky i Trontelj, 2004; Zaccara, 2005; Trontelj i sur., 2005; Verovnik i sur., 2005; Franjević, 2006).

II. CILJ ISTRAŽIVANJA

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja su sljedeći:

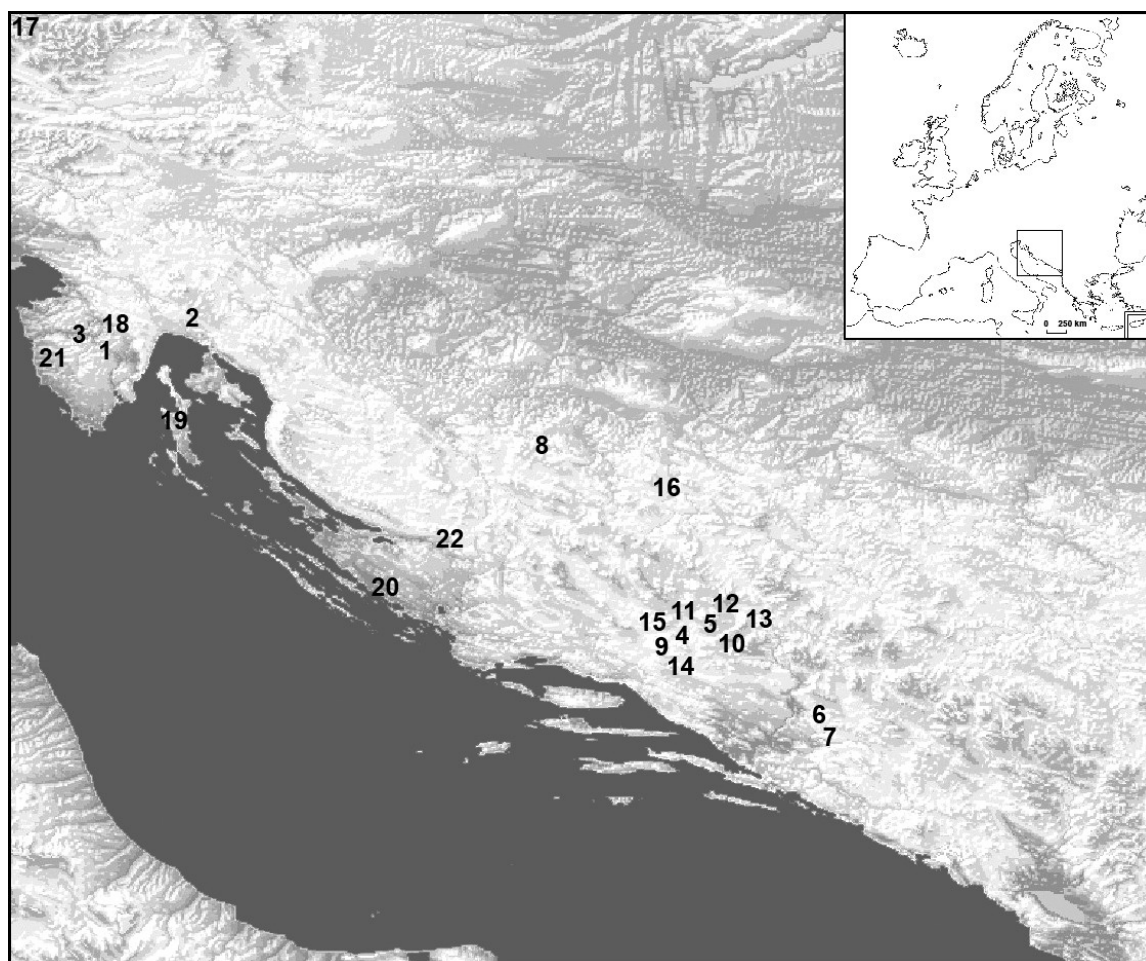
- Odrediti filogenetske i evolucijske odnose jedinki kompleksa vrste *Austropotamobius pallipes* uzorkovanih na teritoriju Republike Hrvatske i Federacije Bosne i Hercegovine;
- Na osnovi prikupljenih podataka istražiti da li se unutar kompleksa vrste *Austropotamobius pallipes* nalazi jedna ili više odvojenih vrsta;
- Istražiti da li se unutar kompleksa vrste *Austropotamobius pallipes* nalazi više odvojenih podvrsta;
- Odrediti stupanj genetičke varijabilnosti uzorkovanih jedinki;
- Ukoliko postoji više zasebnih haplogrupa, odrediti približno vrijeme odvajanja istih u evolutivnoj prošlosti.

III. MATERI JALI I METODE

3. MATERIJAL

3.1. Životinjski materijal

U eksperimentalnom dijelu istraživanja, na 22 lokaliteta iz Hrvatske i Bosne i Hercegovine te jednog lokaliteta u Austriji sakupljeno je 76 jedinki u periodu od 1995. do 2007. godine. Za molekularno filogenetske analize korištena je ukupno 151 16S rRNA i COI genska sekvenca vrste *Austropotamobius pallipes*. (Tablica 2, Tablica 4, Slika 6.). Kao vanjska grupa, u ovom istraživanju korištena je genska sekvenca vrste *Oroconectes limosus* (Rafinesque, 1817). Također, u istraživanje su uključene i genske sekvence srodnih vrsta rakova *Austropotamobius torrentium*, *Astacus astacus*, *A. leptodactylus*, *Cambaroides japonicus*, *C. similis*, *C. dauricus* i *C. schrenckii* (Tablica 6.) zbog dobivanja jasnije slike o diferencijaciji ispitivanih uzoraka.



Slika 6. Karta lokaliteta uzoraka obrađenih u istraživanju. 1 – 22 lokaliteti uzorkovanja rakova prema Tablici 2. i Tablici 4.

3.1.1. Analizirane 16S rRNA genske sekvence

Istraživanja filogenetskih odnosa kod vrste *A. pallipes* provedena su na osnovi 96 sekvenci 16S rRNA, od čega 35 sekvenci iz uzorkovanih jedinki (Tablica 2.), a preostala 61 sekvenca preuzeta je sa Interneta iz GenBank baze podataka pri NCBI-u (National Center for Biotechnology Information) (Tablica 3.).

Tablica 2. Uzorci korišteni za analizu pomoću markera za 16S rRNA. Rb. – redni broj, interna oznaka uzorka, lokalitet uzorkovanja jedinice (HR – Hrvatska, BiH – Bosna i Hercegovina, AU – Austrija), K - oznaka na geografskoj karti (Slika 6.).

Rb.	INTERNA OZNAKA	LOKALITET	K
1.	90ar	Butoniga, Istra, HR	1
2.	91ar	Rječina, HR	2
3.	93ar	Mirna ispod Motovuna, Istra, HR	3
4.	95ar	Mirna ispod Motovuna, Istra, HR	
5.	97ar	Prološko blato, BiH	4
6.	99ar	Tribistovo, ispod brane, BiH	5
7.	100ar	Tribistovo, ispod brane, BiH	
8.	102ar	Bilila Mokrašnica, izvor, BiH	6
9.	105ar	Mostarsko blato, Bregava, BiH	7
10.	107ar	Tribistova, Zorića gaj, BiH	8
11.	109ar	Tribistova, Zorića gaj, BiH	
12.	110ar	Tribistova, Zorića gaj, BiH	
13.	113ar	Tribistova, Zorića gaj, BiH	
14.	114ar	kanjon Badnjevice, HR	9
15.	119ar	kanjon Badnjevice, HR	
16.	120ar	kanjon Badnjevice, HR	
17.	121ar	kanjon Badnjevice, HR	
18.	123ar	potok Jelica, Rakitno, Posušje, BiH	10
19.	124ar	potok Jelica, Rakitno, Posušje, BiH	
20.	126ar	potok Žukovica, Posušje, BiH	11
21.	127ar	potok Žukovica, Posušje, BiH	
22.	129ar	jezero Tribistovo, Posušje, BiH	12
23.	130ar	potog Gaj, Tribistovo, Posušje, BiH	13
24.	131ar	potog Gaj, Tribistovo, Posušje, BiH	
25.	132ar	Vrljika, Durmiševac, HR	14
26.	133ar	Vrljika, Durmiševac, HR	
27.	134ar	Vrljika, kanal iz Badnjevice, HR	15
28.	136ar	rijeka Mrtvica, Kupreško polje, BiH	16
29.	137ar	rijeka Mrtvica, Kupreško polje, BiH	
30.	139ar	Austrija, AU	17
31.	141ar	Mirna, Kotli, Istra, HR	18
32.	154ar	Vransko jezero, otok Cres, HR	19
33.	159ar	Vransko jezero, Biograd, HR	20
34.	161ar	potok Antonci, Istra, HR	21
35.	163ar	rijeka Zrmanja, Bilišani Donji, HR	22

Tablica 3. Genske sekvence za 16S rRNA preuzete iz GenBank-a. Rb. – redni broj, haplotip, GenBank pristupni broj pod kojim je sekvenca pohranjena te lokalitet na kojem je jedinka uzorkovana; IT - Italija, FR – Francuska, SP – Španjolska, SW – Švicarska.

Rb.	HAPLOTIP	GenBank PRISTUPNI BROJ	LOKALITET
36.	Arno	EU308123	Prugnano, Arno, IT
37.	Artix	AF237609	Artix, Ariege, FR
38.	Artix	AF237610	Artix, Ariege, FR
39.	Arvigo	AY611202	Arvigo, Bisano, IT
40.	Bisenzio 1	EU308126	Settefonti, Molinaccio, Fiumenta, Bisenzio, IT
41.	Bisenzio 2	EU308127	Fiumenta, Bisenzio, IT
42.	Bisenzio 3	EU308122	Maggiore, Gorandaccio, Bisenzio, IT
43.	Borbera 1	AY521294	Vignole, Borbera, IT
44.	Borbera 1	AY611199	Borbera, Lagoscuro, IT
45.	Borbera 2	AY611200	Borbera, Lagoscuro, IT
46.	Borbera 3	AY521295	Vignole, Borbera, IT
47.	Borbera 4	AY521296	Vignole, Borbera, IT
48.	Brescia	AY521288	Brescia, Chiese, IT
49.	Caldonazzo	AY611198	Lake Caldonazzo, Brenta, IT
50.	Clain	AF237598	La Grace, Clain, FR
51.	Clivio	AJ242707	Lac Grond, Rhine, Caax, FR
52.	Clivio	AY611184	Clivio, Po, IT
53.	Duranna	AY611190	Duranna, Tevere, IT
54.	Eyreux	AJ242700	Rhone, Lamastre, Ardeche, FR
55.	Farfareta 1	AY611187	Farfereta, Arno, IT
56.	Farfareta 2	AY611188	Farfereta, Arno, IT
57.	Gavi	AY521287	Gavi, Lemne, IT
58.	Gottero	AJ242705	Po, SW
59.	Gottero	AY611185	Gottero, Magra, IT
60.	Iberic	AF237591	Lokalitet sekvence nije naznačen u GenBank bazi podataka
61.	Iberic	AF237592	Lokalitet sekvence nije naznačen u GenBank bazi podataka
62.	Iberic	AF237602	Lokalitet sekvence nije naznačen u GenBank bazi podataka
63.	Iberic	EF489427	Navarra, SP
64.	Lac Grond	AJ242704	Lac Grond, Rhine, Caax, FR
65.	Lama	AY611189	Lama, Bidente-Ronco, IT
66.	Lambro 1	AY611195	Lambro, Po, IT
67.	Lambro 2	AY611197	Lambro, Po, IT
68.	Lindenbach	AJ242701	Lindenbach, Limmat, Rhine, Obfelden, SW
69.	Magra	EU308125	Aqua bianca, Selve, Collegnago, Magra, IT
70.	Metaleto	EU308124	Metaleto, Metaleto, IT
71.	Mirna	AF237605	Lokalitet sekvence nije naznačen u GenBank bazi podataka
72.	Mirna	AY521293	Visione, Bormida, IT
73.	Mirna	AY611192	S. Antuono, Sele, IT
74.	Montebarro	AY521292	Montebarro, Adda, IT
75.	Montebarro	AY611196	Lambro, Po, IT
76.	Montenotte	AY611204	Montenotte, Po, IT
77.	Monti Berici 1	AJ242710	Monti Berici, Adige, IT
78.	Monti Berici 2	AJ242711	Monti Berici, Adige, IT
79.	Nenno	AY611201	Varaita, Po, IT
80.	Nenno	AY611203	Nenno, Po, IT
81.	Nera	AY611193	Nera, Tevere, IT
82.	Northern Italy	AJ242706	Po, SW
83.	Northern Italy	AY521289	20 raznih postaja iz sjeverne Italije
84.	Northern Italy	AY611183	Tanaro, Po, IT
85.	Orvine	AF237594	Lokalitet sekvence nije naznačen u GenBank bazi podataka

86.	Orvine	AJ242703	Orvine, Aare, Rhine/Rhone, Ursenbach, SW
87.	Oxentina	AF237597	Lokalitet sekvence nije naznačen u GenBank bazi podataka
88.	Proscarno	AY521286	Proscarno, Malone, IT
89.	Rhone 1	AJ242708	Rhone, SW
90.	Rhone 2	AJ242709	Rhone, SW
91.	Rigoso	AY521285	Rigoso, Scrivio, IT
92.	Rovesciala	AY521290	Volpara, Versa, IT
93.	Samoggia	AF237590	Samoggia, Reno, IT
94.	Steinbach	AJ242702	Steinbach, Aare, Rhine, Seeberg, SW
95.	Val Renard	AF237595	Val Renard, Orne, FR
96.	Volpara	AY521291	Volpara, Versa, IT

3.1.2. Analizirane COI genske sekvence

Istraživanja filogenetskih odnosa kod vrste *A. pallipes* provedena su na osnovi 55 sekvenci COI gena, od čega 33 sekvenci iz uzorkovanih jedinki (Tablica 4.), a preostale 22 sekvence preuzete su sa Interneta iz GenBank baze podataka pri NCBI-u (Tablica 5.).

Tablica 4. Uzorci korišteni za analizu pomoću markera za COI. Rb. – redni broj, interna oznaka uzorka, lokalitet uzorkovanja jedinke (HR – Hrvatska, BiH – Bosna i Hercegovina, AU – Austrija), K – oznaka na geografskoj karti (Slika 6.).

Rb.	INTERNA OZNAKA	LOKALITET	K
1.	LCO90	Butoniga, Istra, HR	1
2.	LCO93	Mirna ispod Motovuna, HR	3
3.	LCO95	Mirna ispod Motovuna, HR	
4.	LCO97	Prološko blato, BiH	4
5.	LCO99	Tribistovo ispod brane, BiH	5
6.	LCO100	Tribistovo ispod brane, BiH	
7.	LCO102	Bilila Mokrašnica - Izvor, BiH	6
8.	LCO105	Bilila Mokrašnica - Izvor, BiH	
9.	LCO107	Tribistovo, Zorića gaj, BiH	8
10.	LCO109	Tribistovo, Zorića gaj, BiH	
11.	LCO110	Tribistovo, Zorića gaj, BiH	
12.	LCO113	Tribistovo, Zorića gaj, BiH	
13.	LCO114	kanjon Badnjevice, HR	9
14.	LCO119	kanjon Badnjevice, HR	
15.	LCO120	kanjon Badnjevice, HR	
16.	LCO121	kanjon Badnjevice, HR	
17.	LCO123	potok Jelica, Rakitno, Posušje, BiH	10
18.	LCO124	potok Jelica, Rakitno, Posušje, BiH	
19.	LCO126	potok Žukovica, Zagorje, Posušje, BiH	11
20.	LCO127	potok Žukovica, Zagorje, Posušje, BiH	
21.	LCO129	jezero Tribistovo, Posušje, BiH	12
22.	LCO130	potok Gaj, Tribistovo, Posušje, BiH	13
23.	LCO131	potok Gaj, Tribistovo, Posušje, BiH	
24.	LCO132	Vrljika Durmiševac, HR	14
25.	LCO133	Vrljika Durmiševac, HR	
26.	LCO134	Vrljika kanal iz Badnjevice, HR	15
27.	LCO136	rijeka Mrtvica, Kupreško polje, BiH	16
28.	LCO137	rijeka Mrtvica, Kupreško polje, BiH	
29.	LCO139	Austrija, AU	17

30.	LCO141	Mirna Kotli, HR	18
31.	LCO161	Potok Antonci, Istra, HR	21
32.	LCO163	Zrmanja, Bilišani Donji, HR	22
33.	LCO164	Vransko jezero, otok Cres, HR	19

Tablica 5. Genske sekvence za 16S rRNA preuzete iz GenBank-a. Rb. – redni broj, haplotip, GenBank pristupni broj pod kojim je sekvenca pohranjena te lokalitet na kojem je jedinka uzorkovana; AT – Austrija, HR – Hrvatska, IT - Italija, SL – Slovenija, SP – Španjolska, PT – Portugal.

Rb.	HAPLOTIP	GenBank PRISTUPNI BROJ	LOKALITET
34.	Alps	AY667112	Borenitze Bach, Weißbriach, Hermagor, AT
35.	Alps	AY667118	Wiesenbach, Jadersdorf-Grünburg, Hermagor, AT
36.	Bračana	AY667109	Bračana potok, Buzet, HR
37.	Caserta	AB443447	Regio di Caserta, IT
38.	Caserta 1	AB443450	Regio di Caserta, IT
39.	Caserta 1	AB443449	Regio di Caserta, IT
40.	Caserta 1	AB443446	Regio di Caserta, IT
41.	Caserta 2	AB443451	Regio di Caserta, IT
42.	Caserta 2	AB443445	Regio di Caserta, IT
43.	Caserta 3	AB443448	Regio di Caserta, IT
44.	Cres	AY667111	Vransko jezero, otok Cres, HR
45.	Dragonja	AY667107	Dragonja River, Piran, SL
46.	Iberic	EF485041	Navarra, SP
47.	Iberic	AY667114	Tortulhas, Miranda do Douro, PT
48.	Kozina	AY667110	Glinščica Creek, Kozina, SL
49.	Moosbachl	AY667113	Moosbachl, Sankt Georgen, Bruneck, IT
50.	Osapska	AY667120	Osapska reka, Koper, SL
51.	Prološko blato 1	AY667106	Lake Modro Oko, Ploče, HR
52.	Prološko blato 2	AY667116	Lake Modro Oko, Ploče, HR
53.	Soča	AY667108	Mlake, Vipava, SL
54.	Sopotnica	AY667119	Sopotnica Creek, Tolmin, SL
55.	Vipava	AY667117	Mlake, Vipava, SL

Tablica 6. Vanjska grupa (*Oroconectes limosus*) i genske sekvence srodnih vrsta korištene prilikom istraživanja te rekonstrukcije filogenetskih stabala. Rb. – redni broj, vrsta organizma čija je mtDNA sekvenca korištena u istraživanju te njen GenBank pristupni broj.

	VRSTA	HAPLOTIP	GenBank PRISTUPNI BROJ
COI	<i>Astacus astacus</i>	A.astacus 1	AY151515
	<i>Astacus astacus</i>	A.astacus 2	AY667146
	<i>Astacus leptodactylus</i>	A.leptodactylus	EF043076
	<i>Cambaroides dauricus</i>	C.dauricus	AY667147
	<i>Cambaroides schrenckii</i>	C.schrenckii	AY667148
	<i>Oroconectes limosus</i>	O.limosus	EU442747
16S	<i>Astacus astacus</i>	A.astacus 1	DQ320049
	<i>Astacus astacus</i>	A.astacus 2	AF235983
	<i>Austropotamobius torrentium</i>	A.torrentium 1	EF080884
	<i>Austropotamobius torrentium</i>	A.torrentium 2	EF080885
	<i>Austropotamobius torrentium</i>	A.torrentium 3	EF080886
	<i>Cambaroides dauricus</i>	C.dauricus	DQ666838
	<i>Cambaroides simmilis</i>	C.simmilis	DQ666842
	<i>Cambaroides japonicus</i>	C.japonicus	DQ666839
	<i>Oroconectes limosus</i>	O.limosus	EF080934

3.2. Laboratorijski materijal

3.2.1. Osnovne kemikalije

U eksperimentalnom dijelu istraživanja korištene su slijedeće kemikalije:

- **KEMIKA (Hrvatska)**
 - Etanol
 - Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA)
 - Izopropanol
 - Kloridna kiselina
 - Natrijev hidroksid
 - Natrijev klorid
 - Octena kiselina

- **SIGMA (SAD)**
 - Etidij – bromid
 - Natrij – dodecil sulfat (SDS)
 - Boja Orange G

- **RIEDEL-deHAËN (Njemačka)**
 - Tris-(hidroksimetil)-aminometan (TRIS)

- **ROCHE (Švicarska)**
 - Agaroz LE
 - mQ H₂O (ultračista voda, filtrirana preko sustava milli-Q)
 - DNA faga λ

3.2.2. Osnovne puferske otopine

U eksperimentalnom dijelu istraživanja korišteni su slijedeći puferi:

- **TAE pH 8.0** (Sambrook i Rusell, 2001):
 - 40 mM TRIS-acetat
 - 1 mM EDTA

- **TE pH 8.0** (Sambrook i Rusell, 2001):
 - 10 mM TRIS

1 mM EDTA

3.2.3. Laboratorijski potrošni materijal

U eksperimentalnom dijelu istraživanja korišteni su slijedeći potrošni materijali:

- **EPPENDORF (Njemačka)**

Mikroepuvete 1,5 mL

Mikroepuvete 1,5 mL "Safe-Lock"

PCR mikroepuvete 0,5 mL "Thin-Walled"

- **GILSON (SAD)**

Nastavci za mikropipete 10 µL, 200 µL, 1000 µL i 10 mL

- **MOLECULAR BIOPRODUCTS (SAD)**

ART 10µL, 20 µL i 200 µL – nastavci za mikropipete s filterima

Parafilm M – Laboratorijski film

3.2.4. Enzimi

U eksperimentalnom dijelu istraživanja korišteni su slijedeći enzimi:

- **ROCHE (Švicarska)**

RNaza A

- **QIAGEN (Njemačka)**

proteinaza K

3.2.5. Elektroforetski standard

Kao elektroforetski standard u eksperimentalnom dijelu istraživanja korištena je DNA vrste *Tenebrio molitor* djelomično razgrađena restrikcijom endonukleazom *EcoRI* koja daje ljestvicu fragmenata početnog monomera veličine 142 pb te njegovih višekratnika.

3.2.6. Kompleti reagensa

U eksperimentalnom dijelu istraživanja korišteni su slijedeći kompleti reagensa:

- **EPPENDORF (Njemačka)**

HotMasterMix (2.5X) - komplet reagensa za lančanu reakciju polimerazom

- **ROCHE (Švicarska)**

High Pure PCR Product Purification Kit - komplet reagensa za pročišćavanje produkata lančane reakcije polimerazom i izolaciju fragmenata DNA iz agaroznog gela

- **QIAGEN (Njemačka)**

DNeasy® Tissue Kit – komplet reagensa za izolaciju ukupne genomske DNA iz životinjskog tkiva

QIAquick® PCR Purification Kit – komplet reagensa za pročišćavanje produkata lančane reakcije polimerazom

3.2.7. Tehnička oprema i uređaji

Adapteri za centrifugu: Adapteri za 0,2 mL PCR-mikroepuvete za 1,5/2,0 mL rotor (Eppendorf, Njemačka)

Adapter za digitalni fotoaparata: Adapter Ring for Olympus (Kenko, Japan)

Analitička vaga: EW 150-3M (Kern, Njemačka)

Centrifuga: miniSpin plus (Eppendorf, Njemačka)

Digitalni fotoaparata: Camedia C-4000 Zoom (Olympus, Japan)

Filter za etidij-bromid: Digital filter 590 nm (Peca Products Inc., SAD)

Kadice za elektroforezu: Mini-Sub Cell i Wide Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad, SAD)

Kadice za pripremu agaroznih gelova: Gel Caster, GT UVTP Gel Tray i Fixed High Comb (Bio-Rad, SAD)

Magnetska miješalica: Bibby Sturat (Barloworld Scientific, UK)

Mikrovalna pećnica: Intellowave (LG, Republika Korea)

Mikropipete: Pipetman 2µL, 20 µL, 200 µL, 1000µL i 10 mL (Gilson, SAD) i

Eppendorf Research 10 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L i 1000 μ L (Eppendorf, Njemačka)

Napajanje: Power Pac 300 (Bio-Rad, SAD)

pH metar: pH Meter 744 (Metrohm, Švicarska)

Prijenosno računalo: Intel® Pentium™ 2,8 GHZ sa 512 MB SD RAM

Rezač parafilma: Heathrow Scientific (SAD)

Štitnik za lice od UV zračenja: Bollé (Bushell, SAD)

Termostat: TermoStat plus (Eppendorf, Njemačka)

Thermal cycler: Mastercycler personal (Eppendorf, Njemačka)

Transiluminator: UV Transilluminator TR2000 (Bio-Rad, SAD)

Vodne kupelji: High Performance Water Bath 1235 (Shell Lab, SAD)

4. METODE

4.1. Sakupljanje uzoraka

Cjelokupan životinjski materijal korišten u ovom istraživanju sakupljan je rukama ili vršama. Između 5 i 25 mg tkiva uzorkovano je iz antena i/ili pereopoda rakova. Nakon uzorkovanja, uzorci su konzervirani u 70% i 95% etanolu i pohranjeni na +4 °C sve do početka laboratorijskog dijela istraživanja, a životinje su puštene natrag u vodu gdje su ulovljene.

4.2. Izolacija DNA

Zbog potrebe za DNA molekulama iznimne kvalitete i čistoće, DNA je izolirana pomoću kompleta reagensa „DNeasy Tissue Kit“ prema uputama proizvođača. Završna elucija izolirane DNA provedena je sa 100 µL i 200 µL elucijskog pufera čime je dobivena različito koncentrirana DNA za daljnje eksperimente.

4.3. Razgradnja DNA restrikcijskom endonukleazom

Razgradnja genomske DNA restrikcijskom endonukleazom *EcoRI* provedena je prema uputama proizvođača specifičnim za taj restrikcijski enzim. Količina upotrijebljenog restrikcijskog enzima u razgradnji bila je 3,0 U/µg DNA.

4.4. Priprema elektroforetskog standarda

Za pripremu elektroforetskog standarda korištena je genomska DNA izolirana iz 0,5 g ličinki i odraslih jedinki vrste *Tenebrio molitor*. Ukupna genomska DNA kukca *Tenebrio molitor* izolirana je istovjetnim postupkom kao što je izolirana ukupna genomska DNA iz rakova, opisana u točki 4.2. Nakon završnog taloženja genomske DNA

kukca *Tenebrio molitor*, pristupilo se razgradnji DNA upotrebom restrikcijske endonukleaze *EcoRI* kako je opisano u točki 4.3. Kvaliteta standarda provjerena je na 1%-tnom agaroznom gelu uz već postojeći dobro definirani standard *Tenebrio molitor*.

4.5. Umnažanje fragmenata PCR-om

Reakcija umnažanja fragmenata DNA lančanom reakcijom polimerazom izvedena je u volumenu reakcijske smjese od 50 μ L koja je sadržavala pojedine reagense, sukladno uputama proizvođača kompleta reagensa „HotMasterMix (2.5X)“ kako je navedeno u Tablici 7.

Tablica 7. Sastav reakcijske smjese i njen količinski udio za lančanu reakciju polimerazom (PCR) sukladno uputama proizvođača kompleta reagensa „HotMasterMix (2.5X)“

SASTOJAK	KOLIČINSKI UDIO
Taq	1U
PCR pufer	1 X
dNTP	0,2 mM
MgCl ₂	2,5 mM
Početnica 16Sar ili LCO-1490	0,2 μ L
Početnica 16Sbr ili LCO-2198	0,2 μ L
DNA kalup	25-200 ng

Uz svaki niz PCR reakcija upotrebljavana je negativna kontrola koja se sastojala od svih sastojaka identičnih u količini i broju s PCR smjesama izuzev prisutnosti kalupa DNA. Negativne kontrole u svakom nizu PCR reakcija upotrebljavane su kako bi se ustanovila eventualna kontaminacija kompleta reagensa ili pojedinih sastojaka PCR smjese.

Umnažanje fragmenata DNA lančanom reakcijom polimerazom započinjalo je dvominutnom preddenaturacijom kalupa DNA na 94 °C iza čega je uslijedilo 35 ciklusa programa. Unutar svakog ciklusa izmjenjivala su se tri karakteristična koraka ciklusa; denaturacija kalupa DNA, sljepljivanje početnica i kalupa DNA te sinteza novih fragmenata DNA. Koraci su imali određena vremena trajanja i temperature na kojima su se odvijali sukladno uputama proizvođača „HotMasterMix (2.5X)“, kako je navedeno u Tablici 8.

Tablica 8. Vremena trajanja (t/s) i temperature (T/°C) na kojima su se odvijali pojedini koraci ciklusa umnažanja fragmenata PCR-om, gdje su koraci: **PD** – preddenaturacija, **D** – denaturacija, **A** – sljepljivanje, **S** – sinteza, **FS** – završna sinteza, a **n** – broj ciklusa.

KOMPLET REAGENSA	PD		D		A		S		FS		n
	t/s	T/°C	t/s	T/°C	t/s	T/°C	t/s	T/°C	t/s	T/°C	
HotMasterMix (2.5X)	120	94	45	94	45	50	60	65	420	65	35

Svaki program okončan je završnom reakcijom sinteze DNA u trajanju 7 minuta na 65 °C. Time je omogućen dovršetak sinteze svih započetih fragmenata DNA te dodavanje adenozina na 3' kraj svakog fragmenata.

4.5.1. Početnice korištene pri umnažanju PCR-om

Početnice korištene u reakcijama lančane reakcije polimerazom bile su:

- za umnažanje fragmenta 16S rRNA gena: (Simon i sur., 1994)

16Sar: 5' – CGCCTGTTTATCAAAAACAT – 3'

16Sbr: 5' – CCGGTCTGAACTCAGATCACGT – 3'

- za umnažanje fragmenta podjedinice I gena citokrom-oksidade: (Folmer i sur., 1991)

LCO-1490: 5' – GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG – 3'

HCO-2198: 5' – TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA – 3'

Karakteristike početnica navedene su u Tablici 9.

Tablica 9. Nukleotidni sastav (G + C / %), temperatura mekšanja (T_m/°C), relativna molekulska masa (Mr) i broj parova baza (pb) početnica za PCR fragmenata gena 16S rRNA i COI.

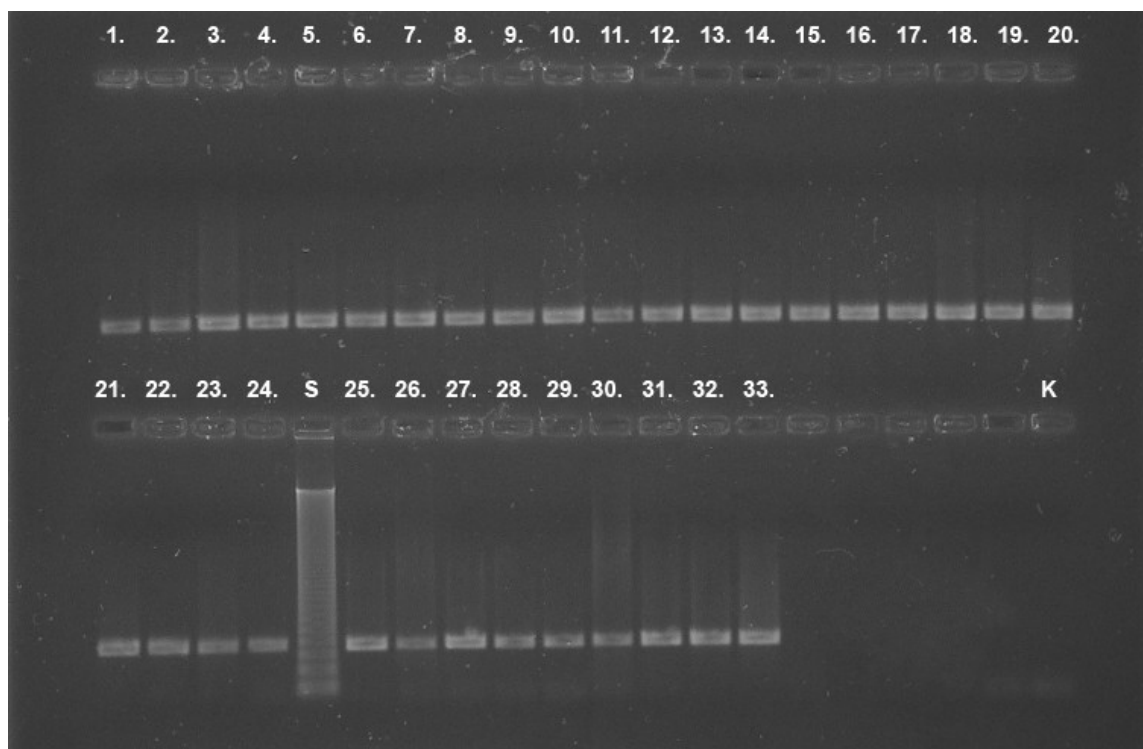
POČETNICA	G + C / %	T _m / °C	Mr	pb
16Sar	35	51,2	5996,0	20
16Sbr	54,6	62,1	6631,4	22
LCO	32	56,4	7658,1	25
HCO	34,6	58,5	7916,3	26

4.6. Elektroforetsko odjeljivanje fragmenata DNA

Nakon provedene lančane reakcije polimerazom uzeta je 1/10 reakcijske smjese i pomiješana je s bojom Orange G (1/5 ukupnog volumena). Fragmenti DNA dobiveni nakon lančane reakcije polimerazom ili razgradnje restrikcijskom endonukleazom *EcoRI* odvajani su na 1% agaroznom gelu. Agarozni gelovi su pripremani u 1 x TAE puferu.

Elektroforeza je provedena u istom puferu uz jakost struje od 75 mA u električnom polju jakosti 5 V/cm. Obojani uzorci DNA nanošeni su na gel, otopljeni su u TE puferu. Za određivanje veličine fragmenata na gelu korišten je standard *Tenebrio molitor*.

Za vizualizaciju i utvrđivanje čistoće DNA produkata PCR-a pod UV svjetlom valne duljine 312 nm, agarozni gel je nakon provedene elektroforeze natapan 30 minuta u 0,5 mg/mL vodenoj otopini etidijevog-bromida. Nakon elektroforetskog odvajanja i bojanja uzoraka agarozni gel promatran je na transiluminatoru i fotografiran pomoću digitalnog fotoaparata spojenog s osobnim računalom, preko programa **CAM2COM 2.2.2.28** (Menchenin, 2001) što je omogućilo računalnu pohranu i obradu slike (Slika 7.).



Slika 7. Fotografija agaroznog gela i produkata lančane reakcije polimerazom gena za COI nakon elektroforetskog odjeljivanja i bojanja. 1. – 33. – uzorci prema rednim brojevima u Tablici 4, S – elektroforetski standard *T. molitor*, K – negativna kontrola.

4.7. Pročišćavanje fragmenata DNA nakon PCR-a

Nakon provedene lančane reakcije polimerazom, neiskorišteni ostatak od 9/10 reakcijske smjese podvrgnut je pročišćavanju fragmenta molekula DNA pomoću „High Pure PCR Product Purification Kit-a“ prema uputama proizvođača. Pročišćeni fragmenti DNA su s kolona završno eluirani u 50 µL elucijskog pufera sukladno uputama servisa za određivanje primarne strukture DNA.

4.8. Određivanje primarne strukture DNA (sekvenciranje)

Pročišćeni fragmenti molekula DNA nakon lančane reakcije polimerazom poslani su u tvrtku Macrogen Inc. sa sjedištem u Južnoj Koreji radi određivanja primarne strukture molekula DNA.

Fragmenti molekula DNA sekvencirani su u oba smjera upotrebom karakterističnih početnica navedenih u poglavlju 4.5.1. kojima je bila provedena lančana reakcija polimerazom.

Nukleotidni slijedovi fragmenta molekula DNA učitani su s korisničke stranice Macrogen Inc. u obliku *fasta*, *pdf* i *scf* datoteka. Za čitanje *scf* datoteka upotrebljavan je računalni program **CHROMAS LITE 2.0** učitani s Internet stranice: www.technelysium.com.au/chromas.html.

Nakon određivanja primarnih slijedova genskih sekvenci, sve sekvence su poslane u GenBank bazu podataka pri NCBI-u. Na taj način je svakoj pojedinoj sekvenci dodijeljen jedinstveni GenBank pristupni broj (GenBank Accession Number) kako je navedeno u Tablici 12 i Tablici 13.

4.9. Računalne analize

Računalne analize provedene su pomoću prijenosnog računala Intel® Pentium™ 2.8 GHZ sa 1 GB DDR RAM.

Programi upotrebljavani u analizama su: **PAUP* 4.0b10** (Swofford, 2001) – za konstrukciju filogenetskih stabala; **MODELTEST 3.7** (Posada i Crandall, 1998) i **MT GUI 1.0**

(Niu, 2005) – za odabir najboljeg evolucijskog modela; **MEGA 4.0.1.** (Kumar i sur., 2007) – za proračune genske udaljenosti i nukleotidne raznolikosti; **TREEVIEW 1.6.6** (Page, 2001) – za pregled i grafičko obrađivanje dobivenih filograma; **MR. BAYES 3.1.1** (Ronquist i Huelsenbeck, 2003) – za provedbu Bayesian analize, **BioEDIT 7.0.5.3** (Hall, 1999) i **CLUSTALX 1.83** (Thompson i sur., 1997) – za sravnjivanje i obradu nukleotidnih sekvenci. Za ostale analize i obradu podataka korišten je program **GENEDOC 2.1.000** (Nicholas i Nicholas, 1997). Baze podataka su pretraživane upotrebom „on-line“ programa **BLAST** (Altschul i sur., 1990).

Sekvence su unesene u bazu podataka upotrebom programa **SEQUIN 6.0.**

IV. REZULTATI

5. REZULTATI

5.1. Višestruko sravnjivanje sekvenci

Rezultati molekularno filogenetske analize izravno su ovisni o kvaliteti višestrukog sravnjenja sekvenci. Višestruko sravnjenje sekvenci se radi na način da se homologni ostaci (purinske i primidinske baze neke nukleinske kiseline, u ovom slučaju mtDNA) pomoću računalnog programa poredaju u iste kolone, što je više moguće. Budući da sekvence imaju različite duljine, ponekad je potrebno uvesti razmake (eng. *gaps*) kako bi se postiglo sravnjenje. Višestruko sravnjivanje se bazira na algoritmima globalnog sravnjivanja (eng. *global alignment*) sekvenci kod kojih svi karakteri parova sekvenci (eng. *pairwise alignment*) sudjeluju u sravnjivanju.

Sravnjenja su osnova molekularne filogenije i koriste se za različite vrste analiza podataka poput predviđanja strukture, demonstracije sličnosti i prije svega za filogenetske rekonstrukcije. Analiza stupnja i uzoraka promjene u sekvencama aminokiselina ili nukleotida u evolucijskoj prošlosti je nemoguća bez sravnjenja sekvenci. Ako su sekvence evolucijski povezane, u sravnjenju će se njihovi ostaci slagati u iste kolone po sličnosti, ali i razlikovati u insercijama, delecijama i supstitucijama.

Rezultati određivanja primarnog slijeda nukleotida za sekvence 16S rRNA i COI iz različitih populacija vrste *Austropotamobius pallipes* te vrste korištene kao vanjska grupa (Tablica 6.), višestruko su sravnjeni pomoću programa **CLUSTALX 1.83** (Thompson i sur., 1999), nakon čega su uređeni u programu **BioEDIT 7.0.5.2** (Hall, 1999) i ponovno sravnjeni pomoću programa **CLUSTALX 1.83** (Thompson i sur., 1999). Uređivanje se sastojalo u „ručnom izrezivanju“ početaka i krajeva sekvenci koje su bile znatno veće duljine od ostatka sekvenci nakon sravnjivanja ili su imale relativno velika područja insercija i delecija na krajevima sekvenci nakon sravnjivanja. Na ovaj način u analizu su uzeta samo ona mjesta koja su filogenetski informativna.

5.1.1. Višestruko sravnjivanje sekvenci za 16S rRNA gen

Istraživanje je započeto s ukupno 35 sekvenci za 16S rRNA gen (Tablica 2.). Ispitivane sekvence su bile dužine 422 pb. Analiza sravnjenih sekvenci pokazala je karakterističan nukleotidni sastav za mtDNA beskralješnjaka (Wolstenholme, 1992). Nukleotidni sastav izračunat je pomoću programa **MEGA 4.0.1.** (Kumar i sur., 2007) te pokazuje vrlo male varijacije oko srednje vrijednosti (Tablica 10.). Također, primjetan je iznimno ujednačen raspored baza između ispitivanih sekvenci. Jedina iznimka je bila sekvenca koja je bila korištena kao vanjska grupa, pomoću koje su ukorijenjena filogenetska stabla, a koja je pokazala veće razlike u nukleotidnom sastavu od ispitivanih sekvenci. Ta činjenica ukazuje na ispravan izbor navedene skupine koja je korištena kao vanjska grupa. Konsenzus sekvencu za gen 16S rRNA prikazuje Slika 8.

Tablica 10. Granične vrijednosti i prosječni nukleotidni sastav ispitivanih sekvenci gena za 16S rRNA bez vanjske grupe izračunat pomoću programa **MEGA 4.0.1.** (Kumar i sur., 2007).

	ADENIN (A)	TIMIN (T)	CITIZIN (C)	GVANIN (G)
MINIMALNA I MAKSIMALNA VRIJEDNOST	33,7 % - 37,3 %	33,9 % - 35,3 %	9,7 % - 10,9 %	17,7 % - 21,6 %
SREDNJA VRIJEDNOST	34,5 %	35,1 %	9,8%	20,7 %

TATTATGACCGTGCTAAGGTAGCATAATCATTAGTCTTTTAATTGAAGGCTGG
TATGAATGGTTGGACAAGAGATAAGCTGTCTCGAGCAAAAATATTGAATTTA
ACTTTTGAGTGAAAAGGCTTAAATTTCTGGGGGGACGATAAGACCCTATAA
AACTTTATATTTTAAAAATATTAATTAATTTTGTATGAGAAGGTTATTTTTAAG
TATTTTATTGGGGTGATAAGGATATAATAAAAGATAACTGTTTCTTTTTTTTTT
ACAGAGGTGTTTGAGTAAAGGATCCTAATAAGGGAAAGAAGGTTAAGTTACT
TTAGGGATAACAGCGTAATTTTCTTTAAGAGTTCTTATCGACAAGAAAGTTTG
CGACCTCGATGTTGAATTAAGTTCTTTATGGAGCAGAACTA

Slika 8. Konsenzus sekvenca fragmenta gena za 16S rRNA sa 60%-tnim pragom učestalosti za uračunavanje u konsenzus, duljina 422 pb. A – adenin, T – timin, C – citozin, G – gvanin

5.1.2. Višestruko sravnjivanje sekvenci za COI gen

Istraživanje je započeto sa ukupno 33 sekvence za COI gen (Tablica 4.). Ispitivane sekvence su bile dužine 570 pb. Slično kao i u slučaju analize gena za 16S rRNA, analiza sravnjenih sekvenci gena za COI pokazala je karakterističan nukleotidni sastav za mtDNA beskralješnjaka (Wolstenholme, 1992). Nukleotidni sastav izračunat je putem programa **MEGA 4.0.1.** (Kumar i sur., 2004) i pokazuje vrlo male varijacije oko srednje vrijednosti (Tablica 11.). Ponovno je primetan iznimno ujednačen raspored baza između ispitivanih sekvenci i jedina iznimka je sekvenca koja je bila korištena kao vanjska grupa. Ona je pokazala nešto veće razlike u nukleotidnom sastavu od ispitivanih sekvenci, što se i očekuje od sekvenci vanjske grupe. Konsenzus sekvencu za gen COI prikazuje Slika 9.

Tablica 11. Granične vrijednosti i prosječni nukleotidni sastav ispitivanih sekvenci gena za COI bez vanjskih grupa izračunat pomoću programa **MEGA 4.0.1.** (Kumar i sur., 2004).

	ADENIN (A)	TIMIN (T)	CITIZIN (C)	GVANIN (G)
MINIMALNA I MAKSIMALNA VRIJEDNOST	23,0 % - 23,9 %	36,2 % - 36,9 %	16,5 % - 17,8 %	22,1 % - 23,7 %
SREDNJA VRIJEDNOST	23,1 %	36,5 %	16,8%	23,6 %

GGGCAGCCGGGCAGTTTAATTGGGGACGATCAAATTTATAATGTAGTGGTTA
 CCGCCCATGCCTTTGTTATAATTTTTTTTATGGTTATACCCATTATAATTGGGG
 GGTTTGGGAATTGATTAGTTCCTTTAATGTTAGGAGCTCCTGATATGGCTTTCC
 CCCGAATAAATAACATGAGATTTTGGTTACTTCCATTTTCTTTAACTCTATTAT
 TAACTAGGGGGTTAGTGGAGAGGGGGTTGGAACGGGGTGAAGTGTCTATCC
 TCCTTTAGCATCAGCTATTGCTCACGCAGGGGCGTCTGTGGACCTGGGGATTT
 TTCACTTCACTTAGCGGGGGTATCTTCAATTTTAGGGGCGGTAAATTTATA
 ACTACAGCTATTAACATACGAAGAGTGGGGATGACCTTGGATCGAATACCTC
 TTTTGTGTTGATCTGTATTTATTACGGCGGTCCTTTTACTTTTATCTCTACCTGT
 ATTAGCAGGTGCTATTACTATATTATTAACAGATCGTAATTTAAATACTTCAT
 TTTTGTGATCCTGCAGGGGGAGGGGACCCGGTTTTATA

Slika 9. Konsenzus sekvenca fragmenta gena za COI sa 60% -tnim pragom učestalosti za uračunavanje u konsenzus, duljina 570 pb. A – adenin, T – timin, C – citozin, G – gvanin

5.2. Lokalno sravnjivanje sekvenci

Konsenzus sekvence gena 16S rRNA i COI uspoređene su sa sekvencama dostupnima preko baza podataka NCBI, EMBL (European Molecular Biology Laboratory) i DDBJ (DNA Data Bank of Japan). Usporedbe su napravljene pomoću programa **BLAST** (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul i sur., 1990, 1997) koji služi za pronalaženje homologije među sekvencama obrađenim u eksperimentalnom dijelu i sekvencama koje se nalaze u bazama podataka. **BLAST** je postao standard za pretraživanje i sravnjivanje sekvenci (Altschul i sur., 1990), a njegov se algoritam, koji je postao vrlo popularan zbog pristupačnosti, brzine i točnosti, i dalje razvija. U pretraživanju je korišten MegaBlast algoritam.

Metode lokalnog sravnjivanja temelje se na pronalaženju homolognih regija između sekvenci koje se uspoređuju, s time da nije bitno na kojem se mjestu nalaze te homologne regije (npr. pozicija od 1. do 20. nukleotidnog ostatka u nekoj sekvenci X može se sravniti s pozicijama 70. do 90. neke druge sekvence Y). **BLAST** identificira homologne sekvence upotrebljavajući heurističku metodu koja inicijalno pronalazi kratke odgovarajuće slijedove između dviju sekvenci, dakle, ova metoda ne uzima u obzir cijelu sekvencu. Za razliku od metode globalnog sravnjivanja, ova je metoda puno fleksibilnija i omogućuje pronalaženje homolognih regija koje se nalaze na različitim mjestima u različitim sekvencama. Kao i kod višestrukog sravnjivanja, i ovdje je ponekad potrebno uvesti razmake (eng. *gaps*) kao kompenzaciju za moguće insercije ili delecije u sekvenci koja je relativna nekoj drugoj. Kako bi se spriječila akumulacija tih razmaka u procesu sravnjivanja, njihovo umetanje uzrokuje određenu dedukciju od konačnog rezultata sravnjivanja.

Rezultati pretraživanja pokazali su visoki stupanj homologije nukleotidnih sekvenci dijelova 16S rRNA gena i COI gena dobivenih u eksperimentalnom dijelu i sekvenci uzetih iz baze podataka. Taj podatak sa sigurnošću pokazuje da su pokusima uspješno umnožene i izolirane određene regije 16S rRNA, odnosno COI gena.

5.3. Odabir haplotipova

Analizom svih sekvenci nakon njihovog višestrukog sravnjivanja, zatim lokalnog sravnjivanja, uvrštavanja sekvenci preuzetih iz baza podataka te njihovog uređivanja i ponovnog globalnog sravnjivanja, utvrđeno je da su kod nekih uzoraka analizirani dijelovi mtDNA u potpunosti jednaki, odnosno da veći broj pojedinačnih ispitivanih fragmenata gena za 16S rRNA i gena za COI predstavlja nekoliko zasebnih haplotipova. Svaki haplotip karakterizira jedinstveni slijed nukleotida, te između sekvenci unutar jednog haplotipa ne postoji nikakva genska udaljenost – slijedovi su za taj fragment identični (Nei i Kumar, 2000). U ovom istraživanju utvrđeno je ukupno 90 haplotipova – 61 haplotip u dijelu istraživanja koji se bavi genom za 16S rRNA i 29 u dijelu istraživanja koji se bavi genom COI. U daljnim analizama korišteni su samo karakteristični haplotipovi. Da bi se olakšao prikaz na filogenetskim stablima, ispitivanim haplotipovima su dati nazivi (Tablica 3, 5, 6, 12, 13.).

5.4. Odabir evolucijskih modela

Filogenetska rekonstrukcija, odnosno analiza, bazira se na statističkoj obradi podataka. Upravo zbog toga nije ju moguće provesti bez upotrebe određenih modela vjerojatnosti tj. evolucijskih modela. Svi modeli su pretpostavke koje opisuju različite vjerojatnosti supstitucije jednog nukleotida drugim, a sve s ciljem objašnjavanja i ispitivanja nevidljivih promjena tijekom evolucijske prošlosti (Lio i Goldman, 1998). Primjena različitih evolucijskih modela može u velikoj mjeri utjecati na rezultate filogenetske analize. U slučaju upotrebe pogrešnog evolucijskog modela, filogenetska rekonstrukcija može biti manje točna ili nekonzistentna.

Kompleksni evolucijski modeli bolje rekonstruiraju filogeniju od jednostavnijih, no oni su računalno i vremenski puno zahtjevniji te uključuju više pogrešaka uz svaku pretpostavku. Za odabir najboljeg evolucijskog modela koriste se statistička testiranja koja odabiru model koji najbolje pristaje uz podatke koji se trebaju analizirati. To je tzv. best-fit model. Postoje dvije skupine statističkih testiranja evolucijskih modela:

hijerarhijski test udjela vjerojatnosti (eng. *hierarchical likelihood ratio test* – hLRT) i informacijski kriterij (eng. *inforamtion criteria* – IC).

Tablica 12. Uzorci korišteni za analizu pomoću markera za 16S rRNA. Rb. – redni broj, IOU – interna oznaka uzorka, haplotip i GenBank pristupni broj.

Rb.	IOU	HAPLOTIP	GenBank PRISTUPNI BROJ
1.	90ar	Mirna	EU330543
2.	91ar	Rječina	EU330544
3.	93ar	Mirna	EU330545
4.	95ar	Nera	EU330546
5.	97ar	Prološko blato	EU330547
6.	99ar	Tribistovo	EU330548
7.	100ar	Tribistovo	EU330549
8.	102ar	Bilila Mokrašnica	EU330550
9.	105ar	Tribistovo	EU330551
10.	107ar	Zorića gaj 1	EU330552
11.	109ar	Zorića gaj 2	EU330553
12.	110ar	Zorića gaj 3	EU330554
13.	113ar	Tribistovo	EU330555
14.	114ar	Tribistovo	EU330556
15.	119ar	Tribistovo	EU330557
16.	120ar	Tribistovo	EU330558
17.	121ar	Badnjevice kanjon	EU330559
18.	123ar	Tribistovo	EU330560
19.	124ar	Tribistovo	EU330561
20.	126ar	Tribistovo	EU330562
21.	127ar	Tribistovo	EU330563
22.	129ar	Tribistovo	EU330564
23.	130ar	Gaj	EU330565
24.	131ar	Tribistovo	EU330566
25.	132ar	Vrljika 2	EU330567
26.	133ar	Vrljika 2	EU330568
27.	134ar	Badnjevice	EU330569
28.	136ar	Tribistovo	EU330570
29.	137ar	Mrtvica	EU330571
30.	139ar	Northern Italy	EU330572
31.	141ar	Mirna	EU330574
32.	154ar	Vransko Cres	EU330575
33.	159ar	Zrmanja 1	EU330576
34.	161ar	Tribistovo	EU330577
35.	163ar	Zrmanja 1	EU330578

Tablica 13. Uzorci korišteni za analizu pomoću markera za COI. Rb. – redni broj, IOU – interna oznaka uzorka, haplotip i GenBank pristupni broj.

Rb.	IOU	HAPLOTIP	GenBank PRISTUPNI BROJ
1.	LCO90	Butoniga	EU330580
2.	LCO93	Mirna 1	EU330581
3.	LCO95	Mirna 1	EU330582
4.	LCO97	Prološko blato 1	EU330583
5.	LCO99	Tribistovo 1	EU330584
6.	LCO100	Tribistovo 1	EU330585
7.	LCO102	Bilila 1	EU330586
8.	LCO105	Bilila 2	EU330587
9.	LCO107	Tribistovo 1	EU330588
10.	LCO109	Tribistovo 1	EU330589
11.	LCO110	Tribistovo 1	EU330590
12.	LCO113	Tribistovo 1	EU330591
13.	LCO114	Prološko blato 2	EU330592
14.	LCO119	Prološko blato 2	EU330593
15.	LCO120	Prološko blato 2	EU330594
16.	LCO121	Prološko blato 2	EU330595
17.	LCO123	Tribistovo 1	EU330596
18.	LCO124	Tribistovo 1	EU330597
19.	LCO126	Prološko blato 2	EU330598
20.	LCO127	Prološko blato 2	EU330599
21.	LCO129	Tribistovo 1	EU330600
22.	LCO130	Tribistovo 2	EU330601
23.	LCO131	Tribistovo 2	EU330602
24.	LCO132	Prološko blato 1	EU330603
25.	LCO133	Prološko blato 1	EU330604
26.	LCO134	Prološko blato 1	EU330605
27.	LCO136	Kupres 1	EU330606
28.	LCO137	Kupres 2	EU330607
29.	LCO139	Austrija	EU330608
30.	LCO141	Mirna 2	EU330610
31.	LCO161	Antonci	EU330611
32.	LCO163	Prološko blato 1	EU330612
33.	LCO164	Vransko jezero	EU330613

Pomoću programa **MODELTEST 3.7** (Posada i Crandall, 1998) te programa **MT GUI 1.0** (Nuin, 2005) i programskog paketa **PAUP* 4.0b10** (Swofford, 2001) proveden je izbor najboljeg evolucijskog modela.

Višestruko sravnjene sekvence analizirane su u programskom paketu **PAUP* 4.0b10** (Swofford, 2001) s karakterističnim blokom naredbi za procjenu vjerojatnosti i parametara za svaki od 56 mogućih modela evolucije na osnovi stabla susjednog sparivanja dobivenog upotrebom Jukes i Cantor modela udaljenosti. Rezultat analize je datoteka koje je pokrenuta u programu **MODELTEST 3.7** (Posada i Crandall, 1998) preko programa **MT GUI 1.0** (Nuin, 2005). Na taj način dobivena je datoteka u kojoj se nalazi izračun za najbolji evolucijski model prema pojedinom statističkom modelu testiranja, od mogućih 56, za ispitivane sekvenci za 16S rRNA te COI marker prema zadanim kriterijima (Prilog 1, 2.).

Kao najbolji supstitucijski modeli određeni pomoću programa **MODELTEST 3.7** (Posada i Crandall, 1998) usporedbom hijerarhijskog testa udjela vjerojatnosti i Akaike informacijskog kriterija za ispitivane sekvence 16S rRNA i COI markera pokazali su se modeli navedeni u Tablici 14.

Tablica 14. Najbolji evolucijski modeli za 16S rRNA i COI marker odabrani programom **MODELTEST 3.7** (Posada i Crandall, 1998) pomoću Akaike informacijskog kriterija - AIC.

	16S rRNA	COI
AIC	TIM+G	HKY+I+G

5.5. Filogenetske analize

5.5.1. Analiza metodom najveće štedljivosti (MP metoda)

Filogenetska analiza metodom najveće štedljivosti - MP (eng. *maximum parsimony*) provedena je upotrebom programa **PAUP* 4.0b10** (Swofford, 2001). Za dobivanje filogenetskih stabala analizirane su datoteke sekvenci gena 16S rRNA i COI u *nexus* formatu. Svaka datoteka sastojala se od višestruko sravnjenih sekvenci pojedinog gena. Sve sekvence analizirane su upotrebom heurističkog pristupa (Farris, 1970).

Statistička analiza vjerodostojnosti ovako dobivenog filogenetskog stabla provedena je metodom samoučitavanja (eng. *bootstrap*) uz 1000 replikacija pomoću programa **PAUP* 4.0b10** (Swofford, 2001).

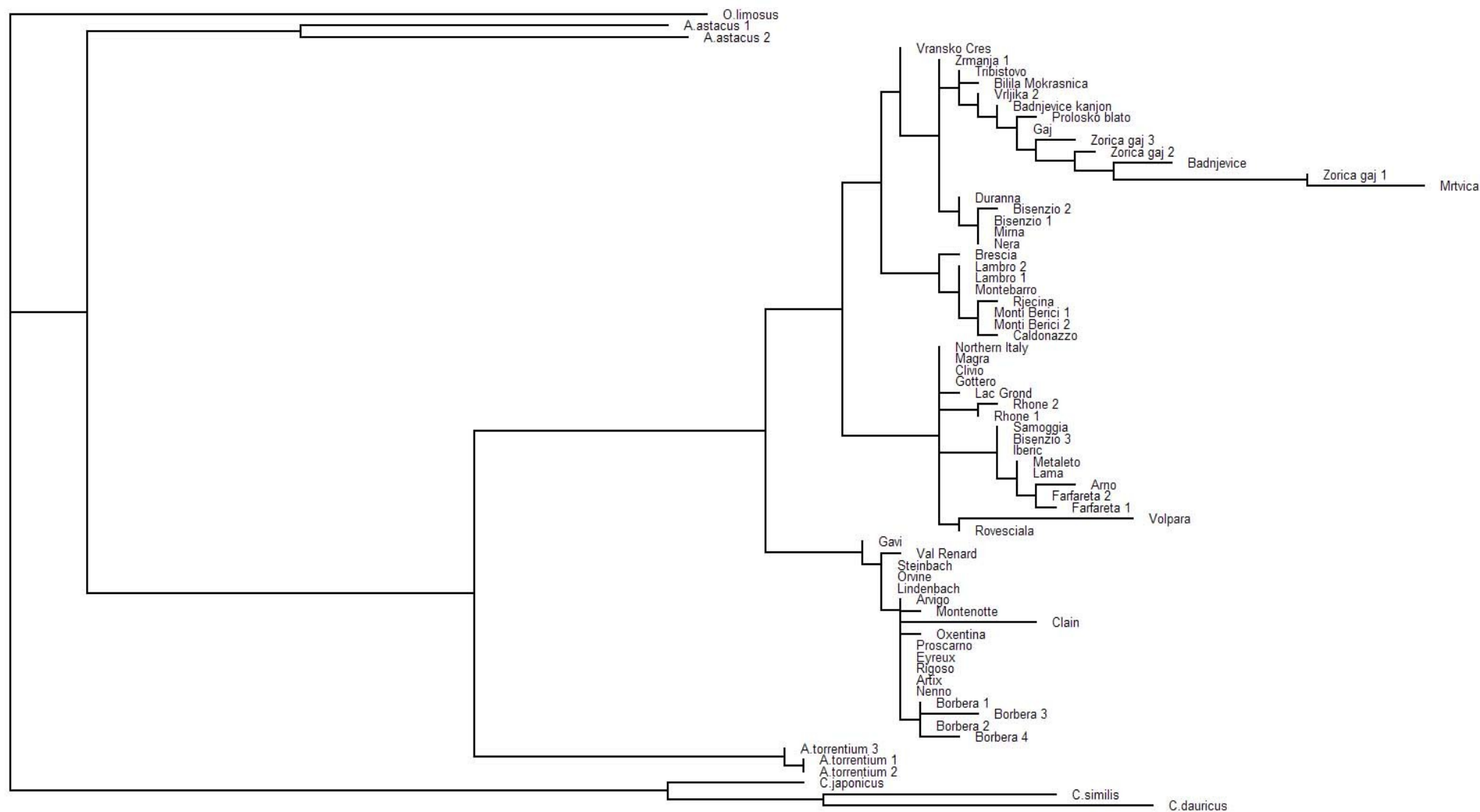
Za sekvence gena 16S rRNA i gena COI korišteni su skupovi naredbi prema (Franjević, 2006). Ovakvim skupovima naredbi postignuto je konstruiranje 16S rRNA MP (Slika 10.) i COI MP konsenzus filograma (Slika 11.) kod kojih su sačuvane proporcionalne duljine grananja ukorijenjenih vanjskom grupom *O. limosus*, metodom maksimalne štedljivosti (eng. *maximum parsimony*) uz upotrebu heurističkog pristupa, koji podrazumijeva postupno dodavanje taksona, nasumičnim dodavanjem sekvenci u 100 ciklusa ponavljanja te njihovu statističku provjeru samoučitavanjem u 1000 navrata.

5.5.2. Analiza metodom najveće vjerojatnosti (ML metoda)

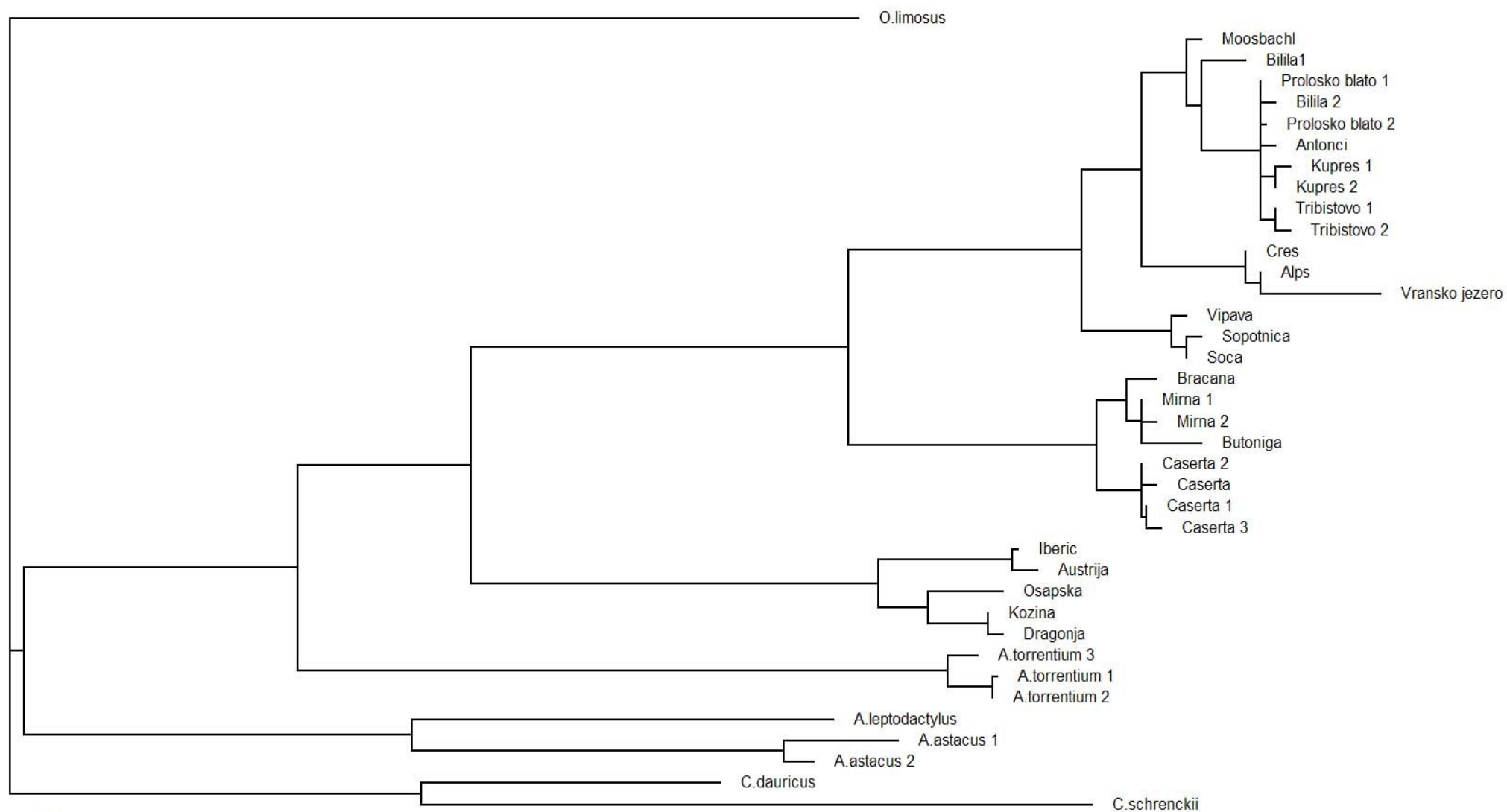
Analiza filogenetskih odnosa sekvenci gena za 16S rRNA i COI metodom najveće vjerojatnosti - ML (eng. *maximum likelihood*) provedena je upotrebom programa **MODELTEST 3.7** (Posada i Crandall, 1998) te **PAUP* 4.0b10** (Swofford, 2001).

Pomoću programa **MODELTEST 3.7** prvo je određen najbolji evolucijski model za pojedinu skupinu analiziranih sekvenci (poglavlje 5.4.) pomoću Akaike informacijskog kriterija (AIC) (Akaike, 1974) koji je potom korišten prilikom analize metodom najveće vjerojatnosti. Nakon dobivanja datoteke sa izračunom najboljeg evolucijskog modela, niz komandi za taj model je uklopljen u blok naredbi za izvršenje analize metodom najveće vjerojatnosti preko programa **PAUP* 4.0b10**. Rezultat ove analize su ukorijenjeni konsenzus filogrami za 16S rRNA marker (Slika 12.) odnosno za COI marker (Slika 13.) koji prikazuju odnose među sekvencama prema metodi najveće vjerojatnosti. Takvi filogrami su vizualizirani i grafički obrađeni pomoću programa **TREEVIEW 1.6.6.** (Page, 2001).

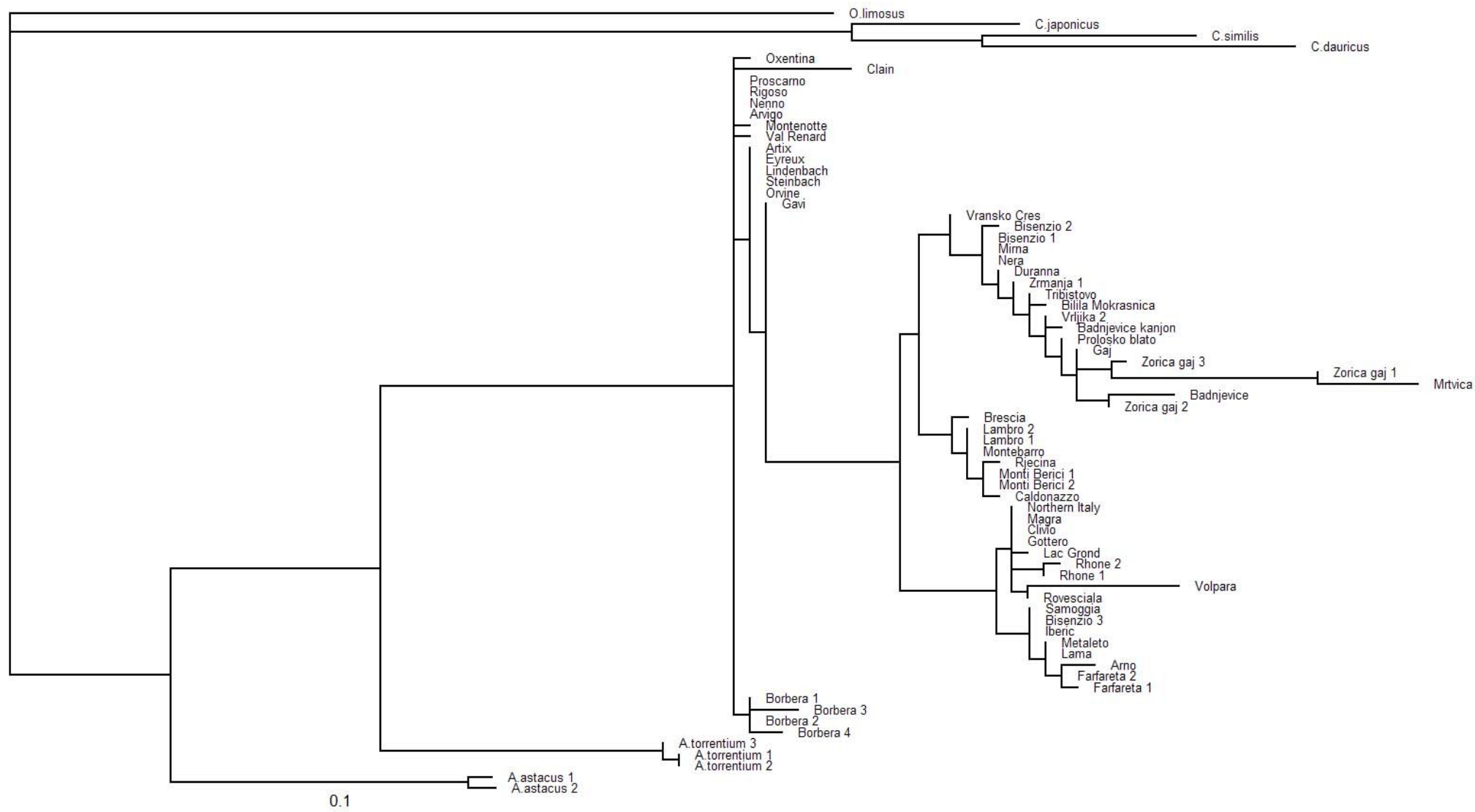
Za provođenje filogenetske analize markera 16S rRNA i COI metodom najveće vjerojatnosti uz primjenu najboljeg evolucijskog modela u programu **PAUP* 4.0b10** korišteni su skupovi naredbi prema (Franjević, 2006).



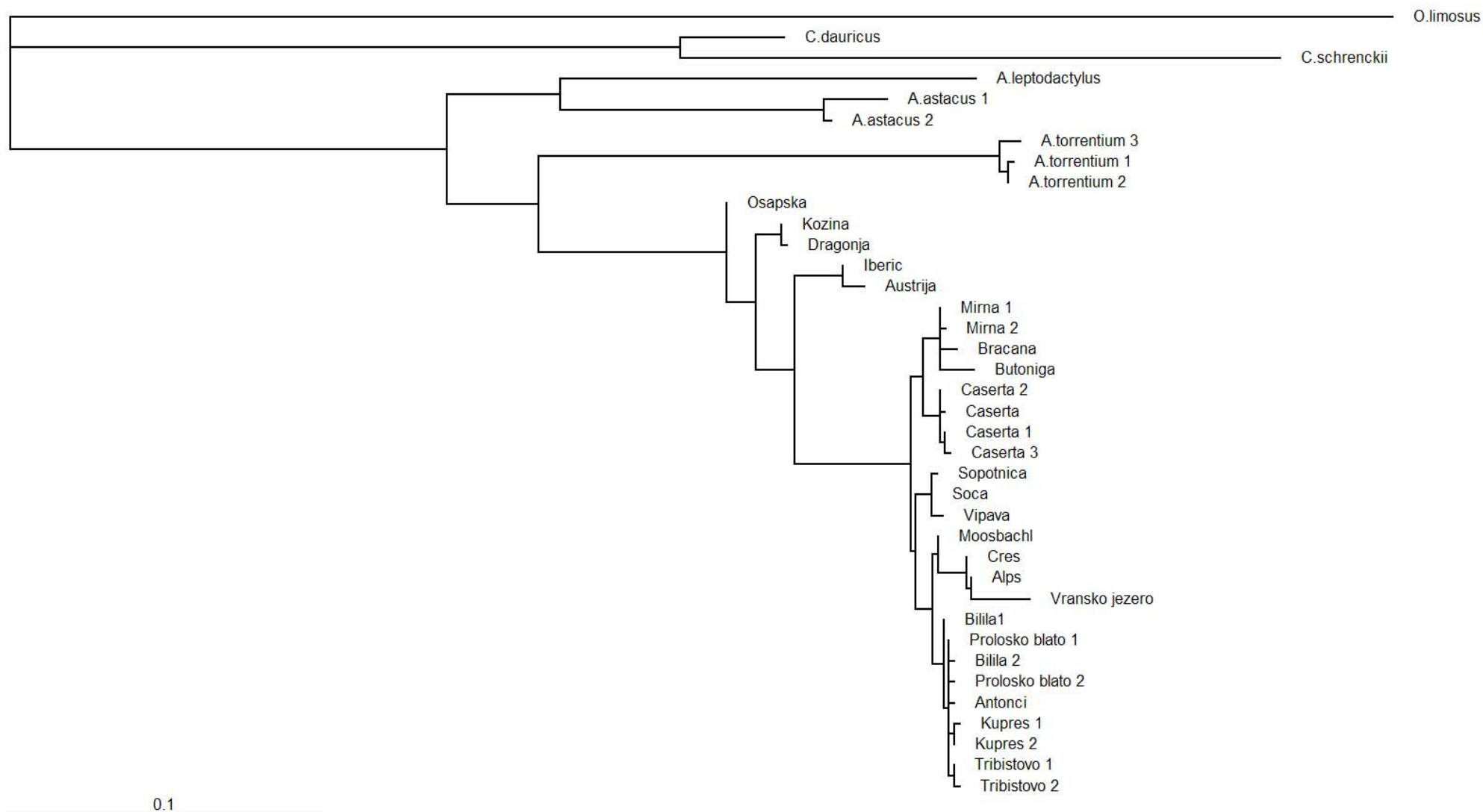
Slika 10. Ukorijenjeni konsenzus filogram odnosa sekvenci gena za 16S rRNA populacija vrste *Austropotamobius pallipes* dobiven metodom maksimalne štedljivosti (eng. *maximum parsimony*). Kratice objašnjene u Tablici 3, 6, 12. Crtica predstavlja gensku udaljenost.



Slika 11. Ukoriženjeni konsenzus filogram odnosa sekvenci gena za COI populacija vrste *Austropotamobius pallipes* dobiven metodom maksimalne štedljivosti (eng. *maximum parsimony*). Kratice objašnjene u Tablici 5, 6, 13. Crtica predstavlja gensku udaljenost.



Slika 12. Ukoričeni konsenzus filogram odnosa sekvenci gena za 16S rRNA populacija vrste *Austropotamobius pallipes* dobiven metodom maksimalne vjerojatnosti (eng. *maximum likelihood*) upotrebom TIM+G modela prema Akaike informacijskom kriteriju. Kratice objašnjene u Tablici 3, 6, 12. Crtica predstavlja gensku udaljenost u broju supstitucija po nukleotidu.



Slika 13. Ukoričeni konsenzus filogram odnosa sekvenci gena za COI populacija vrste *Austropotamobius pallipes* dobiven metodom maksimalne vjerojatnosti (eng. *maximum likelihood*) upotrebom HKY+I+G modela prema Akaike informacijskom kriteriju. Kratice objašnjene u Tablici 5, 6, 13. Crtica predstavlja gensku udaljenost u broju supstitucija po nukleotidu.

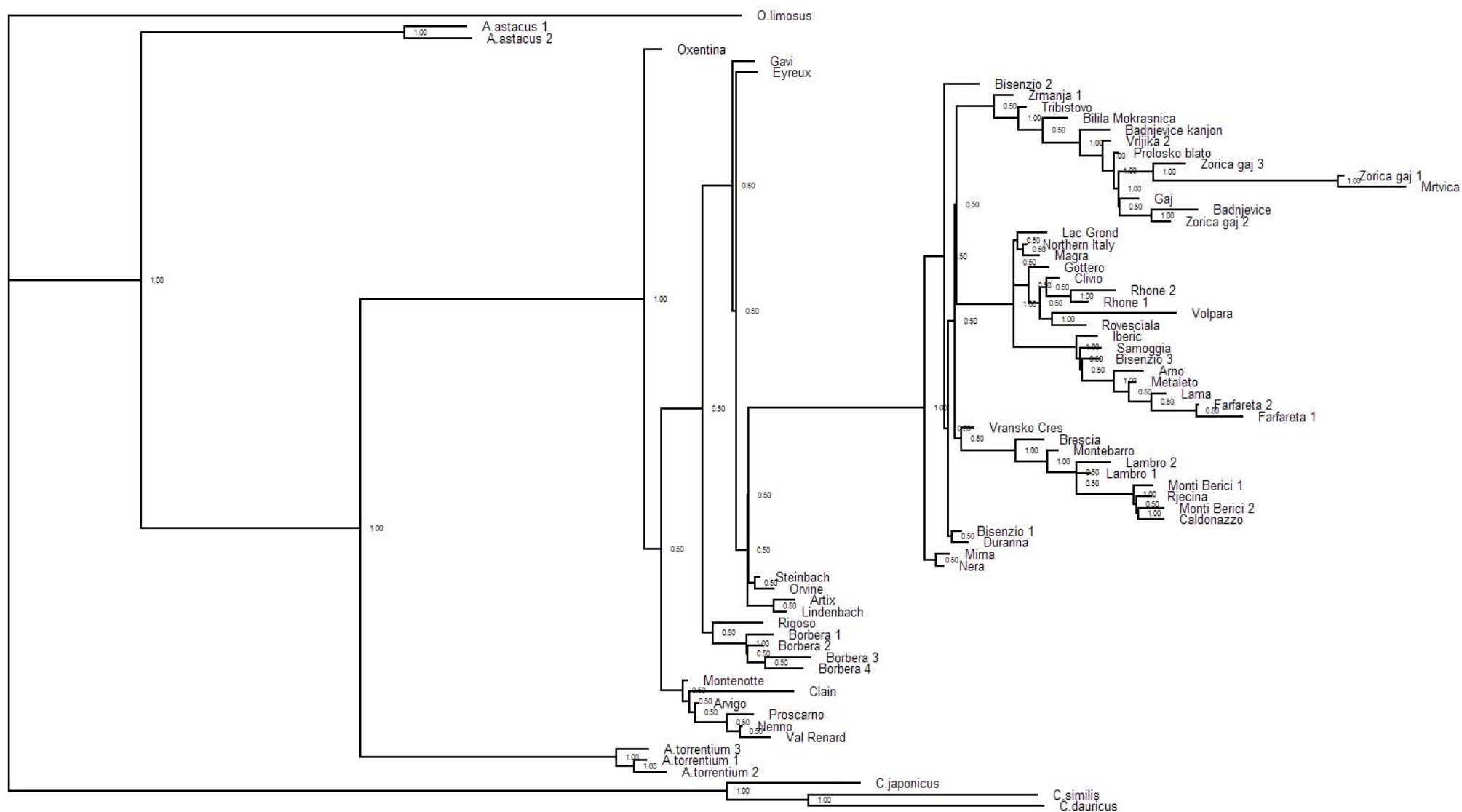
5.5.3. Analiza Bayesian metodom (BA metoda)

Ovo je relativno nova metoda u filogenetskoj analizi, koja postaje metodom izbora kod većine najnovijih filogenetskih istraživanja (Mallatt i sur., 2004; Utevsky i Trontelj, 2004; Waters i Roy, 2004; Wahlberg i sur., 2005; Verovnik i sur., 2005). Bayesian analiza (Rannala i Yang, 1996; Mau i Newton, 1997; Mau i sur., 1999) temelji se na spoznaji o vjerojatnostima koje su procijenjene na osnovi nekog modela tzv. naknadnim vjerojatnostima (eng. *posterior probabilities*).

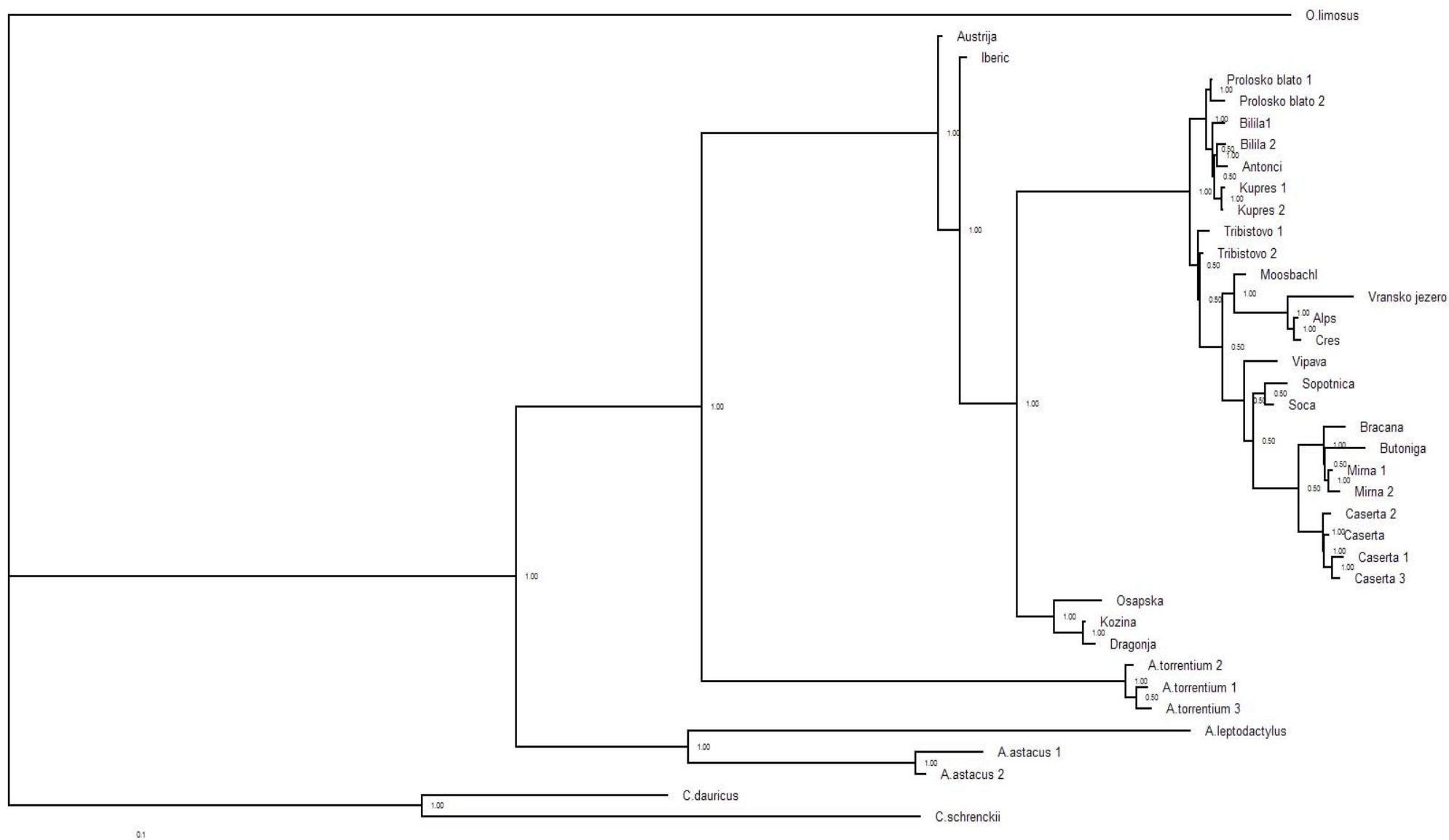
Bayesian analiza provedena je pomoću programa **MR. BAYES 3.1.1** (Ronquist i Huelsenbeck, 2003) upotrebom metode „*Metropolis-coupled Markov Chain Monte Carlo*“ koja se temelji na nizu neovisnih potraga za skupom najboljih stabala s povremenim izmjenama informacija između potraga (Mau i sur., 1999).

Rezultat analize su ukorijenjeni filogrami odnosa sekvenci za 16S rRNA (Slika 14.) i COI gene (Slika 15.) s vrijednostima naknadnih vjerojatnosti u čvorištima grananja koja predstavljaju alternativu vrijednostima samoučitanja. Filogrami su naknadno vizualizirani i grafički obrađeni pomoću programa **TREEVIEW 1.6.6** (Page, 2001).

Za nekodirajuće sekvence gena 16S rRNA i COI korišteni su skupovi naredbi prema (Franjević, 2006). Ovim skupovima naredbi provedena je analiza prema evolucijskom modelu HKY85 s gama distribucijom koristeći karakteristike mitohondrijskog koda za skupinu Metazoa isključujući kralježnjake (Hasegawa i sur., 1985). Na kraju je iz grupe najboljih analiziranih sekvenci stabala konstruirano konsenzus stablo s vrijednostima naknadne vjerojatnosti pojedinog grananja uz izuzeće prvih 1000 stabala s ciljem postizanja ravnotežnog stanja vjerojatnosti stabala.



Slika 14. Ukoričeni konsenzus filogram odnosa sekvenci gena za 16S rRNA vrste *Austropotamobius pallipes* dobiven Bayesian analizom prema HKY85 modelu s gama distribucijom Hasegawa i sur., 1985) upotrebom metode „Metropolis-coupled Markov Chain Monte Carlo“. Kratice objašnjene u Tablici 3, 6, 12. Brojevi u čvorištima predstavljaju vrijednosti naknadnih vjerojatnosti. Crtica predstavlja gensku udaljenost u broju supstitucija po nukleotidu.



Slika 15. Ukorijenjeni konsenzus filogram odnosa sekvenci gena za COI vrste *Austropotamobius pallipes* dobiven Bayesian analizom prema HKY85 modelu s gama distribucijom (Hasegawa i sur., 1985) upotrebom metode „Metropolis-coupled Markov Chain Monte Carlo“. Kratice objašnjene u Tablici 5, 6, 13. Brojevi u čvorištima predstavljaju vrijednosti naknadnih vjerojatnosti. Crtica predstavlja gensku udaljenost u broju supstitucija po nukleotidu.

5.6. Genska udaljenost (p) i nukleotidna raznolikost (π)

Podrobnom analizom dobivenih filograma, ustanovljeno je da se haplotipovi analiziranih genskih sekvenci mogu grupirati kod markera za 16S rRNA u četiri manje, odnosno dvije veće, a kod markera za COI u četiri filogeografske skupine, tzv. haplogupe (Slika 16, 18.). Haplogrupama su dodijeljena imena proizvoljno i ne moraju odgovarati stvarnom geografskom položaju uzorkovanja. Unutar svake haplogrupe nalazi se više haplotipova (Tablica 15.) Svaki haplotip karakterizira jedinstven slijed nukleotida. Između sekvenci unutar istog haplotipa ne postoji nikakva genetička udaljenost (eng. *pairwise distance*).

Tablica 15. Haplogrupe i haplotipovi obrađenih sekvenci 16S rRNA i COI gena. *A. italicus* i *A. pallipes* predstavljaju primarne haplogrupe.

		HAPLOGRUPA	HAPLOTIP
16S rRNA	<i>A. italicus</i>	BALKAN	Vransko Cres, Zrmanja 1, Tribistovo, Bilila Mokrašnica, Vrljika 2, Badnjevice kanjon, Prološko blato, Gaj, Zorića gaj 1, Zorića gaj 2, Zorića gaj 3, Badnjevice, Mrtvica, Duranna, Bisenzio 1, Bisenzio 2, Mirna, Nera
		APENIN	Brescia, Lambro 1, Lambro 2, Montebarro, Rječina, Monti Berici 1, Monti Berici 2, Caldonazzo
		ALPE	Northern Italy, Magra, Clivio, Gottero, Lac Grond, Rhone 1, Rhone 2, Samoggia, Bisenzio 3, Iberic, Metaletto, Lama, Arno, Farfareta 1, Farfareta 2, Volpara, Rovesciala
	<i>A. pallipes</i>	ZAPAD	Gavi, Val Renard, Steinbach, Orvine, Lindenbach, Arvigo, Montenotte, Clain, Oxentina, Proscarno, Eyreux, Rigoso, Artix, Nenzo, Borbera 1, Borbera 2, Borbera 3, Borbera 4
COI	BALKAN		Mosbachl, Bilila 1, Bilila 2, Prološko blato 1, Prološko blato 2, Antonci, Kupres 1, Kupres 2, Tribistovo 1, Tribistovo 2, Cres, Alps, Vransko jezero, Vipava, Sopotnica, Soča
	ISTRA		Bračana, Mirna 1, Mirna 2, Butoniga, Caserta 1, Caserta 2, Caserta 3, Caserta 4
	ZAPAD		Iberic, Austrija
	SLOVENIJA		Osapska, Kozina, Dragonja

Tijekom evolucije, sekvence koje su potekle od nekog zajedničkog pretka nakupljaju promjene kao rezultat djelovanja evolucijskih procesa. Najjednostavniji način za mjerenje divergencije među sekvencama je brojanje pozicija na kojima se razlikuju. Udio različitih homolognih mjesta je tzv. uočena udaljenost (eng. *observed distance*), poznata i kao p -udaljenost ili genska udaljenost (eng. *p-distance*) koja se izražava kao broj nukleotidnih razlika po mjestu unutar gena. Genska udaljenost (p) je, dakle,

vrijednost koja govori koliko se dvije uspoređivane sekvence razlikuju, a izračunava se dijeljenjem broja razlika sa brojem nukleotida uspoređivanih sekvenci (Nei i Kumar, 2000). Može se izračunavati za bilo koju poziciju u kodonu, a zbog ovisnosti varijabilnosti sekvenci o mjestu u kodonu (0,1 / 0,007 / 1 za prvu / drugu / treću poziciju u kodonu) koristi se kodon-specifično izračunavanje genske udaljenosti između različitih sekvenci (Trontelj i sur., 2005). Kod visoke učestalosti supstitucija, p-udaljenost može znatno podcijeniti stvaran broj supstitucija koje su se dogodile.

Genska udaljenost je u ovom istraživanju izračunata upotrebom programa **MEGA 3.1.** (Kumar i sur., 2007), a kako taj program nema HKY modela s gama distribucijom, u izračunavanju je korišten Tamura i Nei model s gama distribucijom, kao najbliži modelu HKY (Nei i Kumar, 2000).

Nukleotidna raznolikost (π) predstavlja vrijednost koja pokazuje raznolikost nukleotidnih sekvenci unutar određene skupine haplotipova, odnosno haplogrupe. Prosječna nukleotidna raznolikost je u ovom istraživanju izračunata upotrebom programa **MEGA 3.1.** (Kumar i sur., 2007). Kao i kod izračunavanja genske udaljenosti, zbog nedostatka modela HKY u programu, pri izračunavanju nukleotidne raznolikosti korišten je Tamura i Nei model s gama distribucijom, kao najbliži modelu HKY (Nei i Kumar, 2000).

Rezultati izračuna genske udaljenosti i nukleotidne raznolikosti gena za 16S rRNA i COI prikazani su u Tablici 16. i Tablici 17.

Tablica 16. Prosječna genetička udaljenosti (p) između pojedinih haplogrupa \pm standardna devijacija te nukleotidna raznolikost (π) unutar pojedinih haplogrupa \pm standardna devijacija kod 16S rRNA markera.

	<i>A. pallipes</i>	<i>A. italicus</i>	BALKAN	APENIN	ALPE
<i>A. pallipes</i>	$\pi = 0,004 \pm 0,005$	p = 0,044 \pm 0,012	p = 0,048 \pm 0,012	p = 0,034 \pm 0,009	p = 0,045 \pm 0,011
<i>A. italicus</i>		$\pi = 0,029 \pm 0,009$	-	-	-
BALKAN			$\pi = 0,019 \pm 0,008$	p = 0,032 \pm 0,011	p = 0,040 \pm 0,010
APENIN				$\pi = 0,003 \pm 0,003$	p = 0,035 \pm 0,007
ALPE					$\pi = 0,011 \pm 0,008$

Tablica 17. Prosječna genetička udaljenosti (p) između pojedinih haplogrupa \pm standardna devijacija te nukleotidna raznolikost (π) unutar pojedinih haplogrupa \pm standardna devijacija kod COI markera.

	SLOVENIJA	ZAPAD	ISTRA	BALKAN
SLOVENIJA	$\pi = 0,012 \pm 0,009$	$p = 0,038 \pm 0,008$	$p = 0,065 \pm 0,012$	$p = 0,063 \pm 0,014$
ZAPAD		$\pi = 0,007 \pm 0,001$	$p = 0,062 \pm 0,009$	$p = 0,060 \pm 0,010$
ISTRA			$\pi = 0,012 \pm 0,006$	$p = 0,026 \pm 0,009$
BALKAN				$\pi = 0,014 \pm 0,009$

5.7. Vrijeme razdvajanja

Vrijeme divergencije između haplogrupa izračunato je za svaki marker posebno, upotrebom određenog molekuskog sata. Za gen 16S rRNA molekulski sat pretpostavlja 0,0065 - 0,009 (0,65% - 0,9%) promjena po poziciji u genetskom kodu mitohondrijske DNA u milijun godina (Sturbauer i sur., 1996; Schubart i sur., 1998). Primijenjeni molekulski sat izvorno je izrađen za morske deseteronožne rakove, ali je već uspješno korišten i u istraživanjima na slatkovodnim deseteronožnim rakovima (Marijnissen i sur., 2006). Vrijeme odvajanja između svih geografskih haplogrupa temeljeno na molekulskom satu gena 16S rRNA prikazano je u Tablici 18.

Tablica 18. Procjena vremena odvajanja između geografskih haplogrupa temeljeno na molekulskom satu gena za 16S rRNA. Vrijeme je izraženo u milijunima godina.

	<i>A. italicus</i>	BALKAN	APENIN	ALPE
<i>A. pallipes</i>	6,77 – 4,89	7,38 – 5,33	5,23 – 3,78	6,92 – 5,00
BALKAN			4,92 – 3,56	6,15 – 4,44
APENIN				5,38 – 3,89

Vrijeme razdvajanja prema mitohondrijskom genu za COI izračunato je prema molekularnom satu temeljenom na prosječnoj stopi nukleotidnih supstitucija po milijun godina kod deseteronožnih rakova, koji iznosi 0,02 tj. 2% (Wares i Cunningham, 2001). Vremena odvajanja između svih geografskih haplogrupa temeljena na molekulskom satu gena COI prikazana su u Tablici 19.

Tablica 19. Procjena vremena odvajanja između geografskih haplogrupa temeljeno na molekulskom satu gena za COI. Vrijeme je izraženo u milijunima godina.

	ZAPAD	ISTRA	BALKAN
SLOVENIJA	oko 1,90	oko 3,25	oko 3,15
ZAPAD		oko 3,10	oko 3,00
ISTRA			oko 1,30

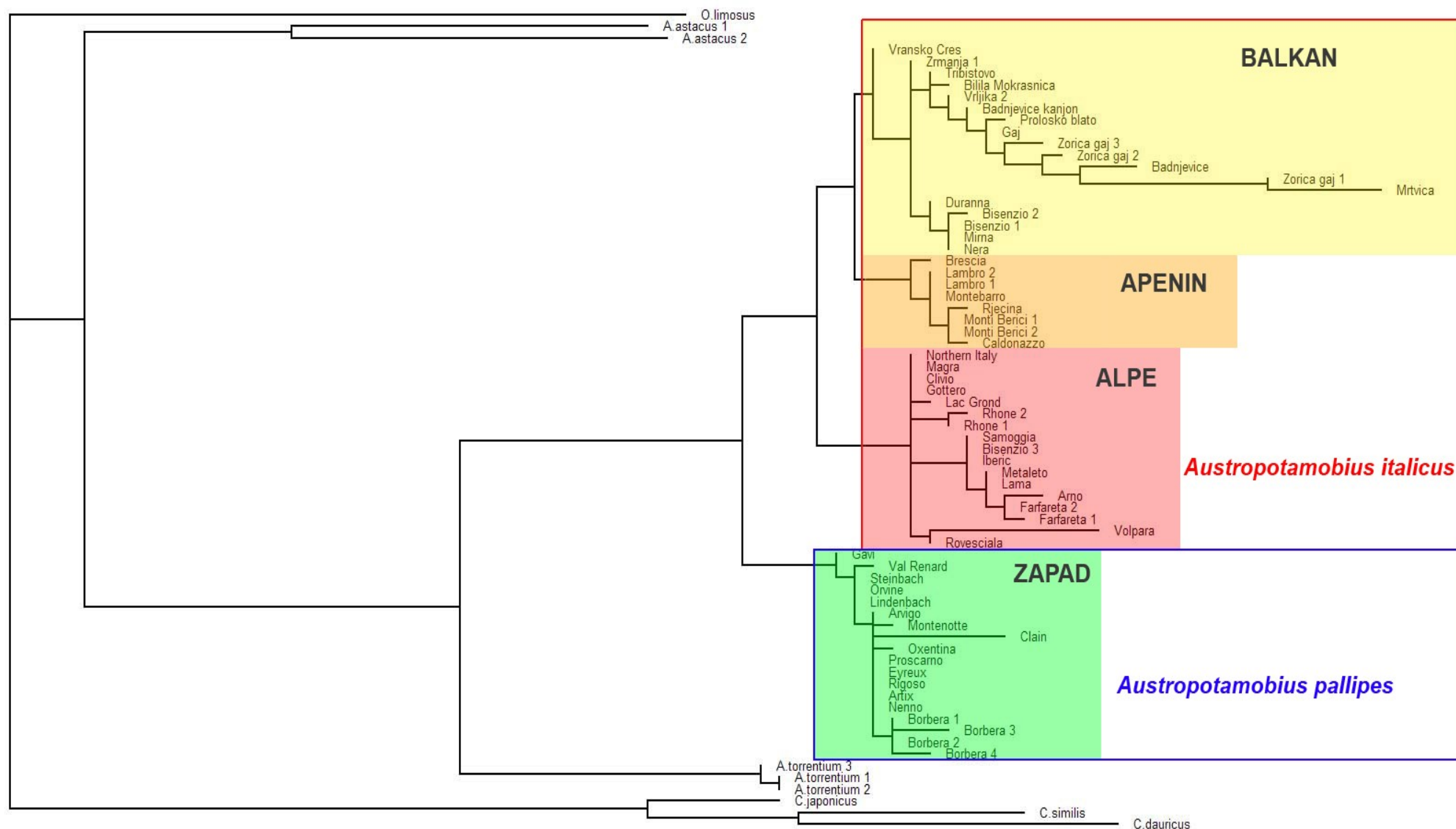
V. RASPRAVA

6. RASPRAVA

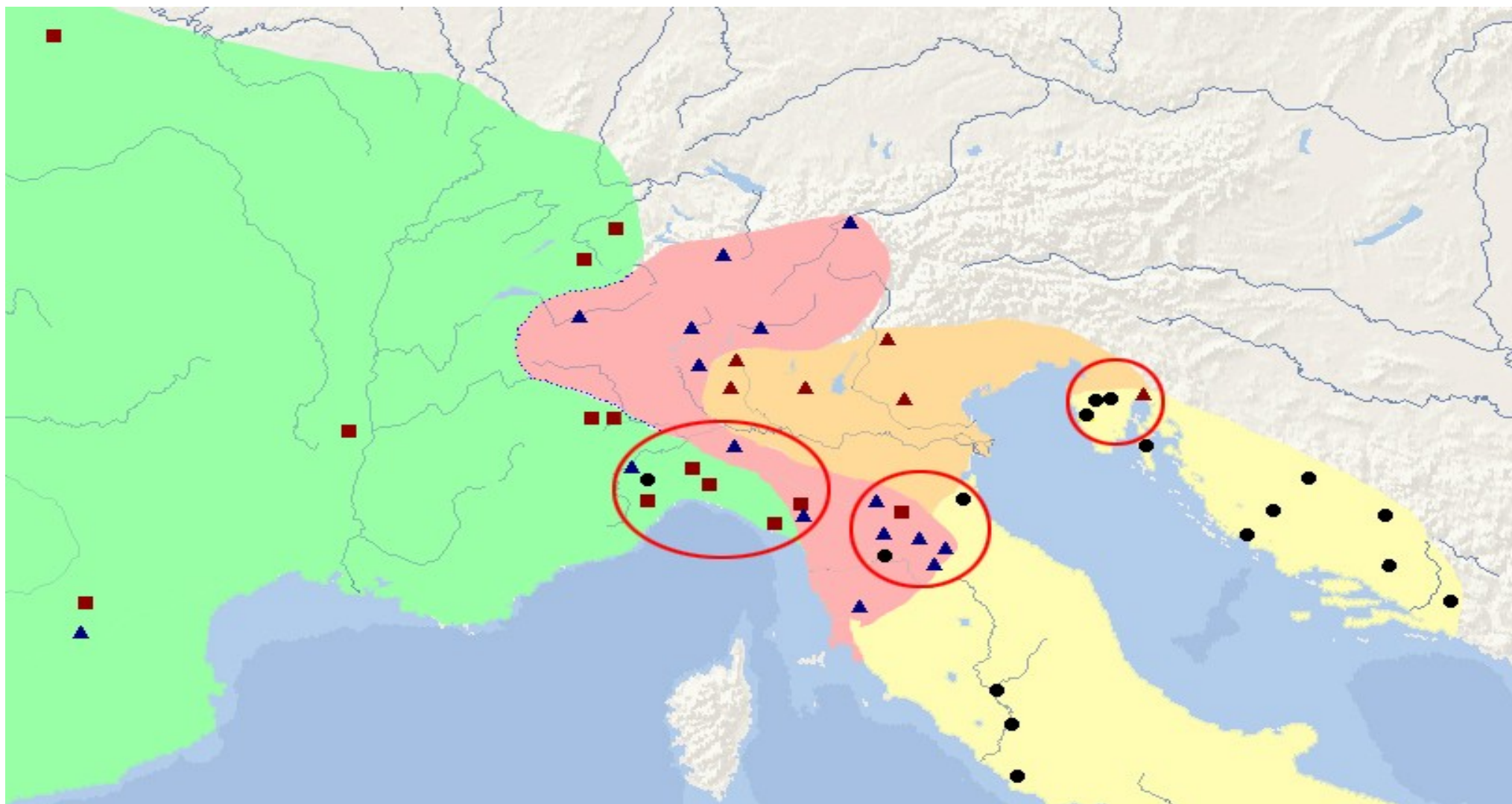
Usprkos činjenici da su u ovom istraživanju prilikom filogenetskih analiza upotrebljene tri danas najčešće korištene molekularno-filogenetske metode (MP, ML i BA), diskusija će biti provedena samo na temelju filograma dobivenih analizom najveće štedljivosti – MP. Ovakav pristup odabran je zbog toga što su sve metode dale vrlo slične rezultate, a upravo MP filogrami pokazuju najbolju sublimaciju rezultata sve tri provedene metode te se njihovim tumačenjem rezultati oba analizirana markera (16S rRNA i COI) prikladno međusobno nadopunjuju.

Kao što je navedeno u rezultatima ovog istraživanja (Tablica 15.), analizom MP filograma utvrđeno je da se svi obrađeni haplotipovi mogu smjestiti u određenu filogeografsku skupinu, tzv. haplogrupu. Analiza markera 16S rRNA pokazala je da se na filogramu jasno odvajaju četiri haplogrupe proizvoljno nazvane: Balkan, Apenin, Alpe i Zapad (Slika 16.). U slučaju biljega COI, MP filogram je pokazao odvajanje haplotipova u, također, četiri haplogrupe nazvane: Balkan, Istra, Zapad i Slovenija (Slika 18.).

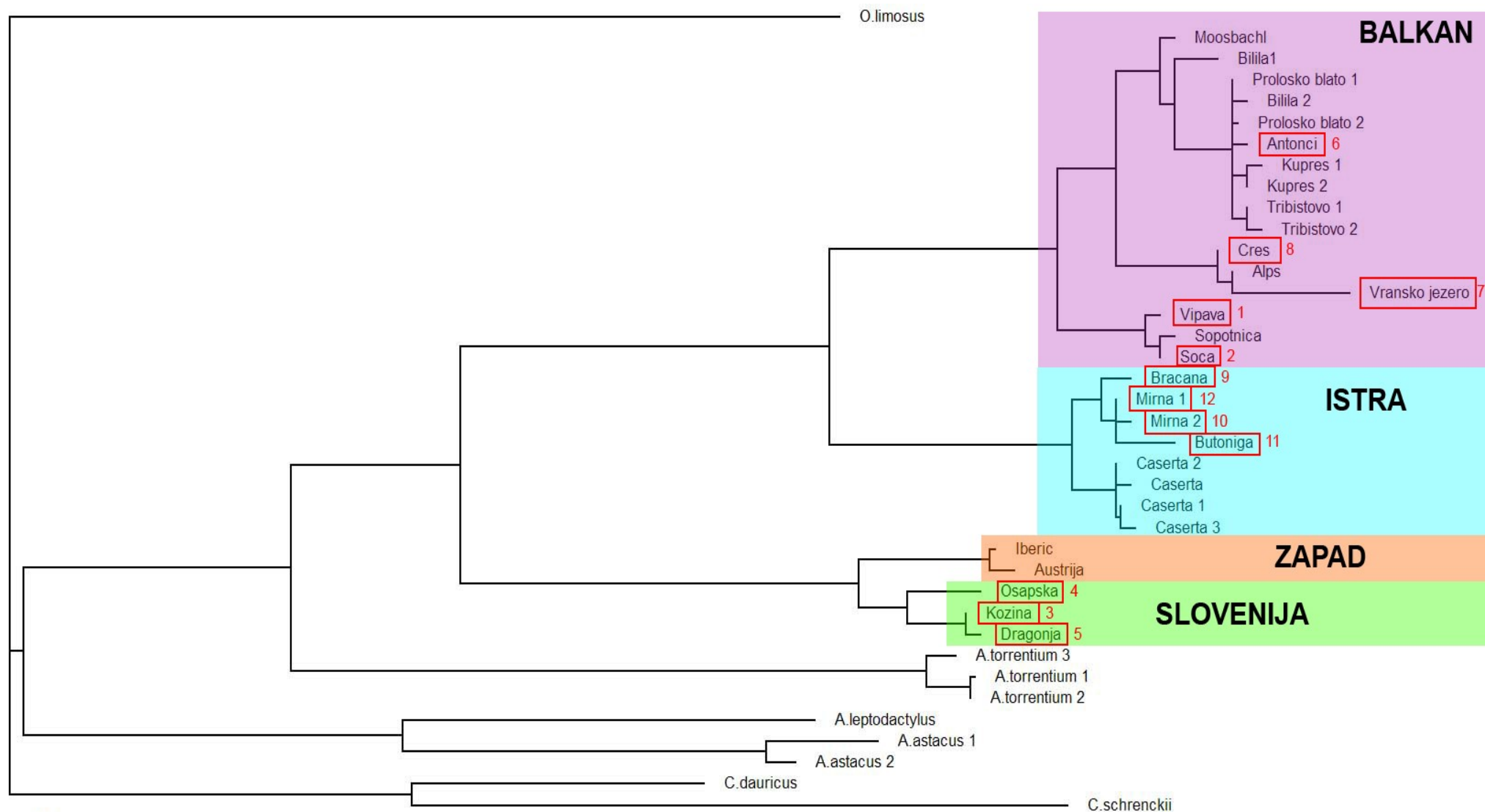
Analizom nukleotidne raznolikosti (π) unutar haplogrupa biljega 16S rRNA, utvrđeno je da se ona nalazi u granicama između 0,3% ($0,003 \pm 0,003$) (haplogrupa Apenin) i 1,9% ($0,019 \pm 0,008$) (haplogrupa Balkan). Kod gena COI, najveću vrijednost nukleotidne raznolikosti pokazala je haplogrupa Balkan, 1,4% ($0,014 \pm 0,009$), dok je najmanja vrijednost kod haplogrupe Zapad, 0,7% ($0,007 \pm 0,001$). Ovako atipično mala nukleotidna raznolikost, najvjerojatnije je rezultat činjenice da haplogrupu Zapad kod COI gena čine samo dva haplotipa, što ne odgovara realnoj situaciji u prirodi. Za realniju sliku o stvarnom stanju bilo bi potrebno dodatno istraživanje koje bi uključivalo veći broj sekvenci s tog područja. S druge strane, relativno visoka π -vrijednost Balkan haplogrupe kod oba biljega u skladu je s istraživanjima drugih autora slične tematike, osobito ako obratimo pozornost gdje su areali rasprostranjenja životinja koje spadaju u te haplogrupe (Slika 17, 19.). Sličnu, visoku diferencijaciju mitohondrijskih haplotipova unutar haplogrupe utvrdio je Trontelj i sur. (2005) u vrlo sličnom i bliskom području onim područjima gdje su uzorkovane životinje korištene u ovom istraživanju, a koje spadaju u haplogrupu Balkan kod oba markera. Osim njega, slično je potvrđeno i na izopodnim rakovima vrste *Asellus aquaticus* (Verovnik i sur., 2005). Sva ta istraživanja upućuju na zaključak da je područje krša Dinarida zapadnog Balkana poslužilo kao višestruki refugij



Slika 16. Haplogrupe i pripadajući haplotipovi filograma mitohondrijskog biljega 16S rRNA izrađenog MP metodom.

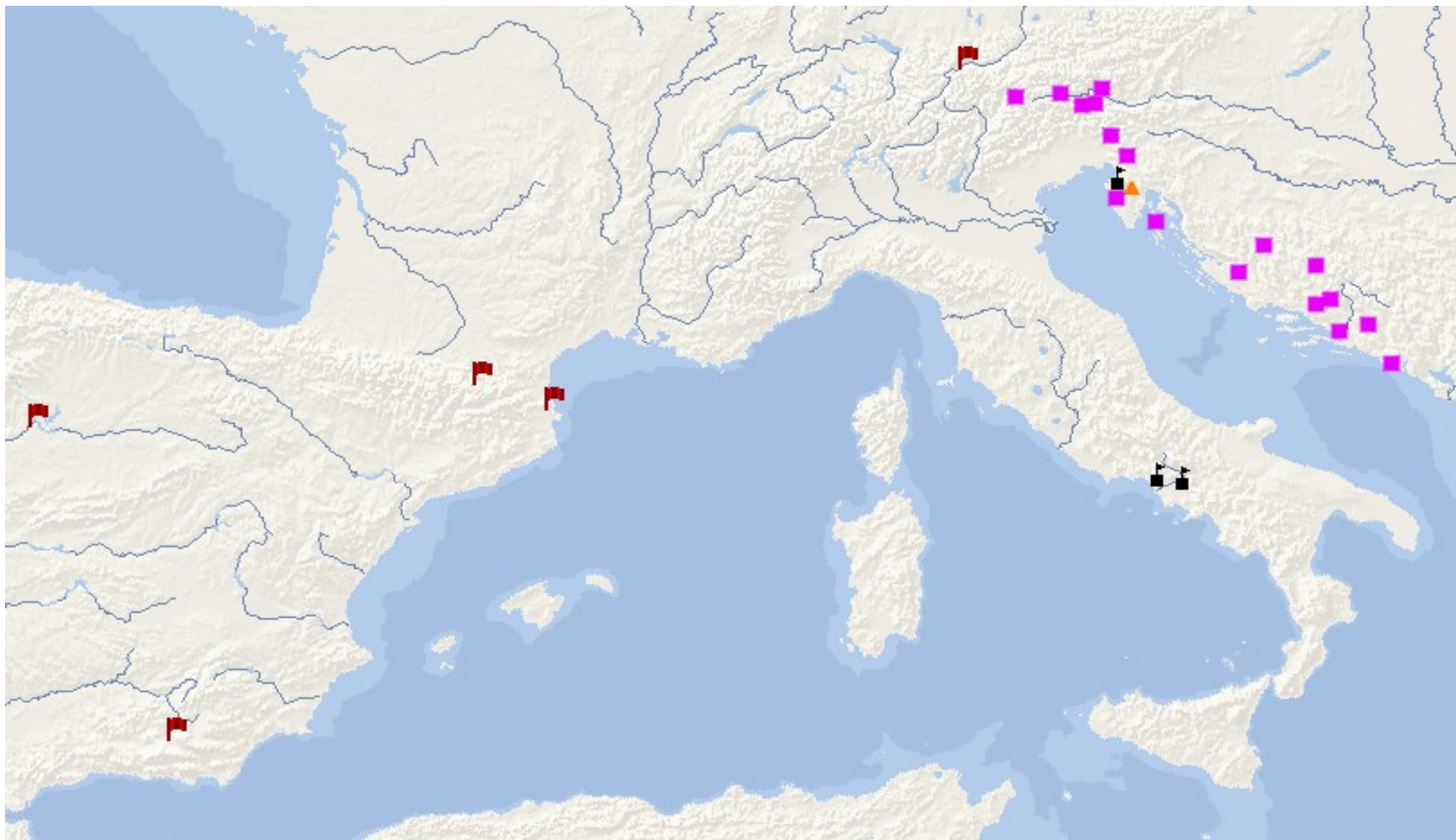


Slika 17. Neki od lokaliteta rasprostranjenosti haplotipova 16S rRNA biljega. Jedan simbol može označavati i veći broj geografski bliskih lokaliteta odnosno haplotipova unutar iste haplogrupe. Haplogrupe: crni kružić – Balkan, crveni trokutić – Apenin, plavi trokutić – Alpe, crveni kvadratić – Zapad, prema (Slici 16). Boje područja rasprostranjenosti pojedine haplogrupe identične su bojama haplogrupe (Slika 16.). Crvenom bojom zaokružena područja predstavljaju područja preklapanja dvije ili više haplogrupa. Plava isprekidana crta označava granicu razdvajanja vrsta *A. pallipes* i *A. italicus*.



10

Slika 18. Haplogrupe i pripadajući haplotipovi filograma mitohondrijskog biljega COI izrađenog MP metodom. Crvenom bojom zaokruženi haplotipovi se geografski pojavljuju na širem teritoriju Istre (Slika 20.)



Slika 19. Neki od lokaliteta rasprostranjenosti haplotipova COI biljega. Jedan simbol može označavati i veći broj geografski bliskih lokaliteta odnosno haplotipova unutar iste haplogrupe. Haplogrupe: ljubičasti kvadratić – Balkan, narančasti trokutić – Istra, crvena zastavica – Zapad, crna zastavica – Slovenija, prema (Slici 18).

tijekom minulih ledenih doba što je kao posljedicu ostavilo visok stupanj nukleotidne raznolikosti kod mnogih organizama. Pored toga, visoka genska raznolikost unutar Balkan haplogrupe kod 16S rRNA markera može se tumačiti i geografskom izoliranošću životinja Apeninskog i Balkanskog poluotoka Jadranskim morem od kraja Mesinske krize na ovamo, što je zbog prestanka razmjene genetskog materijala povećalo međusobne razlike u genetskom sastavu jedinki koje u ovom istraživanju pripadaju u istu haplogrupu, a geografski areali su im na centralnom i južnom Apeninu te zapadnom Balkanu.

Nekoliko autora je pokušalo u prošlosti riješiti taksonomiju ovih rakova na osnovi razlike u morfološkim karakteristikama. Unutar vrste *Austropotamobius pallipes* Bott (1950) razlikuje tri podvrste na temelju morfoloških kriterija. Podvrsta *Austropotamobius pallipes pallipes* (Lereboullet, 1858) po njemu je najzastupljenija u području limitiranom Pirinejama s jedne, Alpama s druge te Engleskom i Irskom s treće strane. Podvrsta *Austropotamobius pallipes lusitanicus* je ograničena na Pirinejski poluotok, dok podvrsta *Austropotamobius pallipes italicus* naseljava područja u Italiji, Sloveniji, Austriji i Švicarskoj. Nasuprot tome, Karaman (1961) razlikuje dvije vrste, *Austropotamobius pallipes* i *Austropotamobius italicus*, međutim on odlazi i korak dalje te vrstu *A. italicus* dijeli na tri podvrste: *A. i. italicus*, *A. i. lusitanicus* i *A. i. carsicus* čiji se areal prostire na krškom području bivše Jugoslavije. U skorije vrijeme, napretkom molekularno filogenetskih metoda, Grandjean i sur. (2000) na osnovi genetičke udaljenosti (p) gena za 16S rRNA od 4,6% ($0,046 \pm 0,009$) između dvije velike haplogrupe, predlažu podjelu kompleksa vrste *Austropotamobius pallipes* na dvije odvojene vrste – *A. pallipes* i *A. italicus*. Nadalje, u istom radu unutar vrste *A. italicus* autori na temelju molekularno filogenetskih dokaza definiraju tri podvrste *A. i. italicus*, *A. i. carinthiacus* i *A. i. carsicus*. Temeljem genetičke udaljenosti istog gena od 4,18% ($0,042 \pm 0,006$) Fratini i sur. (2005) također razlikuju dvije vrste: *A. pallipes* i *A. italicus* i slično kao i Grandjean i sur. (2000) vrstu *A. italicus* dijele na iste tri podvrste (*A. i. italicus*, *A. i. carinthiacus*, *A. i. carsicus*) te im priključuju i četvrtu podvrstu – *A. i. meridionalis* čiji se areal prostire na čitavom južnom dijelu Apeninskog poluotoka te joj je pridružen i jedan haplotip iz Slovenije. Zaccara i sur. (2005) na temelju genetičke udaljenosti između haplogrupa od $6,51\% \pm 0,42\%$ potvrđuju rezultate drugih istraživanja, ali koristeći se COI markerom. Njihovi rezultati ukazuju na postojanje dvije podvrste u okvirima vrste *A. italicus* na relativno malom istraženom području sustava rijeke Po u Italiji.

Osvrtom na dobivene rezultate u ovom istraživanju, te njihovom usporedbom sa gore navedenim istraživanjima, razlika u genetičkoj udaljenosti markera 16S rRNA

između *A. pallipes* haplogupe i *A. italicus* haplogrupe (koju skupa čine tri druge haplogrupe – Balkan, Apenin, Alpe) (Slika 16.), a koja iznosi 4,4% ($0,044 \pm 0,012$), nedvosmisleno ide u prilog hipotezi da se unutar kompleksa vrste *Austropotamobius pallipes* nalaze dvije odvojene vrste. Tu činjenicu potkrepljuju i rezultati pojedinačne analize genske udaljenosti između svake pojedine haplogrupe, koje skupa čine takson *italicus*, (Balkan, Apenin, Alpe) i haplogrupe *pallipes* koji iznose: *A. pallipes* – Balkan: 4,8% ($0,048 \pm 0,012$); *A. pallipes* – Apenin: 3,4% ($0,034 \pm 0,009$); *A. pallipes* – Alpe: 4,5% ($0,045 \pm 0,011$). Zanimljivi su i rezultati analize međusobnih genskih udaljenosti gena 16S rRNA između pojedinih haplogrupa unutar taksona *italicus*. Naime, relativno visoke vrijednosti genske udaljenosti između haplogrupa: Balkan – Apenin 3,2% ($0,032 \pm 0,011$); Balkan – Alpe 4,0% ($0,040 \pm 0,010$) te Apenin – Alpe 3,5% ($0,035 \pm 0,007$) ukazuju da se životinje unutar kompleksa vrste zbilja nalaze na razini više podvrsta kao što to predlažu Grandjean i sur. (2000) i Fratini i sur. (2005). Rezultati analize genske udaljenosti markera COI (Tablica 17.) također potkrepljuju ovakvo tumačenje rezultata analize biljega 16S rRNA. Vrijednosti genske udaljenosti između haplogrupa koje u prosjeku iznose 5,2%, a kreću se u rasponu od 2,6% ($0,026 \pm 0,009$) između haplogrupa Balkan i Istra do 6,5% ($0,065 \pm 0,012$) između haplogrupa Istra i Slovenija, odgovaraju razini vrijednosti genske udaljenosti između vrsta po procjeni koju su objavili Sinclar i sur. (2004) (Tablica 20.).

Tablica 20. Procjene genetičke udaljenosti (granične vrijednosti i prosječna vrijednost) na različitim taksonomskim razinama za pet različitih genskih markera: 16S, 12S, COI, 18S i 28S. Preuzeto iz (Sinclar i sur., 2004).

TAKSONOMSKA RAZINA	16S	12S	COI	18S	28S
Unutar vrste	0.000 - 0.068 (0.025)	0.003 - 0.006 (0.005)	0.002 - 0.004 (0.003)	-	-
Između vrsta	0.002 - 0.147 (0.057)	0.03 - 0.16 (0.09)	0.059	-	-
Između rodova	0.100 - 0.195 (0.133)	0.09 - 0.16 (0.12)	0.117 (0.026)	0.005 - 0.038 (0.155)	0.012 - 0.228 (0.074)
Između natporodica	0.233 - 0.250 (0.242)	0.19 - 0.28 (0.23)	0.20 - 0.32 (0.25)	0.037 - 0.060 (0.047)	0.179 - 0.291 (0.232)

Geografski položaj dobivenih haplogrupa također je zanimljiv. Analiza markera 16S rRNA pokazala je četiri jasno diferencirane haplogrupe (Slika 16, 17.) od kojih tri haplogrupe skupa čine takson *A. italicus* dok četvrta, zasebno predstavlja takson *A.*

pallipes. Areal rasprostranjenja haplogrupe Balkan ograničen je na područje Dinarida s jedne i područje centralnog i južnog dijela Italije, s druge strane. Analizom istraživanja koje su proveli Fratini i sur. (2005) vidljivo je da se areal podvrste koju autori nazivaju *Austropotamobius italicus meridionalis* poklapa s arealom nekoliko haplotipova unutar haplogrupe Balkan. Ovakva genetska bliskost može se objasniti suhozemnom vezom koja je vladala između Balkanskog i Apeninskog poluotoka tijekom povlačenja razine Jadranskog mora za vrijeme Mesinske krize. U prilog toj teoriji ide i zanimljiv nalaz haplotipa pronađenog u Sloveniji kojeg Fratini i sur. (2005) svrstavaju pod podvrstu *A. i. meridionalis*. Do daljnjeg nejasno ostaje da li su haplotipovi pronađeni na Apeninskom poluotoku krivo svrstani u podvrstu *A. i. meridionalis*, odnosno da li bi ipak bilo prirodnije da spadaju pod podvrstu *A. i. carsicus* koju opisuje Karaman (1961), a potvrđuju Grandjean i sur. (2000) i Fratini i sur. (2005) ili su svi haplotipovi balkanskog dijela haplogrupe Balkan ipak u ranijim istraživanjima krivo determinirani kao *A. i. carsicus*, a trebali bi, shodno svojim genetičkim obilježjima, biti nazvani *A. i. meridionalis*. Bilo kako bilo, činjenica je da su apeninski i balkanski dio haplogrupe Balkan pokazali visoki stupanj filogenetske srodnosti te je za očekivati da budu jedna podvrsta. Dodatna istraživanja koja bi uključivala veći broj uzoraka iz južnog i centralnog dijela Italije su svakako poželjna.

Što se tiče ostale tri haplogrupe analizirane pomoću markera 16S rRNA, one se u velikoj mjeri podudaraju s podvrstama koje definira Fratini i sur. (2005). Haplogrupa Apenin ima gotovo u potpunosti isti areal rasprostranjenja kao podvrsta *A. i. carsicus* kod Fratini i sur. (2005) te se shodno tome istraženi haplotipovi koji spadaju u ovu haplogrupu mogu proglasiti podvrstom *A. i. carsicus*.

Haplogrupa Alpe pokazuje zanimljiv areal rasprostranjenosti haplotipova koji se svojim sjevernim dijelom podudara s podvrstom *A. i. carinthiacus* (Fratini i sur., 2005) dok južni dio, koji je u ovom istraživanju također dio iste podgrupe, Fratini i sur. (2005) definiraju kao podvrstu *A. i. italicus*.

Na posljetku, haplogrupa Zapad predstavlja skupinu haplotipova koji se mogu svrstati u jedinstvenu vrstu *Austropotamobius pallipes*. Rezultati u ovom dijelu istraživanja gotovo se u potpunosti poklapaju sa rezultatima koji su dobiveni u drugim sličnim istraživanjima (Grandjean i sur., 2000; Fratini i sur., 2005; Zaccara i sur., 2005). Granica razgraničenja areala vrste *A. pallipes* i *A. italicus* u slučaju ovog istraživanja je nešto zapadnije nego li to navodi Zaccara i sur. (2005) što je najvjerojatnije posljedica

toga što u tom istraživanju nije bio prisutan uzorak koji je u ovom slučaju minimalno pomjerio granicu prema zapadu.

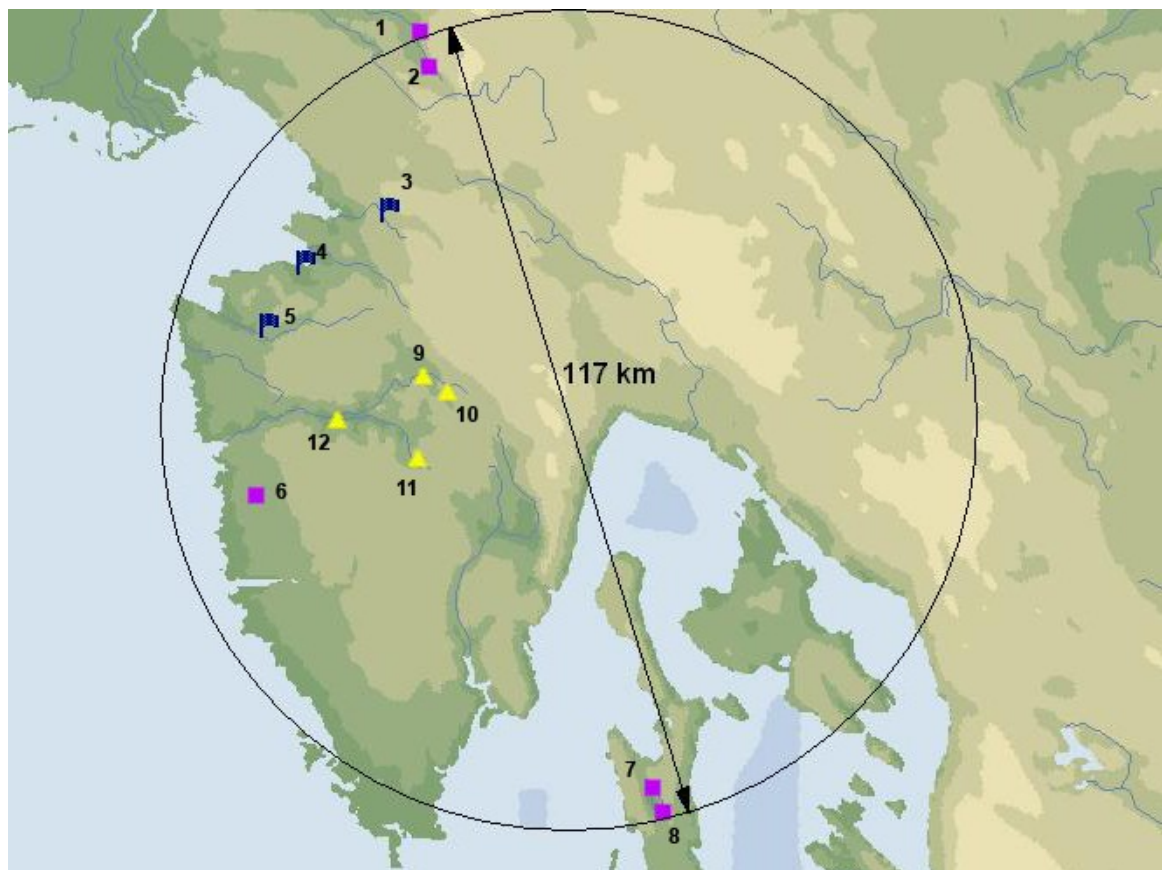
Bitno je napomenuti da se realni areali pojedinih podvrsta ne mogu odrediti na osnovi samo jednog istraživanja te shodno tome postoje područja na kojima dolazi do preklapanja dva ili više areala različitih podvrsta (Slika 17.). Na takvim mjestima moguće je pronaći po dvije podvrste koje naseljavaju isto područje pa i vodotok te se čini da je to posljedica sekundarnog širenja svojiti nakon ledenih doba i to iz više zasebnih refugija. Drugu alternativu za objašnjenje ovakvih pojava predstavlja antropogeni faktor. Različita istraživanja potvrđuju da na takvim mjestima do hibridizacije ne dolazi uopće ili dolazi u vrlo maloj mjeri (Frogia, 1978; Nascetti i sur., 1997; Santucci i sur., 1997).

Općenito, objašnjenja za visoke vrijednosti inter i intraspecijske varijabilnosti mogu se dobiti iz događaja koji su se odvijali od Pleistocena do nedavne prošlosti. Postoje utemeljene tvrdnje (Hewitt, 2000) da su snažne promjene klime tijekom proteklih tri milijuna godina, sa serijama glacijala i interglacijala, u velikoj mjeri utjecale na živi svijet, na način da su pojačale fenomen specijacije i pridonijele najrazličitijim putovima divergencije danas živućih svojiti u Europi, sakrivajući na taj način evolutivne promjene koje su se događale u dalekoj prošlosti. Po teoriji višestrukih refugija koju je predložio Banarescu (1992) dio živog svijeta, kako biljnog, tako i životinjskog, uspio je preživjeti nepovoljne klimatske uvjete tijekom ledenih doba povlačeći se u nekoliko refugija koji su se mogli nalaziti na područjima današnje centralne i južne Italije te dijelovima Balkana, skupa sa Španjolskom, Grčkom i Turskom u kojima su se nalazili tipični pleistocenski refugiji slatkovodnih vrsta (Pretzmann, 1987; Hewitt 1999, 2000). Takvi refugiji su konzekventno postali depoziti i točke širenja ekskluzivnih genetičkih entiteta tijekom interglacijalnih i postglacijalnih događanja. Za sada ostaje nejasno da li je postglacijalno širenje haplotipova Balkan haplogrupe 16S rRNA markera nastupilo iz nekog od hipotetskih refugija na teritoriju današnje Italije ili pak haplogrupa ima drugačije korijene. Do nedavno se smatralo da je alpsko područje bilo utočište najveće genetičke varijabilnosti (a posljedično tome i morfološke) među jedinkama kompleksa vrste *A. pallipes* (Largiadèr i sur., 2000). Međutim, novija istraživanja (Trontelj i sur., 2005) na COI markeru pokazala su da su i druga dva centra genetičkog diverziteta mogla odigrati ključnu ulogu glacijalnih refugija kada je u pitanju kompleks vrste *A. pallipes*. Radi se, naime, o već spomenutom Apeninskom poluotoku te o Istarskom poluotoku. Istra sve do nedavno nije bila smatrana refugijem, ali kada se radi o kompleksu vrsti *A. pallipes*, ona ne samo da predstavlja područje najveće genetičke varijabilnosti, već se čini da je bila i

primarni centar postglacijalnih širenja ove vrste (Trontelj i sur., 2005). Bitno je napomenuti da je Istra postala poluotok tek nakon završetka Pleistocena i zbog toga se ne bi trebala smatrati klasičnim poluotočkim refugijem.

Analiza COI markera i filogeografske rasprostranjenosti haplotipova u ovom istraživanju također potvrđuju hipotezu o Istri kao glacijalnom refugiju. Naime, rezultati su pokazali da je na udaljenosti manjoj od 120 km zračne linije pronađeno čak dvanaest haplotipova koji ulaze u sastav tri različite haplogrupe (Slika 17, 19, 20.).

Ostale tri haplogrupe (izuzev Istre) pokazuju jasno odijeljene areale rasprostranjenosti haplotipova. Ipak, kako bi se dobila jasna slika i o Istri kao refugiju i o detaljnijoj filogeografskoj rasprostranjenosti ovih rakova, potrebna su dodatna istraživanja koja bi obuhvatila veći broj uzoraka, osobno u područjima zapadne Europe te Apeninskog poluotoka.



Slika 20. Haplotipovi analize COI markera pronađeni na širem području Istre. Haplogrupe: ljubičasti kvadratić – Balkan, plava zastavica – Slovenija, žuti trokutić – Istra. Brojevi odgovaraju pojedinim haplotipovima na Slici 17.

Vremena razdvajanja pojedinih haplogrupa izračunata su za oba markera i prikazana u Tablici 18 i Tablici 19. Ipak, od veće informativne vrijednosti je marker za 16S rRNA jer se njegov koeficijent za izračunavanje molekuskog sata nalazi u rasponu vrijednosti (0,65% - 0,9% promjena po poziciji u genetskom kodu mitohondrijske DNA u milijun godina) za razliku od koeficijenta molekuskog sata COI markera koji je singularna vrijednost. Dobiveni rezultati razdvajanja dvije velike skupine, *A. pallipes* i *A. italicus*, pokazali su da se taj događaj odvijao prije između 6,77 – 4,89 milijuna godina. Ovakav rezultat u velikoj mjeri odgovara onome što Trontelj i sur. (2005) navode u svojem istraživanju. Oni govore o razdvajanju dvije velike skupine haplotipova: prvoj koju nazivaju „Skupinom zapadne Europe”, a koja odgovara skupini *A. pallipes* iz ovog istraživanja i drugoj koju nazivaju „Skupinom sjeverozapadne Italije”, a koja svojim većim dijelom odgovara skupini *A. italicus* iz ovog istraživanja (Slika 16.). Kao vrijeme razdvajanja Trontelj i sur. (2005) navode period ranog Pliocena između 6 i 5 milijuna godina prije današnjice. Nadalje, rezultati su pokazali i da su se razdvajanja između pojedinih skupina unutar haplogrupe *A. italicus* odigrala nešto kasnije od razdvajanja dva velika taksona: Balkan – Alpe između 6,15 – 4,44 milijuna godina; Alpe – Apenin između 5,38 – 3,89 milijuna godina i Apenin – Balkan između 4,92 – 3,56. Ovakvi rezultati su i logični u pogledu današnje rasprostranjenosti pojedinih haplotipova odnosno haplogrupa, posebno ako imamo na umu da se Mesinska kriza odigrala negde prije oko 5,96 milijuna godina te da je za vrijeme nje postojala suhozemna komunikacija između Apeninskog i Balkanskog poluotoka.

VI. ZAKLJUČCI

7. ZAKLJUČCI

Iz dobivenih rezultata ovog istraživanja mogu se izvući sljedeći zaključci:

1. Genska udaljenost je pokazala da se unutar kompleksa vrste *Austropotamobius pallipes* nalaze dvije odvojene vrste: *Austropotamobius pallipes* i *Austropotamobius italicus*;
2. Analizirane životinje s područja Hrvatske te Bosne i Hercegovine sve pripadaju, sa svojim različitim haplotipovima, vrsti *Austropotamobius italicus*;
3. Unutar vrste *Austropotamobius italicus* nalazi se najmanje tri, a možda i više podvrsta;
4. Da bi se pretpostavke o podvrstama konačno dokazale, potrebna su daljnja istraživanja koja će obuhvaćati veći broj uzoraka.

VIII.

LITERATURA

8. POPIS LITERATURE

- Akaike, H.** (1974) A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Autom. Contr.* **19**: 716-723.
- Albrecht, H.** (1982) Das system der europäischen flusskrebse (Decapoda, Astacidae): vorschlag und begründung. *Mitteilungen aus dem Hamburgischen Zoologischen Museum Institut.* **79**: 187-210.
- Albrecht, H.** (1983) Die Protostacidae n. fam., fossile Vorfahren der Flußkrebse? *Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie Monatshefte*, **1983**: 5–15.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J.** (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* **215**: 403-410.
- Banarecsu, P.M.** (1992) Principaux traits de la zoogéographie des eaux douces. *C R Soc Biog* **67**: 133-154.
- Barić, S., Höllrigl, A., Kerschbamer, C., Füreder, L., Petutschnig, J. & Dalla Via J.** (2005) Update of the molecular phylogeny of the *Austropotamobius pallipes* species complex by including specimens from South Tyrol and Carinthia (Austria). *European native crayfish in relation to land-use and habitat deterioration with a special focus on Austropotamobius torrentium*, CRYNET, Vol. 4. (Eds.) L. Füreder & C. Souty-Grosset *Bull. Fr. Pêche Piscic.* **376-377**: 599-612.
- Bott, R** (1950) Die Flusskrebse europas (Decapoda; Astacidae). *Proc Senck Nat Soc* **483**: 1-36.
- Clary, D.O. & Wolstenholme, D.R.** (1985) The mitochondrial genome of the Honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics* **133**: 97-117.
- Crandall, K.A., Fetzner, J.W., Lawler, S.H., Kinnersley, M. & Austin, C.M.** (1999) Phylogenetic relationship among Australian and New Zealand genera of freshwater crayfishes. *Australian Journal of Zoology* **47**:199-214.
- Dana, J.D.** (1852) Conspectus crustaceorum quae in orbis terrarum circumnavigatione Carolo Wilkes e classe republicae foederate duce lexit et descripsit. Macrourea. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* **6**: 10-28.
- Erwin, T.L.** (1991) An evolutionary basis for conservation strategies. *Science* **253**: 750-752.
- Eschscholtz, F.F.** (1823) Descriptio novae *Astacorum* speciei *Rossicae*. *Mémoires de la Société des Naturalistes de Moscou* **6**: 109-110.

- Farris, J.S.** (1970) Estimating phylogenetic trees from distance matrixes. *American Nature* **106**: 645-668.
- Felsenstein, J.** (1973) Maximum-likelihood and minimum-steps method for estimating evolutionary trees. *Syst.Zool.* **22**: 240-249.
- Felsenstein, J.** (1981) Evolutionary trees from DNA sequences. A maximum likelihood approach. *J.Mol.Evol.* **17**: 368-376.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R.** (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol.Marine Biol.Biotechnol.* **3**: 294-299.
- Franjević, D.** (2006) Molekularna filogenija dinaridskih vrsta roda *Troglocaris* (Crustacea, Caridea, Atydea), Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, 187 p.
- Fratini, S., Zaccara, S., Barbaresi, S., Grandjean, F., Souty-Grosset, C., Crosa, G. & Gherardi, F.** (2005) Phylogeography of the threatened crayfish (genus *Austropotamobius*) in Italy: Implication for its conservation. *Heredity* **94**: 108-118.
- Frogila, C.** (1978) Decapodi (Crustacea Decapoda). In: Ruffo S (Ed.) *Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane, AQ/1/9/4*. Consiglio Nazionale delle Ricerche. Verona, Italy
- Gennis, R.B.** (1992) Site-directed mutagenesis studies on subunit I of the aa3-type cytochrome c oxidase of *Rhodobacter sphaeroides*. A brief review of progress to date. *Biochem.Biophys.Acta* **1101**: 184-187.
- Girard, Ch.** (1852) A revision of the North American *Astaci*, with observations on their habitat and geographic distribution. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* **6**: 87-91.
- Grandjean, F., Frelon-Ralmon, M. & Souty-Grosset, C.** (2002) Compilation of molecular data for the phylogeny of the genus *Austropotamobius pallipes*: one species or several? *Knowledge-based management of European native crayfish, crayfish special*. Vol. 4. (Eds.) C. Souty-Grosset & F. Grandjean *Bull. Fr. Pêche Piscic.* **367**: 671-680.
- Grandjean, F., Gouin, N., Frelon, M. & Souty-Grosset, C.** (1998) Genetic and morphological systematic studies on the crayfish *Austropotamobius pallipes* (Decapoda: Astacidae). *Journal of Crustacean Biology* **18(3)**: 549-555.
- Grandjean, F., Harris, D.J., Souty-Grosset, C., Crandall, K.A.** (2000) Systematic of the European endangered crayfish species *Austropotamobius pallipes* (Decapoda: Astacidae). *Journal of Crustacean Biology* **20**: 522-529.
- Hall, T.A.** (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**: 95-98.
- Hall, T.A.** (2001) *Phylogenetic Trees Made Easy: A How-To Manual for Molecular Biologists*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, U.S.A.

- Hanckok, J.M., Tautz, D. & Dover, G.A.** (1988) Evolution of the secondary structures and compensatory mutations of the ribosomal RNAs of *Drosophila*. *Mol.Biol.Evol.* **5**: 393-414.
- Hasegawa, M., H. Kishino, & T. Yano.** (1985) Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* **22**: 160-174.
- Hewitt, G.M.** (1999) Post-glacial recolonization of European biota. *Biol J Linn Soc* **68**: 87-112.
- Hewitt, G.M.** (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* **405**: 907-913.
- Hillis, D.M. & Dixon, M.T.** (1991) Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q.Rev.Biol.* **66**: 411-453.
- Holdich, D. M.** (2002) Present distribution of Crayfish in Europe and some adjoining countries. *Bulletin français de la Pêche et de la Pisciculture* **367**: 611-650.
- Holdich, D.M., Rogers, W.D., Reader, J.P. & Harlioğlu, M.M.** (1995) Interactions between three species of freshwater crayfish (*Austropotamobius pallipes*, *Astacus leptodactylus* and *Pacifastacus lenisculus*). *Freshwater Crayfish* **10**: 46-56.
- Iaconelli, M.** (2001) Struttura genetica del gambero di fiume *Austropotamobius italicus* e strategie di conservazione della specie in Italia cente con particolare riguardo all'Abruzzo. Tesi di Dottorato. Dipartimento di Scienze Ambientali, Università degli Studi de L'Aquila, Coppito di L'Aquila.
- Kalafatić, M.** (1998) Osnove biološke evolucije. *Sveučilište u Zagrebu*. Zagreb, p 136.
- Karaman, M.S.** (1961) Slatkovodni rakovi Jugoslavije. *Publikacije stručnog udruženja za unapređenje slatkovodnog ribarstva Jugoslavije*. Beograd, p 33.
- Kimura, M.** (1981) Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**: 454-458.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M.** (2007) MEGA4: integrated software for molecular evolutionary analysis and sequence alignment. *Briefing in Bioinformatic* **5**: 150-163.
- Lachat, G.A. & Laurent, P.J.** (1988) The habitats of *Astacus astacus* L. and *Austropotamobius pallipes* Lere. in the Morvan. *Freshwater crayfish* **7**: 61-68.
- Largiadèr, C.R., Herger, F., Lörtscher, M. & Choll, A.** (2000) Assessment of natural and artificial propagation of the white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes* species complex) in the Alpine region with nuclear and mitochondrial markers. *Mol Ecol* **9**: 25-37.
- Laurent, P.J. & Suscillon, M.** (1962) Les écrevisses en France. *Annales de la Station Centrale d'Hydrobiologie* **9**: 336-395.

- Lereboullet, A.** (1858) Description de deux nouvelles espèces d'écrevisses de nos rivières. *Mémoires de la Société des Sciences Naturelles* **5**: 1-11.
- Linnaeus, C.** (1758) *Systema naturae*. 10th Edition. Stockholm
- Lio, P. & Goldman, N.** (1998) Models of molecular evolution and phylogeny. *Genome Research* **8**: 1233-1244.
- Lörtscher, M., Stucki, T.P., Claluna, M. & Scholl, A.** (1997) Phylogeographic structure of *Austropotamobius pallipes* populations in Switzerland. *Bull. Fr. Pêche Piscic.* **347**: 649-661.
- Maguire, I. & Gottstein Matočec, S.** (2004) The distribution pattern of freshwater crayfish in Croatia. *Crustaceana* **77(1)**: 25-49.
- Maguire, I., Klobučar, G.I.V., Gottstein Matočec, S. & Erben, R.** (2003) Distribution of *Austropotamobius Pallipes* (Lereboullet) in Croatia and notes on its morphology. *Bull. Fr. Pêche Piscic.* **370-371**: 57-71.
- Mallatt, J.M., Garey, J.R. & Shultz, J.W.** (2004) Ecdysozoan phylogeny and Bayesian inference: first use of nearly complete 28S and 18S rRNA gene sequences to classify the arthropods and their kin. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **31**: 178–191.
- Marijnissen, S.A.E., Michael, E., Daniels, S. R., Erpenbeck, D., Menken, S.B.J. & Schram F.R.** (2006) Molecular evidence for recent divergence of Lake Tanganyika endemic crabs (Decapoda: Platyhelphusidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **40**: 628-634.
- Martin, J.W. & Davis, G.E.** (2001) An Updated Classification of the Recent Crustacea. Natural History Museum of Los Angeles County. *Science Series* **39**: 58-75.
- Mau, B. & Newton, M.** (1997) Phylogenetic inference for binary data on dendrograms using Markov chain Monte Carlo. *J.Comp.Graph.Stat.* **6**: 122-131.
- Mau, B., Newton, M. & Larget, B.** (1999) Bayesian phylogenetic inference via Markov chain Monte Carlo methods. *Biometrics* **55**: 1-12.
- Menchenin, S.** (2001) Cam2Com version 2.2.2.28. Olympus digital camera control application.
- Milankov, V.** (2007) Biološka evolucija. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za biologiju i ekologiju. Novi Sad, p 459.
- Mills, L.S. & Soulé, M.E.** (1992) Conservation genetics and conservation biology: a troubled marriage. *Conservation of Biodiversity for Sustainable Development*, Scandinavian University Press: Oslo, Scandinavia, pp 55-69.
- Moritz, C.** (1994) Defining “evolutionary significant units” for conservation. *Trends Ecol. Evol.* **9**: 373-375.

- Nascetti, G., Andreani, P., Santucci, F., Iaconelli, M. & Bullini, L.** (1997) Struttura genetica di popolazioni italiane di gambero di fiume (*Austropotamobius pallipes*) e strategie per la sua conservazione. *S It E Atti* **18**: 205-208.
- Nei, M. & Kumar, S.** (2000) *Molecular Evolution and Phylogenetics*, Oxford University Press, New York
- Nicholas, K.B. & Nicholas, H.B.Jr.** (1997) GeneDoc: A Tool for Editing and Annotating Multiple Sequence Alignments. Version 2.1.000
- Nuin, P** (2005) ModelTest Graphical Interface for Windows/Linux. University Health Network, Toronto ON, Canada
- Ovendon, J.R., Booth, J.D. & Smolenski, A.J.** (1997) Mitochondrial DNA phylogeny of red and green rock lobsters. *Marine and Freshwater Research* **48**: 1131-1136.
- Page, R.M.D.** (2001) TreeView (win32). Version 1.66.
- Peay, S. & Rogers, D.** (1999) The peristaltic spread of signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) in the River Wharfe, Yorkshire, England. *Freshwater Crayfish* **12**: 665-676.
- Posada, D. & Crandall, K.A.** (1998) Modeltest: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**: 817-818.
- Pretzman, G.** (1987) A contribution to a historic analysis of Mediterranean freshwater decapods chorology. *Invest Pesq* **51**: 7-25.
- Rafinesque, C.S.** (1817) Synopsis of four new Genera and ten new Species of Crustacea, found in United States. Museum of Natural Sciences. 9. *American monthly Magazine and critical Review* **2**: 40-43.
- Rannala, B. & Yang, Z.H.** (1996) probability distribution of molecular evolutionary trees: A new method of phylogenetic inference. *J.Mol.Evol.* **43**: 304-311.
- Rathke, H.** (1837) Zur Fauna der Krym. Ein Beitrag. *Mémoires de l'Académie des Sciences de St Pétersbourg*, ser. 6B **3**: 291-454.
- Rogers, W.D. & Holdich, D.M.** (1995) Crayfish production in Britain. *Freshwater Crayfish* **10**: 583-595.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P.** (2003) Mr. Bayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**: 1572-1574.
- Sambrook, J. & Rusell, D.W.** (2001) Molecular cloning A Laboratory Manual. Third Edition. *Cold Spring Harbor Laboratory press*. Cold Spring Harbor, New York
- Santucci, F., Iaconelli, M., Andreani, P., Cianchi, R., Nascetti, G. & Bullini, L.** (1997) Allozyme diversity of European freshwater crayfish of the genus *Austropotamobius*. *Bull. Fr. Pêche Piscic.* **347**: 663-676.

- Sarastre, M.** (1990) Structural features of cytochrome oxidase. *Q.Rev.Biophys.* **23**: 331-366.
- Schrank, F. V. P.** (1803) Fauna Bioca. *Durchgedachte geschichte der in Baiern einheimischen und zahmen Thiere.* **3**(1):VIII+272 p. Nuernberg: Steinschen buchhandlung.
- Schubart, C.D., Neigel, J.E. & Felder, D.L.** (1998) Use of the mitochondrial 16S rRNA gene for phylogenetic and population studies of Crustacea. In: von Vaupel Klein, J.C., Schram, F.R. (Eds.) *The Biodiversity Crisis and Crustacea.* Balkema Pub., Rotterdam, pp. 817-830.
- Schubart, C.D., Neigel, J.N. & Felder, D.L.** (2000) The use of mitochondrial 16S rRNA gene for phylogenetic and population studies of Crustacea. *Crustac. Issues.* **12**: 817-830.
- Simon, C., Frat, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. & Flook, P.** (1994) Evolution, weighing and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann.Ent.Soc.Am.* **87**: 651-701.
- Sinclair, E.A., James, W.F., Buhay, J. & Crandall, K.A.** (2004) Proposal to complete a phylogenetic taxonomy and systematic revision for freshwater crayfish (Astacoidea). *Freshwater Crayfish* **14**: 21-29.
- Souty-Grosset, C., Holdich, D.M., Noël, P.Y., Reynolds, J.D. & Haffner, P.** (2006) Atlas of Crayfish in Europe. *Publications Scientifiques du Muséum national d'Histoire naturelle*, Paris, p 187.
- Starobogatov, Y.I.** (1995) Taxonomy and geographical distribution of crayfish of Asia and east Europe (Crustaceae: Decapoda: Astacidae). *Arthropoda selecta* **4**(3): 3-25.
- Sturmbauer, C., Levinton, J.S. & Christy, J.** (1996) Molecular phylogeny analysis of Widdler crabs: test of the hypothesis of increasing behavioral complexity in evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **93**: 10855-10857.
- Swahn, J.Ö.** (2004) The cultural history of crayfish. *Bulletin français de la Pêche et de la Pisciculture* **372 – 373** (CRAYNET, volume 2): 243-251.
- Swofford, D.L.** (2001) PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Version 4.0. beta10. Sunderland, Massachusetts, *Sinauer Associates*.
- Tam, Y.K. & Kornfield, I.** (1998) Phylogenetic relationship of clawed lobster genera (Decapoda: Nephropidae) based on mitochondrial 16S rRNA gene sequences. *Journal of Crustacean Biology* **18**: 138-146.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G.** (1997) The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **25**: 4876-4882.

- Tong, J.G., Chan, T.-Y. & Chu, K.H.** (2000) A preliminary phylogenetic analysis of *Metapenaeopsis* (Decapoda, Penaeidae) based on mitochondrial DNA sequences of selected species from the Indo-West Pacific. *J.Crust.Biol.* **20**: 541-549.
- Trontelj, P., Machino, Y. & Sket, B.** (2005) Phylogenetic and Phylogeographic relationships in the crayfish genus *Austropotamobius* inferred from mitochondrial COI gene sequences. *Molecular Phylogenetic and Evolution* **34**: 212-226.
- Tucić, N.** (2003) Evolucionarna biologija, II dopunjeno i promenjeno izdanje. NNK – International, Beograd, p 517.
- Utevsky, S.Y. & Trontelj, P.** (2004) Phylogenetic relationships of fish leeches (Hirudinea, Piscicolidae) based on mitochondrial DNA sequences and morphological data. *Zoologica Scripta* **33(4)**: 375–385.
- Verovnik, R., Sket, B. & Trontelj, P.** (2005) The colonization of Europe by the freshwater crustacean *Asellus aquaticus* (Crustacea, Isopoda) proceeded from ancient refugia and was directed by habitat connectivity. *Molecular Ecology* **14**: 4355–4369.
- Wahlberg, N., Braby, M.F., Brower, A.W.Z., de Jong, R., Lee, M.-M., Nylin, S., Pierce, N.E., Sperling, A.H., Vila, R., Warren, A.D. & Zakharov, E.** (2005) Synergistic effects of combining morphological and molecular data in resolving the phylogeny of butterflies and skippers. *Proceedings of the Royal Society B*, **272**: 1577–1586.
- Wares, J.P., & Cunningham, C.W.** (2001) Phylogeography and historical ecology of the north Atlantic intertidal. *Evolution* **55**: 2455-2469.
- Waters, J.M. & Roy, M.S.** (2004) Phylogeography of a high-dispersal New Zealand sea-star: does upwelling block gene-flow? *Molecular Ecology* **13**: 2797–2806.
- Wilson, A.C., Cann, R.L. & Carr, S.M.** (1985) Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol. J. Linn. Soc.* **26**: 375-400.
- Wolsteholme, D.R.** (1992) Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *International Review Of Cytology* **141**: 173-216.
- Zaccara, S., Stefani, F. & Crosa, G.** (2005) Diversity of mitochondrial DNA of the endangered white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes*) in Po River catchment. *Freshwater Biology* **50**: 1262-1272.

VIII. PRILOZI

PRILOG 1. Test udjela vjerojatnosti i Akaike informacijski kriterij za 16S rRNA marker

Testing models of evolution - Modeltest 3.7
 (c) Copyright, 1998-2005 David Posada (dposada@uvigo.es)
 Facultad de Biología, Universidad de Vigo,
 Campus Universitario, 36310 Vigo, Spain

Wed Mar 25 09:30:38 2009
 OS = Windows

Input format: PAUP* scores file

Run settings:

Using the standard AIC (not the AICc)
 Not using branch lengths as parameters
 Including all models in model-averaging calculations

```
-----
*                               *
*   HIERARCHICAL LIKELIHOOD RATIO TESTS (hLRTs)   *
*                               *
-----
```

Confidence level = 0.01

Equal base frequencies

Null model = JC	-lnL0 = 2236.2891
Alternative model = F81	-lnL1 = 2170.4409
2(lnL1-lnL0) = 131.6963	df = 3
P-value = <0.000001	

Ti=Tv

Null model = F81	-lnL0 = 2170.4409
Alternative model = HKY	-lnL1 = 2105.7290
2(lnL1-lnL0) = 129.4238	df = 1
P-value = <0.000001	

Equal Ti rates

Null model = HKY	-lnL0 = 2105.7290
Alternative model = TrN	-lnL1 = 2102.5063
2(lnL1-lnL0) = 6.4453	df = 1
P-value = 0.011125	

Equal Tv rates

Null model = HKY	-lnL0 = 2105.7290
Alternative model = K81uf	-lnL1 = 2101.5681
2(lnL1-lnL0) = 8.3218	df = 1
P-value = 0.003917	

Only two Tv rates

Null model = K81uf	-lnL0 = 2101.5681
Alternative model = TVM	-lnL1 = 2100.1663
2(lnL1-lnL0) = 2.8037	df = 2
P-value = 0.246140	

Equal rates among sites

Null model = K81uf	-lnL0 = 2101.5681
Alternative model = K81uf+G	-lnL1 = 2068.7529
2(lnL1-lnL0) = 65.6304	df = 1

Using mixed chi-square distribution
P-value = <0.000001
No Invariable sites
Null model = K81uf+G -lnL0 = 2068.7529
Alternative model = K81uf+I+G -lnL1 = 2068.7192
2(lnL1-lnL0) = 0.0674 df = 1
Using mixed chi-square distribution
P-value = 0.397593

Model selected: K81uf+G

-lnL = 2068.7529
K = 6
Base frequencies:
freqA = 0.3610
freqC = 0.0930
freqG = 0.1873
freqT = 0.3587
Substitution model:
Rate matrix
R(a) [A-C] = 1.0000
R(b) [A-G] = 6.7444
R(c) [A-T] = 1.7538
R(d) [C-G] = 1.7538
R(e) [C-T] = 6.7444
R(f) [G-T] = 1.0000
Among-site rate variation
Proportion of invariable sites = 0
Variable sites (G)
Gamma distribution shape parameter = 0.6413

--

PAUP* Commands Block: If you want to implement the previous estimates as likelihood settings in PAUP*, attach the next block of commands after the data in your PAUP file:

[!Likelihood settings from best-fit model (K81uf+G) selected by hLRT in Modeltest 3.7 on Wed Mar 25 09:30:38 2009]

```
BEGIN PAUP;
Lset Base=(0.3610 0.0930 0.1873) Nst=6 Rmat=(1.0000 6.7444 1.7538 1.7538 6.7444) Rates=gamma
Shape=0.6413 Pinvar=0;
END;
```

--

```
-----
*                               *
*   AKAIKE INFORMATION CRITERION (AIC)   *
*                               *
-----
```

Model selected: TIM+G

-lnL = 2067.5137
K = 7

AIC =4149.0273

Base frequencies:

freqA = 0.3531
 freqC = 0.1020
 freqG = 0.1799
 freqT = 0.3650

Substitution model:

Rate matrix

R(a) [A-C] = 1.0000
 R(b) [A-G] = 7.7308
 R(c) [A-T] = 1.7790
 R(d) [C-G] = 1.7790
 R(e) [C-T] = 5.2015
 R(f) [G-T] = 1.0000

Among-site rate variation

Proportion of invariable sites = 0

Variable sites (G)

Gamma distribution shape parameter = 0.6690

--

PAUP* Commands Block: If you want to implement the previous estimates as likelihood settings in PAUP*, attach the next block of commands after the data in your PAUP file:

[!Likelihood settings from best-fit model (TIM+G) selected by AIC in Modeltest 3.7 on Wed Mar 25 09:30:38 2009]

BEGIN PAUP;

Lset Base=(0.3531 0.1020 0.1799) Nst=6 Rmat=(1.0000 7.7308 1.7790 1.7790 5.2015) Rates=gamma

Shape=0.6690 Pinvar=0;

END;

--

* MODEL SELECTION UNCERTAINTY : Akaike Weights

Model	-lnL	K	AIC	delta	weight	cumWeight
TIM+G	2067.5137	7	4149.0273	0.0000	0.2426	0.2426
K81uf+G	2068.7529	6	4149.5059	0.4785	0.1910	0.4336
TIM+I+G	2067.5137	8	4151.0273	2.0000	0.0892	0.5228
GTR+G	2066.5374	9	4151.0747	2.0474	0.0872	0.6100
K81uf+I+G	2068.7192	7	4151.4385	2.4111	0.0727	0.6827
TrN+G	2070.0010	6	4152.0020	2.9746	0.0548	0.7375
TVM+G	2068.0542	8	4152.1084	3.0811	0.0520	0.7895
HKY+G	2071.0996	5	4152.1992	3.1719	0.0497	0.8391
GTR+I+G	2066.5508	10	4153.1016	4.0742	0.0316	0.8708
TIM+I	2069.7686	7	4153.5371	4.5098	0.0254	0.8962
K81uf+I	2070.9775	6	4153.9551	4.9277	0.0206	0.9169
TrN+I+G	2070.0010	7	4154.0020	4.9746	0.0202	0.9370
TVM+I+G	2068.0078	9	4154.0156	4.9883	0.0200	0.9571
HKY+I+G	2071.0850	6	4154.1699	5.1426	0.0185	0.9756
GTR+I	2068.6814	9	4155.3628	6.3354	0.0102	0.9858
TVM+I	2070.1750	8	4156.3501	7.3228	0.0062	0.9921
TrN+I	2072.5869	6	4157.1738	8.1465	0.0041	0.9962
HKY+I	2073.6685	5	4157.3369	8.3096	0.0038	1.0000

TIM	2098.3132	6	4208.6265	59.5991	2.77e-14	1.0000
GTR	2096.5820	8	4209.1641	60.1367	2.12e-14	1.0000
K81uf	2101.5681	5	4213.1362	64.1089	2.91e-15	1.0000
TVM	2100.1663	7	4214.3325	65.3052	1.60e-15	1.0000
TrN	2102.5063	5	4215.0127	65.9854	1.14e-15	1.0000
HKY	2105.7290	4	4219.4580	70.4307	1.23e-16	1.0000
SYM+G	2123.5842	6	4259.1685	110.1411	2.94e-25	1.0000
SYM+I+G	2123.5842	7	4261.1685	112.1411	1.08e-25	1.0000
SYM+I	2125.6321	6	4263.2642	114.2368	3.79e-26	1.0000
TIMef+G	2134.4749	4	4276.9497	127.9224	4.04e-29	1.0000
TIMef+I+G	2134.4749	5	4278.9497	129.9224	1.49e-29	1.0000
TIMef+I	2136.4353	4	4280.8706	131.8433	5.70e-30	1.0000
TVMef+G	2135.7559	5	4281.5117	132.4844	4.13e-30	1.0000
TVMef+I+G	2135.6665	6	4283.3330	134.3057	1.66e-30	1.0000
TVMef+I	2138.0151	5	4286.0303	137.0029	4.32e-31	1.0000
F81+G	2140.2422	4	4288.4844	139.4570	1.27e-31	1.0000
F81+I+G	2140.1174	5	4290.2349	141.2075	5.27e-32	1.0000
F81+I	2141.9512	4	4291.9023	142.8750	2.29e-32	1.0000
TrNef+G	2145.1555	3	4296.3110	147.2837	2.53e-33	1.0000
TrNef+I+G	2145.1555	4	4298.3110	149.2837	9.30e-34	1.0000
K81+G	2147.1702	3	4300.3403	151.3130	3.37e-34	1.0000
TrNef+I	2147.3804	3	4300.7607	151.7334	2.73e-34	1.0000
K81+I+G	2147.0986	4	4302.1973	153.1699	1.33e-34	1.0000
K81+I	2149.1343	3	4304.2686	155.2412	4.73e-35	1.0000
SYM	2150.3643	5	4310.7285	161.7012	1.87e-36	1.0000
K80+G	2157.7676	2	4319.5352	170.5078	2.29e-38	1.0000
K80+I+G	2157.7429	3	4321.4858	172.4585	8.63e-39	1.0000
K80+I	2160.0461	2	4324.0923	175.0649	2.34e-39	1.0000
TIMef	2161.0532	3	4328.1064	179.0791	3.15e-40	1.0000
TVMef	2165.5913	4	4339.1826	190.1553	1.24e-42	1.0000
F81	2170.4409	3	4346.8818	197.8545	2.66e-44	1.0000
TrNef	2172.7751	2	4349.5503	200.5229	7.01e-45	1.0000
K81	2176.0950	2	4356.1899	207.1626	0.00e+00	1.0000
K80	2187.8413	1	4377.6826	228.6553	0.00e+00	1.0000
JC+G	2208.7412	1	4419.4824	270.4551	0.00e+00	1.0000
JC+I+G	2208.6411	2	4421.2822	272.2549	0.00e+00	1.0000
JC+I	2210.3582	1	4422.7163	273.6890	0.00e+00	1.0000
JC	2236.2891	0	4472.5781	323.5508	0.00e+00	1.0000

-lnL: Negative log likelihood
K: Number of estimated parameters
IC: Information Criterion
delta: Information difference
weight: Information weight
cumWeight: Cumulative information weight

* MODEL AVERAGING AND PARAMETER IMPORTANCE (using Akaike Weights)
Including all 56 models

Parameter	Model-averaged Importance	estimates
fA	0.9746	0.3584
fC	0.9746	0.0980
fG	0.9746	0.1814
fT	0.9746	0.3622
TiTv	0.0720	1.9182
rAC	0.2073	0.5341

Null model = JC	-lnL0 = 3311.3840
Alternative model = F81	-lnL1 = 3293.5710
2(lnL1-lnL0) = 35.6260	df = 3
P-value = <0.000001	
Ti=Tv	
Null model = F81	-lnL0 = 3293.5710
Alternative model = HKY	-lnL1 = 3142.6467
2(lnL1-lnL0) = 301.8486	df = 1
P-value = <0.000001	
Equal Ti rates	
Null model = HKY	-lnL0 = 3142.6467
Alternative model = TrN	-lnL1 = 3139.2366
2(lnL1-lnL0) = 6.8203	df = 1
P-value = 0.009013	
Equal Tv rates	
Null model = TrN	-lnL0 = 3139.2366
Alternative model = TIM	-lnL1 = 3134.9568
2(lnL1-lnL0) = 8.5596	df = 1
P-value = 0.003437	
Only two Tv rates	
Null model = TIM	-lnL0 = 3134.9568
Alternative model = GTR	-lnL1 = 3125.9165
2(lnL1-lnL0) = 18.0806	df = 2
P-value = 0.000119	
Equal rates among sites	
Null model = GTR	-lnL0 = 3125.9165
Alternative model = GTR+G	-lnL1 = 2911.6692
2(lnL1-lnL0) = 428.4946	df = 1
Using mixed chi-square distribution	
P-value = <0.000001	
No Invariable sites	
Null model = GTR+G	-lnL0 = 2911.6692
Alternative model = GTR+I+G	-lnL1 = 2908.2214
2(lnL1-lnL0) = 6.8955	df = 1
Using mixed chi-square distribution	
P-value = 0.004321	

Model selected: GTR+I+G

-lnL = 2908.2214

K = 10

Base frequencies:

freqA = 0.2689

freqC = 0.1256

freqG = 0.1885

freqT = 0.4170

Substitution model:

Rate matrix

R(a) [A-C] = 1.2998

R(b) [A-G] = 12.6131

R(c) [A-T] = 0.9664

R(d) [C-G] = 1.9499

R(e) [C-T] = 18.3917

R(f) [G-T] = 1.0000

Among-site rate variation

Proportion of invariable sites (I) = 0.4574

Variable sites (G)

Gamma distribution shape parameter = 0.5652

--

PAUP* Commands Block: If you want to implement the previous estimates as likelihood settings in PAUP*, attach the next block of commands after the data in your PAUP file:

[Likelihood settings from best-fit model (GTR+I+G) selected by hLRT in Modeltest 3.7 on Wed Mar 25 10:03:22 2009]

```
BEGIN PAUP;
Lset Base=(0.2689 0.1256 0.1885) Nst=6 Rmat=(1.2998 12.6131 0.9664 1.9499 18.3917) Rates=gamma
Shape=0.5652 Pinvar=0.4574;
END;
```

--

```
-----
*                               *
*      AKAIKE INFORMATION CRITERION (AIC)      *
*                               *
-----
```

Model selected: **HKY+I+G**

-lnL = 2909.8250

K = 6

AIC = 5831.6499

Base frequencies:

freqA = 0.2601

freqC = 0.1359

freqG = 0.1846

freqT = 0.4194

Substitution model:

Ti/tv ratio = 5.3288

Among-site rate variation

Proportion of invariable sites (I) = 0.4254

Variable sites (G)

Gamma distribution shape parameter = 0.5159

--

PAUP* Commands Block: If you want to implement the previous estimates as likelihood settings in PAUP*, attach the next block of commands after the data in your PAUP file:

[!Likelihood settings from best-fit model (HKY+I+G) selected by AIC in Modeltest 3.7 on Wed Mar 25 10:03:22 2009]

```
BEGIN PAUP;
Lset Base=(0.2601 0.1359 0.1846) Nst=2 TRatio=5.3288 Rates=gamma Shape=0.5159 Pinvar=0.4254;
END;
```

--

* MODEL SELECTION UNCERTAINTY : Akaike Weights

Model	-lnL	K	AIC	delta	weight	cumWeight
HKY+I+G	2909.8250	6	5831.6499	0.0000	0.3362	0.3362
TrN+I+G	2908.9966	7	5831.9932	0.3433	0.2831	0.6193
K81uf+I+G	2909.8079	7	5833.6157	1.9658	0.1258	0.7451
TIM+I+G	2908.9807	8	5833.9614	2.3115	0.1058	0.8509
HKY+G	2913.0291	5	5836.0581	4.4082	0.0371	0.8880
GTR+I+G	2908.2214	10	5836.4429	4.7930	0.0306	0.9186
TVM+I+G	2909.2966	9	5836.5933	4.9434	0.0284	0.9470
TrN+G	2912.4585	6	5836.9170	5.2671	0.0241	0.9712
K81uf+G	2913.0276	6	5838.0552	6.4053	0.0137	0.9848
TIM+G	2912.4578	7	5838.9155	7.2656	0.0089	0.9937
TVM+G	2912.3516	8	5840.7031	9.0532	0.0036	0.9974
GTR+G	2911.6692	9	5841.3384	9.6885	0.0026	1.0000
TrN+I	2941.6626	6	5895.3252	63.6753	5.01e-15	1.0000
HKY+I	2942.8826	5	5895.7651	64.1152	4.02e-15	1.0000
TIM+I	2941.1172	7	5896.2344	64.5845	3.18e-15	1.0000
K81uf+I	2942.3013	6	5896.6025	64.9526	2.64e-15	1.0000
GTR+I	2940.8286	9	5899.6572	68.0073	5.74e-16	1.0000
TVM+I	2942.0266	8	5900.0532	68.4033	4.71e-16	1.0000
TVMef+I+G	2977.9216	6	5967.8433	136.1934	8.96e-31	1.0000
SYM+I+G	2977.0806	7	5968.1611	136.5112	7.65e-31	1.0000
SYM+G	2979.8506	6	5971.7012	140.0513	1.30e-31	1.0000
TVMef+G	2980.9448	5	5971.8896	140.2397	1.19e-31	1.0000
K81+I+G	2986.3477	4	5980.6953	149.0454	1.45e-33	1.0000
TIMef+I+G	2985.3699	5	5980.7397	149.0898	1.42e-33	1.0000
K80+I+G	2989.0303	3	5984.0605	152.4106	2.70e-34	1.0000
TrNef+I+G	2988.0876	4	5984.1753	152.5254	2.55e-34	1.0000
TIMef+G	2988.1487	4	5984.2974	152.6475	2.40e-34	1.0000
K81+G	2989.4231	3	5984.8462	153.1963	1.82e-34	1.0000
TrNef+G	2991.0811	3	5988.1621	156.5122	3.47e-35	1.0000
K80+G	2992.3303	2	5988.6606	157.0107	2.70e-35	1.0000
SYM+I	2997.0198	6	6006.0396	174.3896	4.55e-39	1.0000
TVMef+I	2998.6145	5	6007.2290	175.5791	2.51e-39	1.0000
TIMef+I	3006.4563	4	6020.9126	189.2627	2.68e-42	1.0000
K81+I	3007.8586	3	6021.7173	190.0674	1.80e-42	1.0000
TrNef+I	3010.1968	3	6026.3936	194.7437	1.74e-43	1.0000
K80+I	3011.5769	2	6027.1538	195.5039	1.19e-43	1.0000
F81+I+G	3115.5320	5	6241.0640	409.4141	0.00e+00	1.0000
F81+G	3117.2773	4	6242.5547	410.9048	0.00e+00	1.0000
GTR	3125.9165	8	6267.8330	436.1831	0.00e+00	1.0000
F81+I	3132.9092	4	6273.8184	442.1685	0.00e+00	1.0000
TVM	3129.9221	7	6273.8442	442.1943	0.00e+00	1.0000
TIM	3134.9568	6	6281.9136	450.2637	0.00e+00	1.0000
K81uf	3138.4146	5	6286.8291	455.1792	0.00e+00	1.0000
TrN	3139.2366	5	6288.4731	456.8232	0.00e+00	1.0000
JC+I+G	3142.6218	2	6289.2437	457.5938	0.00e+00	1.0000
JC+G	3144.2075	1	6290.4150	458.7651	0.00e+00	1.0000
HKY	3142.6467	4	6293.2935	461.6436	0.00e+00	1.0000
SYM	3148.1643	5	6306.3286	474.6787	0.00e+00	1.0000
TVMef	3152.4917	4	6312.9834	481.3335	0.00e+00	1.0000
JC+I	3158.4299	1	6318.8599	487.2100	0.00e+00	1.0000
TIMef	3165.0295	3	6336.0591	504.4092	0.00e+00	1.0000
K81	3169.3625	2	6342.7251	511.0752	0.00e+00	1.0000
TrNef	3170.3037	2	6344.6074	512.9575	0.00e+00	1.0000

K80	3174.6091	1	6351.2183	519.5684	0.00e+00	1.0000
F81	3293.5710	3	6593.1421	761.4922	0.00e+00	1.0000
JC	3311.3840	0	6622.7681	791.1182	0.00e+00	1.0000

-lnL: Negative log likelihood
 K: Number of estimated parameters
 IC: Information Criterion
 delta: Information difference
 weight: Information weight
 cumWeight: Cumulative information weight

* MODEL AVERAGING AND PARAMETER IMPORTANCE (using Akaike Weights)
 Including all 56 models

Parameter	Model-averaged Importance	estimates
fA	1.0000	0.2632
fC	1.0000	0.1330
fG	1.0000	0.1868
fT	1.0000	0.4170
TiTv	0.3733	5.3050
rAC	0.0653	1.1517
rAG	0.4553	11.3041
rAT	0.0653	0.9437
rCG	0.0653	1.8069
rCT	0.4553	15.4944
pinv(I)	0.0000	0.6011
alpha(G)	0.0901	0.1925
pinv(IG)	0.9099	0.4359
alpha(IG)	0.9099	0.5348

Values have been rounded.

(I): averaged using only +I models.
 (G): averaged using only +G models.
 (IG): averaged using only +I+G models.

Program is done.

Time processing: 0.11 seconds

If you need help type '-?' in the command line of the program.

MTgui designed by Paulo Nuin.

More info email me at nuin@genedrift.org