

Morfološka i genetička obilježja rakova vrste *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803) na području Parka prirode Žumberak - Samoborsko gorje

Marn, Nina

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:217:279894>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-25**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Nina Marn

MORFOLOŠKA I GENETI KA OBILJEŽJA RAKOVA
VRSTE *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803)
NA PODRU JU PARKA PRIRODE ŽUMBERAK –
SAMOBORSKO GORJE

Diplomski rad

Zagreb, 2009

Ovaj rad izrađen je u Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Gorana Klobučara i pomoćnog voditelja dr. sc. Damjana Franjevića. Predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja diplomirani inženjer biologije, smjer: ekologija.

Zadovoljstvo mi je zahvaliti mentoru doc.dr.sc. Göranu Klobu aru na povjerenju, kompetentnim komentarima i spremnosti da podijeli svoje stručno znanje. Hvala doc.dr.sc. Ivani Maguire na velikodušnoj pomoći, strpljenju i stručnim savjetima. Također zahvaljujem dr. sc. Damjanu Franjeviću bez njegovog znanja i dobre volje vjerojatno ne bi ni postojao molekularni dio istraživanja. Zahvalila bih i djelatnicima Parka pridode Žumberak – Samoborsko gorje na njihovoj susretljivosti i dobroj volji.

Veliko hvala mojim roditeljima, obitelji i prijateljima koji su imali razumijevanja i strpljenja za moja putovanja, promjene raspoloženja i « udne priče o rakovima». Posebno bih zahvalila Mitji, Mateji, Barbari, Emi, Petri S. i Ivani Š. koji su mi studentski život učinili lijepšim nego što sam se nadala, kao i studentskim udrugama BEST i BIUS na brojnim poznanstvima, putovanjima i lijepim iskustvima.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

**Morfološka i genetička obilježja rakova
vrste *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803)
na području Parka prirode Žumberak – Samoborsko gorje**

Nina Marn

Prirodoslovno – matematički fakultet, Biološki odsjek, Zoologijski zavod
Rooseveltova trg 6, Zagreb

Poto ni rak (*Austropotamobius torrentium*) jedna je od četiri autohtone vrste rakova porodice Astacidae na području Hrvatske, a nastanjuje hladnije potoke na višim nadmorskim visinama. Filogenetički odnosi unutar populacija ove vrste još nisu potpuno razjašnjeni.

U ovom diplomskom radu ispituju se morfološka obilježja i filogenetički odnosi 61 jedinke (37 mužjaka i 24 ženke) prikupljene na devet lokacija na području Parka prirode Žumberak – Samoborsko gorje. Molekularno filogenetičke analize provedene su na mitohondrijskim genima za 16S rRNA i podjedinicu I citokrom oksidaze (COI). Izrađena je genetička udaljenost među sekvencama, a kako bi se dobili filogrami, izolirane sekvence su Bayesian analizom korelirane međusobno i sa sekvencama poto ni raka iz drugih dijelova Hrvatske i Europe te sekvencama preuzetima iz internetske baze podataka. Izrađeno je vrijeme razdvajanja prema mitohondrijskom genu za COI. Također, izmjerene su 23 morfometrijske i pet merističkih značajki, koje su zatim grupirane prema rezultatima genetičkih analiza i uspoređene statističkim testovima.

Dobiveni rezultati pokazali su vrlo veliku genetičku raznolikost poto ni rakova na području PP Žumberak-Samoborsko gorje. Populacije se mogu odijeliti u četiri genetički distinktivne haplogrupe (Dunav, Gorski Kotar, Zeleni Vir i Žumberak/Plitvice/Bjelolasica), a njihovo naseljavanje ovog dijela Europe nakon Pleistocenskih ledenih doba rekonstruirano je pomoću vremena razdvajanja i genetičkih udaljenosti među populacijama. Statističkom obradom izmjerenih morfoloških vrijednosti uočene su značajne razlike među geografski odijeljenim populacijama, a diskriminantnom analizom izdvojena su obilježja koja su zatim omogućila vrlo visok postotak točne klasifikacije. Kako razlike među jedinkama iz različitih populacija nisu vidljive na prvi pogled nego tek nakon multivarijantne diskriminantne analize, vrlo je vjerojatno da se radi o tzv. kriptičnim vrstama/podvrstama.

Velika genetička raznolikost i morfološka varijabilnost populacija poto ni rakova na području Parka prirode Žumberak – Samoborsko gorje zahtijevaju neposrednu budućnost i posebnu brigu u vidu zaštite i održanja ovog jedinstvenog biološkog fenomena na Europskoj razini.

(77 stranica, 22 slike, 21 tablica, 114 literaturnih navoda; jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

ključne riječi: poto ni rak, mitohondrijska DNA, molekularna filogenija, morfološka varijabilnost

Voditelji: doc. dr. sc. Göran I.V. Klobučar
Pomoćni voditelj: dr. sc. Damjan Franjević

Ocjenjivači: prof. dr. sc. Göran I.V. Klobučar
prof. dr. sc. Mirjana Pavlica
prof. dr. sc. Božena Mitić

Zamjena: doc. dr. sc. Ivana Maguire

Rad je prihvaćen: 03. 06. 2009.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation thesis

Morphological and genetic features of crayfish species *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803) from Žumberak – Samoborsko gorje Nature Park

Nina Marn

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

The stone crayfish (*Austropotamobius torrentium*) is one of four native Croatian crayfish species that inhabits mainly cold brooks on higher altitudes. Phylogenetic relationships among different populations of this species are not yet completely resolved.

In this research we have studied morphological characteristics and phylogenetic relationships of 61 individuals (37 males and 24 females) that have been collected from nine sites situated in Žumberak - Samoborsko gorje Nature Park. For molecular phylogenetic analyses we used mitochondrial genes for large ribosomal unit (16S rRNA) and for subunit I of cytochrome oxidase (COI). Sequence divergences and nucleotide diversity were calculated and Bayesian analysis was applied for constructing phylogenetic trees and correlating these sequences with sequences of stone crayfish from other parts of Croatia and Europe and those retrieved from on-line data-bases. Time of divergence was calculated according to the molecular clock for mitochondrial COI gene. In morphological aspect of research we measured 23 morphometrical and five meristic characteristics, which were then grouped in accordance with the results of previous genetic analyses and processed with statistical methods.

Obtained results show a large genetic diversity of populations of stone crayfish in the area of Žumberak – Samoborsko gorje Nature Park. Populations can be divided into four distinctive haplogroups (Dunav, Gorski Kotar, Zeleni Vir and Žumberak/Plitvice/Bjelolasica), and the colonization of these part of Europe that followed the Pleistocenic ice ages can be retraced by consulting times of divergence and genetic diversity. Statistical analyses of morphological data shows significant differences for geographically separated populations, and discriminant analysis yielded a very high percent of correct classifications. However, since these differences were apparent only after grouping and statistically analyzing the data, it is possible that this is a case of cryptic species/subspecies.

Such high genetic diversity and morphological variation in populations of stone crayfish in Žumberak – Samoborsko gorje Nature Park represents an unique phenomenon on the European scale and will demand special care and protection in the near future.

(77 pages, 22 pictures, 21 tables, 114 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central biological library.

Keywords: stone crayfish, morphology, molecular phylogeny, mitochondrial DNA

Supervisor: Dr. Göran I.V. Klobučar, Asst. Prof.

Assistant supervisor: Dr. Sc. Damjan Franjević

Reviewers: Dr. Göran I.V. Klobučar, Prof.

Dr. Mirjana Pavlica, Prof.

Dr. Božena Mitić, Prof.

Substitute: Dr. Ivana Maguire, Asst. Prof.

Thesis accepted: 03. 06. 2009.

Sadržaj:

1. UVOD	1
1.1. PORODICA ASTACIDAE	2
1.1.1. Sistematski položaj porodice Astacidae i njena taksonomija	2
1.1.2. Filogenetsko podrijetlo porodice Astacidae i naseljavanje voda na kopnu	3
1.1.3. Astacidae u Europi	4
1.1.4. Astacidae u Hrvatskoj	5
1.1.5. <i>Austropotamobius torrentum</i> – poto ni rak ili rak kamenjar	6
1.2. FILOGENIJA	8
1.2.1. Filogenetska stabla	9
1.2.2. Rekonstrukcija filogenetskog stabla	11
1.3. MITOHONDRIJSKI GENOM	13
1.3.1. Gen za 16S rRNA	14
1.3.2. Gen za podjedinicu I citokrom oksidaze (COI)	14
1.4. FILOGEOGRAFIJA	15
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	16
3. MATERIJAL I METODE	18
3.1. MATERIJAL	19
3.1.1. Životinjski materijal	19
3.1.2. Analizirane sekvence	20
3.1.3. Reagensi i laboratorijski materijal za molekularno filogeneti ke metode	24
3.2. METODE	27
3.2.1. Izolacija DNA	27
3.2.2. Uznažanje fragmenataDNA lan anom reakcijom polimerazom (PCR)	27
3.2.3. Elektroforetsko odjeljivanje fragmenata DNA	28
3.2.4. Odre ivanje primarne strukture DNA (sekvenciranje)	29
3.2.5. Molekularno-filogeneti ke analize	30
3.2.6. Morfometrijska i meristi ka mjerenja	31
3.3. PODRU JE ISTRAŽIVANJA	34
4. REZULTATI	36
4.1. MOLEKULARNO-FILOGENETI KE ANALIZE	36
4.1.1. Sravnjivanje i obrada sekvenci	36
4.1.2. Bayesian analiza	39

4.1.3. Geneti ka udaljenost (p) i nukleotidna raznolikost ()	45
4.1.4. Vrijeme razdvajanja	47
4.2. MORFOMETRIJSKE I MERISTI KE ZNA AJKE	48
5. RASPRAVA	59
5.1. MOLEKULARNO-FILOGENETI KE ANALIZE	60
5.2. MORFOMETRIJSKE I MERISTI KE ZNA AJKE	63
5.3. PRIJEDLOZI ZA ZAŠTITU	65
6. ZAKLJU AK	67
7. LITERATURA	69
8. PRILOZI	I
PRILOG I. Spearmanov koeficijent korelacija za mužjake	II
PRILOG II. Spearmanov koeficijent korelacija za ženke	III
PRILOG III. Rezultati Mann-Whitey U testa za razlike izme u pojedinih grupa	IV
PRILOG IV. Spearmanov koeficijent korelacije za meristi ke zna ajke	XI

UVOD

1.1. PORODICA ASTACIDAE

Porodica Astacidae je jedina porodica podreda Astacida iji pripadnici se autohtono pojavljuju na Euroazijskom kontinentu zapadno od Urala (Holdich, 2002).

1.1.1. Sistematski položaj porodice Astacidae i njena taksonomija

Podred Astacida iz reda Decapoda obuhvaća 593 vrste slatkovodnih rakova (Sinclair i sur., 2004), koje su podijeljene u dvije nadporodice: Astacoidea i Parastacoidea (Hobbs, 1998). Natporodica Astacoidea podijeljena je u dvije porodice: Astacidae i Cambaridae. Porodica Astacidae sadrži tri roda i dva podroda, a porodica Cambaridae uključuje tri podporodice, 12 rodova i 46 podrodova. Natporodica Parastacoidea sadrži samo jednu porodicu Parastacidea s 14 rodova (Taylor, 2002).

Sistematika:

Koljeno: ARTHROPODA – lankonošci

Razred: CRUSTACEA – rakovi

Red: DECAPODA – desetonošci

Podred: ASTACIDA

Natporodica: ASTACOIDEA

Porodica: CAMBARIDAE

Porodica: ASTACIDAE

Rod: *ASTACUS*

Rod: *AUSTROPOTAMOBIVS*

Natporodica: PARASTACOIDEA

Porodica: PARASTACIDAE

Od 17.st., kada je Linne rakove opisao kao kukce neprikladne za prehranu, otkrivene su i ispravljene mnoge greške u klasifikaciji, među tim slatkovodni rakovi Europe ostaju predmetom brojnih taksonomskih revizija. U najjednostavnijim slučajevima bili su svrstani u jedan rod (*Astacus*) s pet vrsta (Albrecht, 1983), a u najsloženijim slučajevima u pet rodova s 19 vrsta (Starobogatov, 1995).

Do sada je opisano nekoliko desetaka podvrsta i varijeteta unutar oba roda porodice Astacidae, ali mnogi problemi o taksonomskim odnosima unutar pojedinih rodova još nisu riješeni, a nema ni dogovora o toj brojnosti europskih autohtonih rodova i vrsta (Holdich, 2002; Taylor, 2002).

Iako se na temelju molekularne filogenetike istraživanja predlažu nove taksonomske podjele u kojima bi neke podvrste bile podignute na razinu vrste, primjerice *Austropotamobius italicus* (Grandjean i sur., 2002), danas najrašireniji stav je priznavanje pet vrsta unutar dva roda: *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858) i *Austropotamobius*

torrentium (Schrank, 1803) unutar roda *Austropotamobius*, te *Astacus astacus* (Linne, 1758), *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) i *Astacus pachypus* (Rathke, 1837) unutar roda *Astacus*.

Status vrsta *Austropotamobius torrentium* i *A. pallipes* posebno je zamršen, što je vjerojatno posljedica nedovoljne istraženosti u cijelom njihovom arealu (Trontelj i sur., 2005), a neki autori (Baric i sur., 2005a; Grandjean i sur., 2002; i Trontelj i sur., 2005) predlažu da se obje vrste roda *Austropotamobius* smatraju kompleksima.

1.1.2. Filogenetsko podrijetlo porodice Astacidae i naseljavanje voda na kopnu

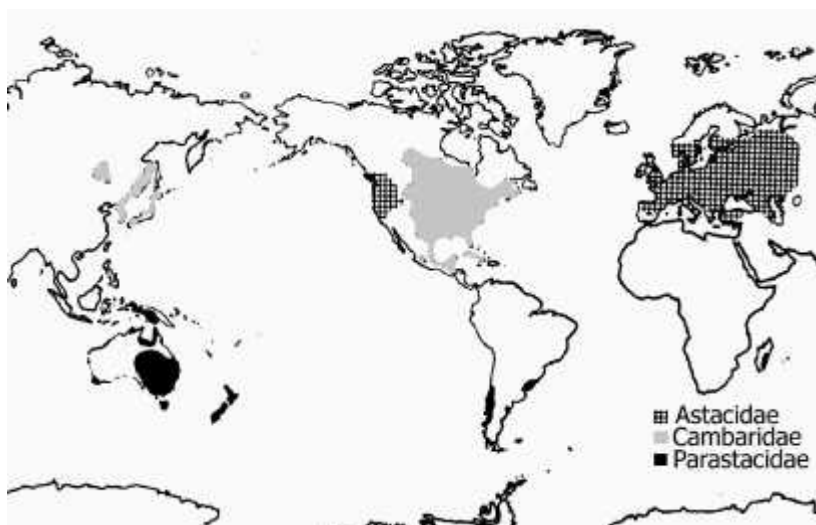
Zadnjih stotinu godina me u astakolozima se vodi rasprava da li slatkovodni rakovi dijele zajedni ko filogenetsko podrijetlo i u koliko su navrata naselili slatke vode.

Autori koji se zalaže za polifiletsko podrijetlo smatraju da se naseljavanje kopnenih voda odvijalo u nekoliko navrata (Huxley, 1880; Bott, 1950; Albrecht, 1983; Starobogatov, 1995). Dokaze koji idu u prilog njihovoj teoriji nalazimo u nekoliko razli itih podru ja znanosti, primjerice zoogeografiji (Huxley, 1880; Starobogatov, 1995), fiziologiji (Greenaway i Lawson, 1982) i paleontologiji (Glaessner, 1969; Feldmann i Pole, 1994; Hasiotis, 1999).

Prve teorije o monofiliji i jednom ulasku u kopnene vode iznosi Ortmann (1897). On je stavio naglasak na sli nosti Astacida i razvio je mogu e na ine njihovog globalnog prijelaza u slatke vode, te daljnje putove migracija u slatkim vodama. U to vrijeme još nije bila poznata teorija kontinentskog drifta, pa je Ortmann za svoje teorije koristio postojanje kopnenih mostova izme u kontinenata zbog niske razine svjetskog mora. U novije vrijeme detaljnijim istraživanjem u podru ju razmnožavanja i embriologije slatkovodnih rakova otkrivene su dodatne karakteristike koje upu uju na monofiliju Astacida (Scholtz, 1993; Maguire, 2002), a molekularno filogenetska istraživanja tako er ukazuju na monofiletsko podrijetlo porodice Astacidae (Crandall i sur., 2000; Sinclair i sur., 2004).

Danas je u svijetu opisano oko 600 vrsta slatkovodnih rakova i nema sumnje da su sve potekle od pretka koji je živio u moru. Veliko bogatstvo vrsta posljedica je disperzije nakon naseljavanja kopnenih voda, pa je poznavanje tog procesa važno za razumijevanje evolucije slatkovodnih rakova. Naseljavanje kopnenih voda odigralo se, prema nekim autorima (Ortmann, 1897) u jednom naletu i to prije razdvajanja superkontinenta Pangee (Trijas, 245-200 milijuna godina). Razlike koje postoje izme u Astacoidea i Parastacoidea razvile su se nakon raspadanja Pangee na sjevernu Laurasiu i južnu Gondwanu. Današnju rasprostranjenost rakova mogu e je objasniti kroz povijest Zemlje iako postoje neke nelogi nosti npr. zašto rakovi naseljavaju Madagaskar, a Afriku i Indiju ne, te disjunktivna

rasprostranjenost porodica Astacidae i Cambaridae (Slika 1). Pojedini autori to objašnjavaju neovisnim višekratnim ulazom rakova u kopnene vode (Huxley, 1880; Bott, 1950; Albrecht, 1983; Karaman, 1962; Cukerzis, 1988; Starobogatov, 1995).



SLIKA 1. Rasprostranjenost porodica Astacidae, Cambaridae i Parastacidae (Hobbs, 1988)

1.1.3. Astacidae u Europi

Astacidae naseljavaju sjevernu hemisferu, pretpostavlja se da je središte njihova razvoja bila isto na Azija odakle su se proširili u Europu i Sjevernu Ameriku. Na predstavnike Astacidae u Sjevernoj Americi možemo gledati kao na glacijalne relikte.

Na području Europe danas živi pet vrsta autohtonih slatkovodnih rakova iz porodice Astacidae: *Astacus astacus* (rije ni ili plemeniti rak), *Astacus leptodactylus* (dunavski, turski, uskoškari ili barski rak), *Astacus pachypus*, *Austropotamobius pallipes* (bjelonogi ili primorski rak) i *Austropotamobius torrentium* (rak kamenjar ili poto ni rak) (Slika 2).

Filogenetski mlađi rod *Astacus* rasprostranjen je kroz cijelu Europu izuzev Iberijskog poluotoka. Areal roda *Astacus* se prostire na istok do Rusije, na sjever do Skandinavije, jug do Turske, a na zapad do Francuske. Rod *Austropotamobius* ima manji areal, granice su mu Balkanski poluotok na istoku, Britansko otočje na sjeveru, Italija na jugu i Iberijski poluotok na zapadu (Hobbs, 1988).



SLIKA 2. Rasprostranjenost autohtonih vrsta slatkodvodnih rakova iz porodice Astacidea diljem Europe (Holdich i Lowery, 1988).

U Europi, osim autohtonih, danas žive i alohtone vrste. Naj eš e su to ameri ke vrste *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) tako er iz porodice Astacidae, zatim pripadnici porodice Cambaridae: *Orconectes limosus* (Rafinesque, 1817) i *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) i neke vrste australskog roda *Cherax* (Erichson, 1846) iz porodice Parastacidae. Ameri ke vrste unesene su u 19. i 20. stolje u zbog uzgoja, a kasnije kako bi obnovile ra jom kugom pogo ene populacije autohtonih vrsta (Ackefors, 1998; Holdich, 2003). Tada se znalo da su ameri ke vrste otporne na uzro nika ra je kuge – gljivicu *Aphanomyces astaci*, ali se nije znalo da su upravo oni i prijenosnici. Zbog toga, kao i zbog njihove agresivnosti i fekunditeta, ubrzo su istisnuli autohtone vrste u konkurenciji za prostor i hranu. Pribrojimo li ovome i promjene staništa, ometanje rakova ljudskim aktivnostima i pretjeran izlov, razumljivo je zbog ega su populacije autohtonih rakova u stalnom opadanju (Holdich, 1999; Taugbøl i Skurdal, 1999).

Zbog navedenih prijetnji opstanku europskih vrsta, *Astacus astacus*, *Austropotamobius torrentium* i *Austropotamobius pallipes* uvršteni su i IUCN-ovu crvenu listu ugroženih vrsta (IUCN - *International Union for Conservation of Nature*). Svrstani su u kategoriju rizi nih vrsta (VU – *vulnerable*), što zna i da nisu kriti no ugrožene, ali postoji visoki rizik od izumiranja u ne tako dalekoj budu nosti. Sve tri vrste su uvrštene u Apendiks br. III Bernske konvencije po kojem je njihovo iskorištavanje pod strogom kontrolom i nadzorom svake države (Taylor, 2002), a vrste *A. torrentium* i *A. pallipes* uvrštene su i u Direktivu o staništima Europske unije.

1.1.4. Astacidae u Hrvatskoj

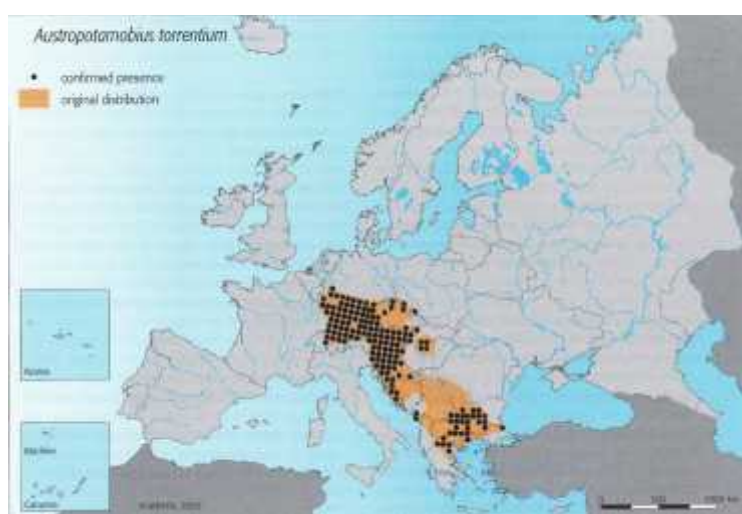
Hrvatsku karakterizira velika raznolikost ekoloških sistema i staništa. Obzirom da je smještena na granici nekoliko biogeografskih regija, obuhvaća i dijelove s različitim geološkim, pedološkim, hidrološkim i klimatskim uvjetima (Radović, 2000). Kao posljedica toga, na teritoriju Hrvatske obitavaju četiri vrste iz porodice Astacidae: *Astacus astacus*, *Astacus leptodactylus*, *Austropotamobius pallipes* i *Austropotamobius torrentium*.

Zabilježeno je prisustvo i invazivnih američkih vrsta: *Orconectes limosus* (porodica Cambaridae) u močvarama Parka prirode Kopački rit (Maguire i Klobučar, 2003) te vrste *Pacifastacus leniusculus* u Muri (Maguire i sur., 2008).

Kako su riječi rakovi i u Hrvatskoj ugroženi zbog različitih negativnih utjecaja, ali ponajviše zbog degradacije staništa na kojima obitavaju, pod zakonskom su zaštitom još od 1998. godine. Vrste *Astacus astacus*, *Austropotamobius pallipes* i *A. torrentium* zaštićene su Pravilnikom o proglašavanju divljih svojih životinja zaštićenim i strogo zaštićenim, (Narodne novine 07/06), i Zakonom o zaštiti prirode (Narodne novine 70/05) te ih je zabranjeno namjerno hvatati, držati ili ubijati.

1.1.5. *Austropotamobius torrentium* – potoni rak ili rak kamenjar

Od svih europskih slatkovodnih rakova *Austropotamobius torrentium* ima najmanji areal. Nastanjuje prostor koji se proteže na sjever do Njemačke i Češke, zapadno do Luksemburga i Francuske, južno do Grčke i istočno do Bugarske (Holdich, 2002). Nedavno je pronađen u Turskoj (Harhoglu i Günern, 2006), ali se ne zna sigurno da li je to njegovo prirodno stanište ili je unesen (Slika 3).



SLIKA 3. Rasprostranjenost vrste *Austropotamobius torrentium*. Crne točke su regije na kojima je pronađen, a narančasta boja označava regije za koje se pretpostavlja da je nastanjivao (preuzeto iz Atlas of Crayfish in Europe, 2006)

U Hrvatskoj se nalazi u vodotocima koji pripadaju Crnomorskom slivu (Maguire i Gottstein-Mato ec, 2004), a nedavno je utvr en i u Jadranskom slivu (Maguire i sur, 2006). Populacije su prona ene u rijekama i potocima Hrvatskog zagorja, Slavonije, Gorskog kotara, Like i Dalmatinske zagore.

Zahvaljuju i njenici da stanište raka kamenjara uglavnom ne odgovara drugim vrstama slatkovodnih rakova, populacije su manje pogo ene ra jom kugom koju prenose alohtone vrste rakova (Bohl, 1999.; Renz i Breithaupt, 2000). Tako er su nepogodni za komercijalnu eksploataciju zbog male veli ine (Laurent, 1998), tako da je njihova rasprostranjenost u Europi uglavnom nepromijenjena ljudskim djelovanjem (Troschel i sur., 1995; Kappus i sur., 1999).

Najve i izmjereni primjerci raka kamenjara bili su dugi svega 11cm (Troschel i Dehus, 1993), pa je ovo najmanja vrsta porodice Astacidae. Na gornjoj strani karapaksa postoji samo jedan par postorbitalnih grebena, što je ujedno i karakteristika cijelog roda *Austropotamobius*. Strane karapaksa su glatke i nema trnova iza cervikalne brazde. Rostrum je kratak i ima oblik jednakostrani nog trokuta, a njegov oblik je promjenjiv. U odnosu na druge vrste, rostrum ima manje rostralne trnove. Kliješta poto nog raka su kod starijih mužjaka debela i široka, dok su kod ženki nešto uža. Na nepokrenom prstu kliješta nalazi se jako udubljenje, koje je kod regeniranih kliješta slabije izraženo. Regenirarana kliješta su, osim toga, uvijek uža. Površina kliješta prekrivena je velikim i grubim granulama (Slika 4).



SLIKA 4. *Austropotamobius torrentium* - oblik rostruma i granulirana kliješta

Rakovi su no ne životinje, tako da se tijekom dana skrivaju u skloništima, a po no i izlaze van i traže hranu. No ni na in života prilagodba je na izbjegavanje predatora, ali i na dnevni ciklus njihovog plijena (Skurdal i Taugbøl, 2002). Osim beskralješnjaka bentosa, detritusa i vodene vegetacije, mogu konzumirati i drugu vrstu hrane, te su klju ni organizmi u

mnogim hranidbenim lancima kopnenih voda i važna su karika u kruženju organskih tvari (Creed, 1994; Nyström i sur., 1996). Razmnožavanje se odvija u jesen, a reproduksijski ciklus ovisi o klimi i uvjetima staništa. Tipi no stanište poto nog raka smješteno je na višim nadmorskim visinama u hladnim, nešto bržim potocima, a najbitniji faktor pri biranju staništa upravo je supstrat na dnu vodotoka (Stucki i Romer, 2001). Ova vrsta preferira staništa s mnoštvom zaklona ili mogu noš u da ih rakovi sami iskopaju. Glavni uzroci nestanka poto nog raka posljedica su ljudskog djelovanja – uništavanje staništa i geografska separacija i izolacija staništa. Naj eš e nema rekolonizacije nakon što nestane lokalna populacija (Bohl, 1997). Pri izradi planova za o uvanje ili ponovno unošenje vrste na neko podru je treba što to nije odrediti geneti ku strukturu populacija, kako bi se sprije ilo unošenje geneti ki razli itih grupa jedinki u isti hidrogeografski bazen (Grandjean i Souty-Grosset, 2000). Tako er, dobri rezultati se postižu ako su jedinke izabrane za reintrodukciju najbolje prilago ene staništu.

1.2. FILOGENIJA

Filogenija je znanstvena disciplina koja se bavi prou avanjem evolucijskog srodstva izme u razli itih grupacija organizama. To je hijerarhijska klasifikacija prema kojoj je svaki oblik života na neki na in povezan sa svim ostalim oblicima života. Prou avanje se zasniva na morfološkim, fiziološkim, geneti kim i etološkim obilježjima pojedinih taksona.

Poznato je da se organizmi prilago avaju uvjetima u okolišu na razli ite na ine, a neke od tih prilagodbi imaju utjecaj na morfologiju organizma. Iako postoje prilagodbe koje se mogu objasniti samo genotipskom, odnosno fenotipskom varijabilnoš u, u ve ini slu ajeva oba ova mehanizma imaju bitni zna aj i treba ih uzeti u obzir. Prema Swain i Foote (1999) varijacije u morfologiji nisu nužno povezane s varijacijama genotipa, ali fenotipske promjene mogu ukazivati na dulju odvojenost i po etak diferencijacije i prilagodbe specifi nim novim uvjetima i to bez promjene genotipa. Zbog toga se morfometrijske metode mogu pokazati pogodnijima za istraživanje kratkoro nih posljedica utjecaja okoliša ili po etka diferencijacije nego što su geneti ka istraživanja. Rezultati morfometrijskih mjerenja mogu se koristiti za odvajanje populacija ili djelova populacija, a multivarijantna diskriminantna analiza može se primijeniti kako bi se izdvojile one morfološke zna ajke koje karakteriziraju pojedinu populaciju i na temelju kojih se populacije jasno razdvajaju (Sint i sur., 2005).

Me utim, iako je specijacija proces u kojem su geneti ke razlike izme u srodnih populacija usko vezane uz sekundarno stjecanje morfoloških razlika, u nekim slu ajevima srodne vrste mogu nakupljati geneti ke razlike bez istovremenih morfoloških promjena. U takvim slu ajevima, razlikovanje vrsta prema morfološkim karakteristikama može biti otežano ili nemogu e, te je potrebno upotrijebiti molekularne metode (Franjevi , 2006). Time se bavi

molekularna filogenija. U posljednje vrijeme je upotreba molekularnih metoda za stvaranje filogenetskih stabala stekla mnoge poklonike među biologima i često se koristi uz morfološke metode kako bi se što detaljnije prouči ili odnosi među jedinkama koje se istražuju (Vandamme, 2004).

O prednostima morfološkog, odnosno molekularnog pristupa u rješavanju pojedinih evolucijskih pitanja vode se rasprave već nekoliko desetljeća (Patterson, 1987).

Za opisivanje stupnjeva srodnosti vrsta koje se istražuju, koristi se nekoliko mogućih odnosa između njihovih karakteristika. Najvažnije su **sinapomorfne** osobine, odnosno karakteristike koje dijele svi potomci nekog zajedničkog pretka, a prvi puta su se pojavile upravo kod toga pretka. Pojednostavljeno, to su homologne osobine koje definiraju pojedine grane filogenetskog stabla (Plechenik, 2002). Još jedan bitan pojam kod filogenije je i **homoplazija** – sličnost koja je rezultat konvergencije, paralelizma i reverzne evolucije, čime je poremećen linearan odnos između vremena evolucije i divergencije pojedinih sekvenci (Vandamme, 2004). Ukratko, te sličnosti nisu rezultat nasljeđivanja od zajedničkog pretka.

1.2.1. Filogenetska stabla

Prema evolucijskoj teoriji svi organizmi evoluirali su od jednog zajedničkog pretka gledajući unatrag do pojave života, dok su do pojave današnje biološke raznolikosti doveli različiti evolucijski mehanizmi. Na taj su način svi oblici života međusobno povezani. Srodniji organizmi povezani su bližim zajedničkim pretkom od nesrodnih organizama s kojima su povezani preko starijeg zajedničkog pretka.

Filogenetsko stablo grafički je prikaz evolucijskih odnosa među pojedinim taksonomskim jedinicama ili samim genima, s glavnim zadatkom rekonstrukcije tih genetske veze između organizama i određivanja vremena koje je proteklo od trenutka kada su ti organizmi dijelili zajedničkog pretka. Važno je naglasiti da «pravo» filogenetsko stablo uvijek ostaje nepoznato; svako dobiveno stablo predstavlja samo određenu hipotezu čija je vjerojatnost proporcionalna količini raspoloživih podataka.

Svako filogenetsko stablo sastoji se od korova i grana, a način grananja određuje topologiju stabla. Korovi na filogenetskom stablu predstavljaju taksonomske jedinice ili taksone koji mogu biti vrste, populacije, jedinke ili geni. Postoje dva tipa korova: **vanjski** (krajnji) i **unutarnji korovi**.

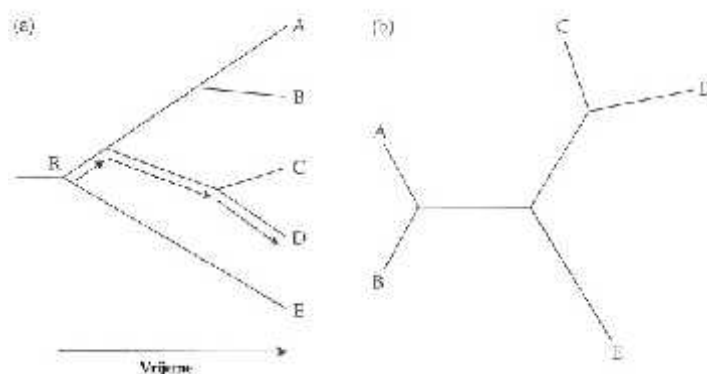
- a) vanjski korovi – predstavljaju taksonomske jedinice koje proučavamo (*operational taxonomic units - OTU*)
- b) unutarnji korovi – predstavljaju hipotetske zajedničke pretke taksonomskih jedinica koje proučavamo (*hypothetical taxonomic units - HTU*)

Grane ili ogranci predstavljaju topologiju stabla. Razlikujemo dva tipa ogranaka: **vanjski ili periferni i unutarnji ogranci**:

- a) vanjski ogranci – završavaju opisanim grupama
- b) unutarnji ogranci – povezuju hipotetske pretke

Duljina ogranka nam govori o trajanju evolucijskih procesa u toj razvojnoj liniji. Što je ogranak dulji proteklo je više vremena od po etka divergencije i nakupilo se više promjena na makromolekulama organizama.

Postoje dva osnovna tipa filogenetskih stabala, **ukorijenjeno i neukorijenjeno** filogenetsko stablo (Slika 5). Kod ukorijenjenih stabala postoji jedinstveni vor kojeg nazivamo korijen. On predstavlja pretka svih taksonomskih jedinica koje prouavamo. Neukorijenjena filogenetska stabla nam govore o odnosima taksonomskih jedinica koje prouavamo, ali nam ništa ne govore o njihovim precima.



SLIKA 5. (a) ukorijenjeno i (b) neukorijenjeno filogenetsko stablo. Strelice pokazuju jedinstveni put koji vodi od korijena R do taksonomske jedinice D. Preuzeto iz Lia (1997).

Za ukorjenjivanje filogenetskih stabala najčešće se koristi vanjska grupa (*outgroup rooting*). Ona nije član analizirane grupe taksonomskih jedinica, nego je to neka taksonomska jedinica za koju sa sigurnošću znamo da se odvojila u evolucijskoj prošlosti ranije od taksonomskih jedinica koje prouavamo. Vanjsku grupu izabiremo proizvoljno vode i računa da ne bude u predalekoj vezi s ostalim taksonomskim grupama, ali i da ne bude previše srodna sa taksonomskim grupama koje prouavamo, jer tada gubi svoju funkciju. Filogenetsko stablo možemo ukorijeniti i bez upotrebe vanjske grupe pomoću srednje točke (*midpoint rooting*). Polazi se od pretpostavke da je u stalnost 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. Ako na ukorijenjeno filogenetsko stablo ukomponiramo podatke dobivene pomoću molekularnog sata, a prouavane jedinice

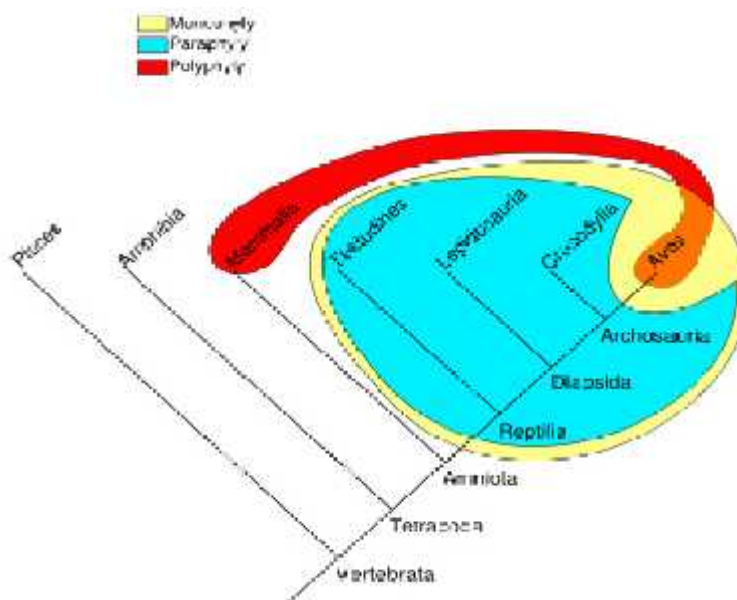
su organizmi, onda govorimo o **kladogramu** koji jasno pokazuje odnose predak-potomak me u organizmima ili grupom organizama (Vandamme, 2004).

Za opisivanje filogenetskih odnosa izme u pojedinim taksonomskih jedinica filogenetskog stabla upotrebljavamo sljede e pojmove:

monofiletska grupa -sve jedinke unutar te grupe potje u od istog pretka, a grupa ujedinjuje sve potomke toga pretka

parafiletska grupa- tako er sve jedinke potje u od istog pretka, ali nisu svi njegovi potomci unutar grupe

polifiletska grupa - sadrži vrste koje su evoluirale od dva ili više zajedni ka pretka (Pechenik, 2002) (Slika 6).



SLIKA 6. Prikaz filogenetskih odnosa me u pojedinim taksonomskim jedinicama filogenetskog stabla.

1.2.2. Rekonstrukcija filogenetskog stabla

Na osnovi evolucijske teorije smatramo da su sva živa bi a potekla od istog zajedni kog pretka koji je živio prije oko 3,8 milijardi godina. Zbog dugotrajnih evolucijskih procesa nekada srodni geni postanu toliko razli iti da pomo u njih ne možemo izvršiti pouzdanu filogenetsku rekonstrukciju. Za takve gene kažemo da su nehomologni. Velika sli nost nekih nehomolognih gena posljedica je sli nih evolucijskih procesa tj. sli nog selekcijskog pritiska što dovodi do konvergentne ili paralelne evolucije. Osim toga ve a sli nost sekvenci od o ekivane 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 veću značajku u filogenetičkim istraživanjima. Mutacijska stopa kod nukleotidnih sekvenci i proteina je 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 (Vandamme, 2004).

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, ovisno o tome koriste li se diskretni podaci («*Character-state*» metode) ili matrice udaljenosti (*Distance Matrix*) među parovima, te grupiraju li se pojedini podaci postepeno (uzastopno grupiranje - *Stepwise clustering*) i tako daju samo jedno moguće stablo, ili se u obzir uzimaju sva teoretski moguća stabla (iscrpana pretraga - *Exhaustive search*).

Prikaz najčešće korištenih metoda dan je u Tablici 1.

TABLICA 1. Prikaz najčešće korištenih metoda u molekularnoj filogeniji (preuzeto iz Vandamme, 2004)

	Exhaustive search	Stepwise clustering
Character State	Maximum parsimony (MP) Maximum likelihood (ML)	
Distance Matrix	Fitch- Margoliash	UPGMA Neighbour – joining

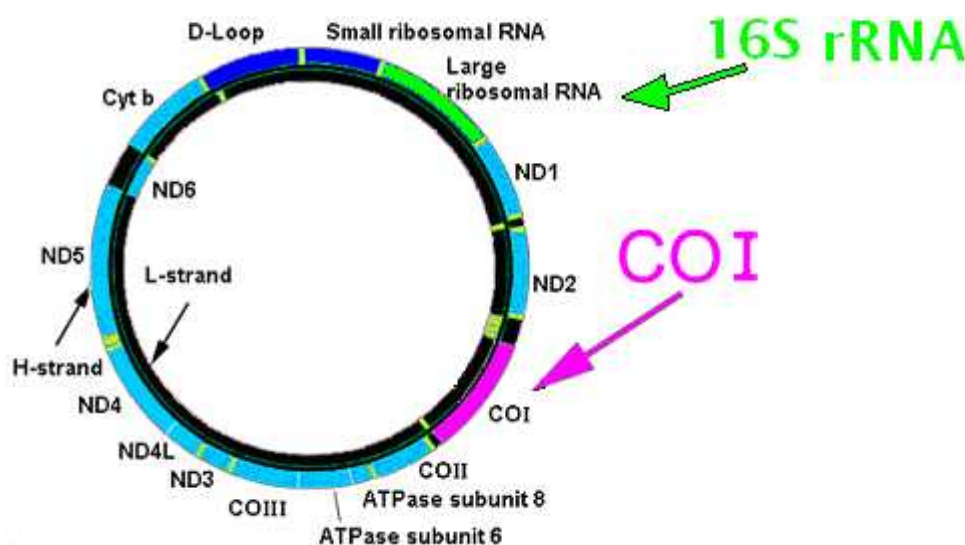
Bayesian analiza – Zaključivanje pomoću Bayesovog teorema relativna je novost u filogeniji (Rannala i Yang, 1996; Mau i Larget, 1997; Li i sur., 2000). Zaključak se temelji na prethodnim spoznajama o podacima i njihovoj distribuciji (*prior expectation/ prior distribution*), koriste i naknadne vjerojatnosti (*posterior probabilities*) koje su procijenjene na osnovi nekog modela. Ova analiza provodi se upotrebom Markov Chain Monte Carlo (MCMC) metoda koje se baziraju na nizu neovisnih potraga za skupom najboljih stabala, s povremenim izmjenama informacija među potragama. Tako se stvara naknadna distribucija (*posterior distribution*).

1.3. MITOHONDRIJSKI GENOM

Mitochondriji su stani ni organeli koji se mogu na i u ve ini eukariotskih stanica. Iako je ve ina stani ne DNA sadržana u stani noj jezgri, mitochondriji imaju svoj vlastiti genom. Eukariotska stanica sadrži od nekoliko stotina do nekoliko tisu a mitochondrija svaki sa nekoliko kopija vlastite DNA. Smatra se da su mitochondriji rezultat endosimbiontskog doga aja koji se odigrao prije više od milijardu godina (Margulis, 1970) u kojem je prokariotska stanica, sposobna za oksidativnu fosforilaciju ušla u endosimbiontski odnos s arhealnom stanicom. Mitohondrijska DNA ima oblik kružne dvolan ane molekule iji je sastav gena gotovo identi an kod svih organizama. Veli ina mtDNA varira od 14-42 kb.

Mitohondrijske DNA iz životinjskih stanica kodiraju 13 proteinskih molekula (me u ostalima i podjedinicu I citokrom oksidaze: COI), 22 molekule tRNA i dvije molekule rRNA (16S rRNA i 12S rRNA). Iako geni zauzimaju ve inu mitohondrijskog genoma, postoji nekodiraju a regija veli ine oko 1200 parova baza tzv. d-Loop ili kontrolna regija koja se nalazi s obje strane dogovorene pozicije «0». U toj se regiji nalaze signali koji kontroliraju sintezu molekula RNA i DNA. Zbog toga što akumulira to kaste mutacije 10 puta više nego jezgrina DNA naziva se još i hipervarijabilnom regijom (Hwang i Kim, 1999) (Slika 7).

Zbog lako e izolacije, velikog broja kopija (tisu e do stotine tisu a kopija po stanici), nepostojanja genske rekombinacije i introna, naslje ivanja po maj inoj liniji i time manje efektivne veli ine populacije (Moore, 1995), te relativno brze evolucije u odnosu na jezgrinu DNA (Brown i sur., 1982), mitohondrijska DNA se esto koristi za odre ivanje filogenetskih odnosa na razli itim taksonomskim razinama (Yamauchi i sur., 2002).



SLIKA 7. Prikaz životinjske mitohondrijske DNA s izvorištima replikacije i transkripcije, te genima koji se naj češće koriste kao filogenetski biljezi

Razvoj tehnike lanane reakcije polimerazom (PCR) i postojanje više konzerviranih po etnica za amplifikaciju specifičnih gena na mitohondrijskoj DNA kod različitih rodova, u kombinaciji sa sekvenciranjem DNA i bioinformatikom, povećalo je upotrebu mtDNA u filogenetskim istraživanjima (Palumbi i Benize, 1991, Simon i sur., 1994, Verovnik i sur., 2004; Trontelj i sur., 2005, Schubart i Hubert, 2006)

1.3.1. Gen za 16S rRNA

Gen za 16S rRNA kodira RNA velike podjedinice mitohondrijskih ribosoma. Velik je 1,542 parova baza, te je konzerviran u primarnoj strukturi. To znači da se nije puno mijenjao tokom evolucijske prošlosti mitohondrijske DNA.

Ovaj gen za rRNA često se upotrebljava u molekularno filogenetskim istraživanjima, usprkos toga što se značajan broj različitih gena nalazi i u sastavu jezgrine DNA. Razlog tome je što za razliku od jezgrinih gena mitohondrijski gen za rRNA je mnogo jednostavnije građen 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).

Neke prednosti korištenja 16S rRNA gena: ima veću rezoluciju u odnosu na alozime (Crandall, 1996), potencijal za otkrivanje genetičkih razlika u rakovima, pogotovo slatkovodnih (Crandall, 1996) te činjenica da je taksonomija roda *Austropotamobius* jednim dijelom bazirana na ovom genetičkom markeru (Grandjean i sur., 2000, 2002, Fratini i sur., 2005).

1.3.2 Gen za podjedinicu I citokrom-oksidge (COI)

Gen za citokrom-oksidge I kodira podjedinicu I kompleksa citokrom-oksidge c koja je dio elektronskog transportnog lanca u procesu oksidativne fosforilacije. Njegova aminokiselinska sekvencija je visoko konzervirana među koljenima što omogućava jednostavno sravnjivanje sekvencija i izradu univerzalnih po etnica. Aminokiselinske sekvence citokrom-oksidge I korisne su za istraživanje davnih evolucijskih događaja.

Ovaj gen se smatra jednim od najkorisnijih molekularnih filogenetskih biljega iz nekoliko razloga. Kao terminalni katalizator u mitohondrijskom respiratornom lancu, citokrom-oksidge I je dobro biokemijski istražena te je zaključeno da je njena veličina i struktura sačuvana kod svih aerobnih organizama (Saraste, 1990). Druga bitna karakteristika ovog gena kao filogenetskog biljega je da kodira najveću od tri proteinske podjedinice kompleksa citokrom-oksidge c (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.

Gen za COI ima dvije bitne prednosti. Kao prvo, univerzalne početnice za ovaj gen su vrlo stabilne, omogućuju i dobivanje njihovog 5' dijela iz pripadnika većine, ako ne i svih, životinjskih vrsta. Isto tako, COI vjerojatno ima jači filogenetski signal (odnosno pokazuje bolji omjer stvarnog signala u odnosu na pozadinski, tj. «noise» signal) od svih mitohondrijskih gena. Zbog visoke konzerviranosti aminokiselinske supstitucije su rijetke mutacije u vrstama, ali te (istoznačne) promjene imaju jednaku učestalost kao i u svim ostalim genima mitohondrijske DNA. S ostalim genima koji kodiraju proteine zajedničko mu je da nukleotidi na trećoj poziciji kodona pokazuju veliku sklonost baznim supstitucijama. Ipak, promjene u aminokiselinskim sekvencama se događaju sporije nego kod ostalih mitohondrijskih gena. Verovnik i sur. (2004) uspješno su iskoristili COI genetički marker za filogeografsku analizu vodenobabure (*Asellus aquatica*, Crustacea: Isopoda), a Trontelj i sur. (2005) upotrijebili su COI sekvence za određivanje filogenetskih i filogeografskih odnosa vrsta roda *Austropotamobius* na većem dijelu njihovog areala.

1.4. FILOGEOGRAFIJA

Filogeografija je najmlađa i najbrže razvijajuća grana evolucije koja se razvila iz spoznaje da linije mitohondrijske DNA u prirodnim populacijama često imaju karakterističnu geografsku distribuciju. Za etnik ovog područja u evoluciji je John Avise, a njegove pretpostavke i zaključci temelje se na jasno izraženoj vezi između geografske strukturiranosti vrsta i filogenetske prošlosti mitohondrijske DNA, koja je prisutna kod mnogih vrsta (Avise i sur. 1987).

Filogeografija je moćno oruđe za identifikaciju procesa koji su utjecali na genetički sastav vrsta ili skupine vrsta. Primjenu može naći u rasvjetljavanju povijesnih događaja, primjerice fragmentacija staništa ili proširenje areala, koji su utjecali na populacijsku strukturu vrste ili su bili uzrok specijaciji. Jedan od ciljeva filogeografije je rekonstrukcija povijesnih demografskih procesa odgovornih za nejednoliku raspodijeljenost genskih linija (Ronquist 1997).

Zahvaljujući prihvaćanju biomolekularnih metoda u polju konzervacijske biologije, filogeografska istraživanja omogućila su identifikaciju evolucijski značajnih jedinica (*Evolutionary Significant Unit* - ESU) (Moritz, 1994) na koje treba posebno obratiti pozornost pri izradi plana za zaštitu neke vrste ili područja.

CILJ
ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja su:

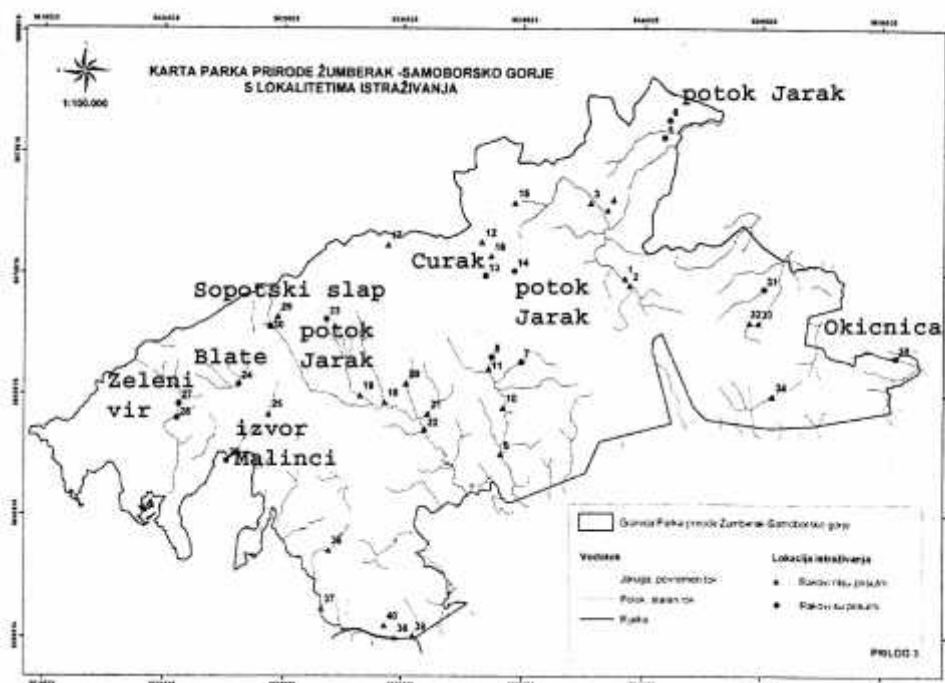
- utvrđivanje stupnja genetičke raznolikosti populacija vrste *Austropotamobius torrentium* na području Parka prirode »Žumberak-Samoborsko gorje« i korelacija s drugim populacijama ove vrste na području Europe
- pokušati rekonstruirati događaje tijekom pliocena i pleistocena na području današnje jugoistočne Europe koji su imali utjecaj na evoluciju i distribuciju vrste *Austropotamobius torrentium*
- utvrđivanje morfoloških (morfometrijskih i merističkih) karakteristika populacija potonog raka na području Parka prirode »Žumberak-Samoborsko gorje« i izdvajanje onih morfoloških značajki po kojima se rakovih različitih populacija značajno razlikuju
- povezati rezultate molekularno-filogenetičkih i morfoloških analiza
- rezultate ovog istraživanja sagledati u kontekstu zaštite vrste *Austropotamobius torrentium*

MATERIJAL
I METODE

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Životinjski materijal

U izradi eksperimentalnog dijela diplomskog rada korišteni su uzorci vrste poto ni rak, *Austropotamobius torrentium* prikupljeni s 9 lokacija (Slika 8, Tablica 2) na području Parka prirode «Žumberak-Samoborsko gorje».



SLIKA 8. Karta PP Žumberak-Samoborsko gorje s upisanim lokacijama na kojima su sakupljene jedinke rakova za morfološke-merističke i molekularno-biološke analize (preuzeto iz Pršir, 2005)

TABLICA 2 Lokaliteti i njihove koordinate te broj ulovljenih rakova i njihov spol

lokacija	Koordinata x	koordinata y	nm visina/ m	broj i spol analiziranih rakova
potok Jarak (lijeva pritoka Bregane)	554 5858	507 6740	252	3m, 1ž
potok Curak (Izvir, iznad sela Glušinja)	553 7996	507 0725	594	2m, 1ž
potok Jarak (pritoka Žumbera ke Slapnice, selo Jeleni)	553 9043	506 6844	393	1m, 1ž
potok Okicnica	555 5132	506 7356	422	3m
ispod Sopotskog slapa	506 8913	553 1338	517	3m, 5ž
potok Jarak (pritoka Žumbera ke Slapnice)	506 8686	552 8980	660	5m, 4ž
potok Zeleni vir	506 4775	552 5047	546	7m, 1ž
Izvor poslije Malinaca (pritoka Jamnika)	506 4737	552 7614	592	5m, 7ž
potok Blate	506 6248	552 7626	654	8m, 4ž

Rakovi su lovljeni rukom i vršama koje smo napravili od plasti nih boca i mrežice (slika 9), a kao mamac poslužili su komadi kranjske kobase. Postavljeno je po četiri do pet vrša u potoke u kojima je u prethodnom istraživanju (Pršir, 2005) utvrđeno prisustvo potonih rakova i to u razmacima od nekoliko metara. Vrše smo uvrstili pomoću kamenja ili granja, a na lokacijama su ostavljene oko dva dana.



SLIKA 9. Ručno izrađena vrša

3.1.2. Analizirane sekvence

Iz ulovljenih jedinki vrste *A. torrentium* izolirana je DNA (metodama opisanim u poglavlju «Metode») te je svakom uzorku dodijeljena oznaka i šifra (Tablica 3).

Ovim sekvencama dodano je još 47 (22 za 16S rRNA i 25 za COI) sekvenci jedinki sakupljenih većinom u Hrvatskoj te u Bosni i Hercegovini, Makedoniji, Rumunjskoj i Bugarskoj te 35 (tri za 16S rRNA i 32 za COI) dodatnih sekvenci preuzetih iz baze podataka GenBank (NCBI – National Center for Biotechnology Information) (Tablica 4 i 5). Sekvence su dodane kako bi se analizirani uzorci nadopunili sa svim dostupnim i poznatim sekvencama vrste *A. torrentium*, te za utvrđivanje filogenetskih odnosa populacija *A. torrentium* sakupljenih u PP Žumberak-Samoborsko gorje s ostalim populacijama *A. torrentium* u ostatku Hrvatske i Europe.

Kao vanjska grupa za molekularno-filogenetske analize korišten je uzorak vrste riječnog raka *Astacus astacus*.

TABLICA 3. Lokacije u PP Žumberak-Samoborsko gorje na kojima su sakupljane jedinke *A. torrentium* iji je gen za 16S rRNA i COI sekvenciran, i njihov broj.

NALAZIŠTE	oznaka DNA	šifra	haplotip 16S	haplotip COI
potok Okinica	1zs	okic1	okic1	/
	2zs	okic2	okic1	okic2
	3zs	okic3	okic3	/
potok Jarak	4zs	jarakbr1	jarcur1	jarakbr1
	5zs	jarakbr2	jarakbr2	/
	6zs	jarakbr3	jarcur1	jarakbr3
	7zs	jarakbr4	jarakbr4	/
potok Curak	8zs	curak1	jarcur1	/
	9zs	curak2	curak2	/

	10zs	curak3	jarcur1	/
potok Jarak - selo Jeleni	11zs	jarakjel1	jarakjel1	jarakjel1
	12zs	jarakjel2	jarakjel1	jarakjel2
Sopotski slap	13zs	sopot1	jarsopslp1	sopot2
	14zs	sopot2	jarsopslp1	sopot1
	15zs	sopot3	jarsopslp1	jaraksla1
	16zs	sopot4	jarsopslp1	sopot1
	17zs	sopot5	jarsopslp1	sopot1
	18zs	sopot6	jarsopslp1	sopot1
	19zs	sopot7	jarsopslp1	jaraksla1
	20zs	sopot8	jarsopslp1	sopot3
potok Jarak	33zs	jaraksla1	jarsopslp1	/
	34zs	jaraksla2	jarsopslp1	/
	35zs	jaraksla3	jarsopslp1	jaraksla1
	36zs	jaraksla4	jarsopslp1	jaraksla1
	37zs	jaraksla5	jarsopslp1	jaraksla4
	38zs	jaraksla6	jaraksla5	jaraksla5
	39zs	jaraksla7	jarsopslp1	jaraksla1
	40zs	jaraksla8	/	jaraksla1
	41zs	jaraksla9	jarsopslp1	jaraksla1
Zeleni vir	42zs	zelvir1	zelvir1	/
	43zs	zelvir2	zelvir2	zelvir3
	44zs	zelvir3	zelvir3	zelvir1
	45zs	zelvir4	zelvir3	zelvir4
	46zs	zelvir5	zelvir1	zelvir1
	47zs	zelvir6	zelvir2	zelvir5
	48zs	zelvir7	zelvir2	zelvir6
	49zs	zelvir8	zelvir2	zelvir7
izvor poslije Malinaca	50zs	izvma1	blatizvm1	izvma1
	51zs	izvma2	blatizvm1	izvma4
	52zs	izvma3	blatizvm1	izvma1
	53zs	izvma4	blatizvm1	izvma1
	54zs	izvma5	blatizvm1	izvma5
	55zs	izvma6	blatizvm1	izvma6
	56zs	izvma7	blatizvm1	izvma3
	57zs	izvma8	blatizvm1	izvma2
	58zs	izvma9	blatizvm2	izvma2
	59zs	izvma10	blatizvm1	izvma7
	60zs	izvma11	blatizvm1	izvma3
	61zs	izvma12	blatizvm1	izvma1
potok Blate	21zs	blate1	blatizvm1	blate1
	22zs	blate2	blatizvm1	blate2
	23zs	blate3	blatizvm2	blate3
	24zs	blate4	blate4	blate4
	25zs	blate5	blatizvm1	blate2
	26zs	blate6	blatizvm1	blate2
	27zs	blate7	blatizvm1	blate5
	28zs	blate8	blatizvm1	blate1
	29zs	blate9	blatizvm1	blate1
	30zs	blate10	blatizvm1	blate1
	31zs	blate11	blatizvm1	blate6
	32zs	blate12	blatizvm1	blate7

TABLICA 4. 16S sekvence prikupljene na području Austrije (AT), Bugarske (BG), Hrvatske (HR), Makedonije (MK) i Rumunjske (RO) te sekvence preuzete s NCBI-a prikupljene na području Austrije (AT), Bugarske (BG) i Slovenije (SI). Sekvence su svrstane po haplotip grupama (Dunav – središnja i jugoistočna Europa, GK - Gorski Kotar, LD – Lika i Dalmacija, SM – južni Balkan, ŽPB – Žumberak/Ptlitvice/Bjelolasica). Pristupni broj (GenBank Accession number) sekvenci izoliranih u laboratoriju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta po inje slovima "EF".

Haplotip	Haplotip grupa	NCA identifikacija	Lokalitet	broj jedinki	GenBank Accession number
Aarbach	Dunav	cse1	Aarbach, Reutte, AT	1	EF999959
CarasSeverin1	Dunav	cse2	bezimeni potok, Dunavski sliv, Cerna, RO	2	EF999956
CarasSeverin2	Dunav	cse3	bezimeni potok, Dunavski sliv, Cerna, RO	1	EF999955
Dolje	Dunav	cse4	Dolje, Podsused, HR	2	EF999954
Dolje	Dunav	cse4	Kraljevec, Zagreb, HR	1	EF999954
Dolje	Dunav	cse4	Dubravica, Pušća, HR	1	EF999954
Dolje	Dunav	cse4	Sarni, Kraljev vrh, HR	2	EF999954
Dolje	Dunav	cse4	Mrzlak, Zagreb, HR	1	EF999954
Dolje	Dunav	cse4	bezimeni potok, Dunavski sliv, Cerna, RO	1	EF999954
Gracani	Dunav	cse5	bezimeni potok, Mrzlo polje Žumberaka, HR	1	EF999957
Gracani	Dunav	cse5	Gracanski potok, Zagreb, HR	1	EF999957
Gracani	Dunav	cse5	Mrzlak, Zagreb, HR	1	EF999957
Ivanec	Dunav	cse6	Ivančica, Željeznica, Ivanec, HR	1	EF999952
Ivanec	Dunav	cse6	Veliki potok, Zagreb, HR	1	EF999952
Logatec	Dunav	cse7	Reka, pritoka rijeke Logašica, Logatec, SI	3	AM181347
Lonja	Dunav	cse8	Lonja, Paka, HR	1	EF999953
RRositsa	Dunav	cse9	bezimeni potok, Dunavski sliv, Gorna Rositsa, BG	3	EF999958
SGermany	Dunav	cse10	južna Njemačka, DE i AT	9+1	AM181346
Vrhovci	Dunav	cse11	bezimeni potok, Crkveni Vrhovci, HR	1	EF999960
CrniLug	GK	gk1	Gerovica, Gerovo, HR	1	EF999950
CrniLug	GK	gk1	bezimeni potok, Crni lug, HR	4	EF999950
CrniLug	GK	gk1	bezimeni potok, Risnjak, HR	1	EF999950
Kupjak	GK	gk2	bezimeni potok, Kupjak, HR	1	EF999951
Knin1	LD	ld1	Rakov potok, Knin, HR	4	EF999968
Knin2	LD	ld2	Rakov potok, Knin, HR	1	EF999967
Lika	LD	ld3	Prijeboj, Plitvica, HR	1	EF999969
Lika	LD	ld3	Ušća Kravine, Plitvica, HR	1	EF999969
Lika	LD	ld3	Plitvička jezera, Plitvica, HR	3	EF999969
Lika	LD	ld3	Source Jezero, Cetina, Sinj, HR	1	EF999969
Lika	LD	ld3	pritoka Zrmanja, Knin, HR	4	EF999969
Lika	LD	ld3	bezimeni potok, pritoka rijeke Unac, Preodac, BA	2	EF999969
Bosava	SB	sb1	Bošava, planina Kožuf, MK	3	EF999963
Jakupica	SB	sb2	bezimeni potok, Bitola, MK	1	EF999965
Jakupica	SB	sb2	bezimeni potok, planina Jakupica, MK	2	EF999965
RGornja	SB	sb3	bezimeni potok, Vasov grad, planina Kožuf, MK	1	EF999964
RGornja	SB	sb3	bezimeni potok, Gorna Reka, planina Kožuf, MK	1	EF999964
SBistrica	SB	sb4	Sandanska Bistrica, pritoka rijeke Struma, BG	2	AM181348
Sedrac1	SB	sb5	bezimeni potok, sliv rijeke Mesta, Sedrac, BG	2	EF999961
Sedrac2	SB	sb6	bezimeni potok, sliv rijeke Mesta, Sedrac, BG	1	EF999962
Vrljika	SB	sb7	Vrljika, kanal Badnjevice, Imotski, HR	1	EF999966
Bjelolasica	ZPB	zpb1	bezimeni potok, Bjelolasica, HR	1	EF999971
Zumberak	ZPB	zpb2	Suvaja, Žumberak, HR	1	EF999970
Zumberak	ZPB	zpb2	Sartuk, Plitvica, HR	1	EF999970
OUTGROUP <i>Astacus astacus</i>					DQ320033

TABLICA 5. COI sekvence prikupljene na području Austrije (AT), Bugarske (BG), Hrvatske (HR), Makedonije (MK) i Rumunjske (RO) te sekvence preuzete s NCBI-a prikupljene na području Austrije (AT), Bugarske (BG), Crne Gore (ME), Francuske (FR), Grčke (GR), Luksemburga (LU), Njemačke (DE), Slovenije (SI), Švicarske (CH) i Turske (TR). Sekvence su svrstane po haplotip grupama (Dunav – središnja i jugoistočna Europa, GK - Gorski Kotar, LD – Lika i Dalmacija, SM – južni Balkan, ŽPB – Žumberak/Ptltivice/Bjelolasica). Pristupni broj (GenBank Accession number) sekvenci izoliranih u laboratoriju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta po inje slovima "EF".

Haplotip	Haplotip grupa	Lokalitet	broj jedinki	GenBank Accession number
Bohinj	Dunav	Bohinjska Bela, Bled, SI	2	AY667124
Breisgau	Dunav	Aarbach, Reutte, AT	1	EF640357
Breisgau	Dunav	slivovi Rajne i Dunava, DE i CH	29	AM180942
Breisgau	Dunav	Algäu, Haldensee, AT	11	AM180943
Breisgau	Dunav	Schlierbach, Bliesbruck, Sarreguemines, FR	1	AY667141
Breisgau	Dunav	Gailbach, Obergailbach, Sarreguemines, FR	1	AY667141
Breisgau	Dunav	Freiburg im Breisgau, DE	1	AY667141
CarasSeverin1	Dunav	bezimeni potok, Dunavski sliv, Cerna, RO	1	EF640362
CarasSeverin2	Dunav	bezimeni potok, Dunavski sliv, Cerna, RO	1	EF640363
CarasSeverin4	Dunav	bezimeni potok, Dunavski sliv, Cerna, RO	1	EF640365
CentrSI	Dunav	Rakitna, Ljubljana, SI	1	AY667127
CentrSI	Dunav	rijeka Iška, Ljubljana, SI	1	AY667127
CentrSI	Dunav	Hotenjka Creek, Logatec, SI	1	AY667127
CentrSI	Dunav	Jazbinški potok, Žerjav, SI	1	AY667127
CentrSI	Dunav	Piano di Fusine, Tarvisio, IT	1	AY667127
Cerkno	Dunav	rijeka Cerknica, Cerkno, SI	1	AY667122
Dolje	Dunav	Dolje, Podsused, HR	1	EF640334
Dovje	Dunav	Dovje, Jesenice, SI	1	AY667142
Dubravica	Dunav	Dubravica, Pušća, HR	1	AM180947
Dubravica	Dunav	Veliki potok, Zagreb, HR	1	AM180947
Dubravica	Dunav	Reka, pritoka rijeke Logašica, Logatec, SI	3	AM180947
Gail	Dunav	pritoka rijeke Slizza, Tarvisio, IT	1	AY667130
Gail	Dunav	Schinzengraben, Pressegger See, Hermangor, AT	1	AY667130
Gail	Dunav	Zainer Bach, Arnoldstein, AT	3	AY667130
GLazi	Dunav	Gorenji Lazi, Ribnica, SI	1	AY667144
Glinjsca	Dunav	draga Glinjsca, Ljubljana, SI	1	AY667128
Gracani	Dunav	Gracanski potok, Zagreb, HR	1	EF640346
Grapca	Dunav	Baška grapa, Tolmin, SI	1	AY667121
Ivanec	Dunav	Ivančica Željeznica, Ivanec, HR	1	EF640332
Kraljevec	Dunav	Kraljevec, Zagreb, HR	1	EF640341
Rakitna	Dunav	Rakitna, Ljubljana, SI	1	AY667126
Rouderbaach	Dunav	Algäu, Auerberg, Bavaria, DE	1	AM180945
Rouderbaach	Dunav	Algäu, Dachssee, Bavaria, DE	3	AM180944
Rouderbaach	Dunav	Rouderbaach, Grevenmacher, LU	1	AY667143
RRositsa1	Dunav	bezimeni potok, Dunavski sliv, Gorna Rositsa, BG	2	EF640366
RRositsa2	Dunav	bezimeni potok, Dunavski sliv, Gorna Rositsa, BG	1	EF640367
Sarni	Dunav	Sarni, Kraljev vrh, HR	1	EF640344
Velika	Dunav	Velika, Demirköy, Kirklareli, TR	1	AY667131
VelikiPotok	Dunav	Veliki potok, Zagreb, HR	1	EF640349
Vrhovci	Dunav	bezimeni potok, Crkveni Vrhovci, HR	2	EF640342
Wienerwald	Dunav	Wienerwald, istočna AT	1	AM180946
Zala	Dunav	draga Zala, Godovi, Idrija, SI	1	AY667123
Zaplana	Dunav	Zaplana, Logatec, SI	1	AY667129
CrniLug	GK	bezimeni potok, Crni lug, HR	1	EF640338
GrivackiP	GK	Grivacki potok, Grivac, Kočevje, SI	1	AY667145

Kupa	GK	Gerov ica, Gerovo, HR	1	EF640336
Kupa	GK	rijeka Kupa blizu Dolenja Žaga, Ko evje, SI	1	AY667140
Osilnica	GK	draga Belica, Ko evje, SI	3	AY667125
Cetina	LD	Source Jezero, Cetina, Sinj, HR	1	EF640348
Prijeboj	LD	Prijeboj, Plitvica, HR	1	EF640340
Bosava1	SB	Bošava, planina Kožuf, mountain, MK	1	EF640352
Bosava1	SB	Bošava, planina Kožuf, MK	1	EF640352
Bosava2	SB	Bošava, planina Kožuf, MK	1	EF640353
Jakupica	SB	bezimeni potok, planina Jakupica, MK	1	EF640350
RGornja	SB	bezimeni potok, Gorna Reka, planina Kožuf, MK	1	EF640355
Batania	SB	Batania, Koupa, Polikastro, GR	2	AY667138
Kefalari	SB	Ano Kefalari, Drama, GR	1	AY667132
Koursovit	SB	Koursovit, Karidohóri, Sidiróastro, GR	1	AY667134
Maras	SB	Maras, Pige, Drama, GR	1	AY667133
Milli1	SB	Milli, Angístro, Sidiróastro, GR	1	AY667135
Milli2	SB	Milli, Angístro, Sidiróastro, GR	1	AY667137
Ramna	SB	Ramna, Akritohóri, Sidiróastro, GR	2	AY667136
RCrnojevica	SB	Rijeka-Crnojevica, Cetinje, ME	1	AY667139
Struma	SB	pritoka rijeke Struma, Sandanska Bistrica, BG	2	AM180948
Vrljika	VR	Vrljika, kanal Badnjevice, Imotski, HR	1	EF640356
Bjelolasica	ZPB	bezimeni potok, Bjelolasica, HR	1	EF640358
Sartuk	ZPB	Sartuk, Plitvica, HR	1	EF640339
Suvaja	ZPB	Suvaja, Žumberak, HR	1	EF640337
OUTGROUP	<i>Astacus astacus</i>			AY667146

3.1.3. Reagensi i laboratorijski materijal za molekularno filogeneti ke metode

Kemikalije

- KEMIKA (Hrvatska)
 - Etanol
 - Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA)
 - Izopropanol
 - Kloridna kiselina
 - Natrijev klorid
 - Octena kiselina
- SIGMA (SAD)
 - Etidij – bromid
 - Natrij - dodecil sulfat (SDS)
 - Orange G (boja)
- RIEDEL-deHAËN (Njema ka)
 - Tris-(hidroksimetil)-aminometan (TRIS)
- ROCHE (Švicarska)
 - Agaroza LE
 - mQ H₂O (ultra ista voda, filtrirana preko sustava milli-Q)
 - DNA faga

Puferske otopine

- 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

Osnovni laboratorijski materijali

- EPPENDORF (Njema ka)
 - Nastavci za mikropipete 10 mL, 200 mL i 1000 mL
 - Mikropravete 1,5 mL
 - Mikropravete 1,5 mL *Safe-Lock*
 - PCR-mikropravete 0,5 mL *Thin-Walled*
 - PCR-mikropravete 0,2 mL
- GILSON (SAD)
 - Nastavci za mikropipete 10 mL, 200 mL, 1000 mL i 10 mL
- MOLECULAR BIOPRODUCTS (SAD)
 - ART 10mL, 20 mL i 200 mL - nastavci za mikropipete s filterima
- PECHINEY PLASTIC PACKAGING (SAD)
 - Parafilm M – Laboratory film
- TROGE (Njema ka)
 - TRO-SENSOSOFT[®] vinyl - zaštitne rukavice

Enzimi

- ROCHE (Švicarska)
 - RNaza A
 - proteinaza K
- QIAGEN (Njema ka)
 - proteinaza K

Po etnice za lan anu reakciju polimerazom

- INVITROGEN (SAD)
 - Invitrogen Custom Primers
 - 16Sar:** 5'- CGCCTGTTTATCAAAAACAT – 3'
 - 16Sbr:** 5' – CCGGTCTGAACTCAGATCACGT -3'
 - LCO-1490:** 5' – GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG – 3'
 - HCO-2198:** 5' – TAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA -3'

Elektroforetski standardi

DNA vrste *Tenebrio molitor* djelomično razgrađena restrikcijom endonukleazom *EcoRI* koja daje ljestvicu fragmenata po etnog monomera veličine 142 pb te njegovih višekratnika.

Kompleti reagensa

EPPENDORF (Njemačka)
HotMasterMix (2.5X) - komplet reagensa za laničanu reakciju polimerazom

ROCHE (Švicarska)
High Pure PCR Product Purification Kit - komplet reagensa za pročišćavanje produkata lanične reakcije polimerazom (PCR) 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 lanične reakcije polimerazom (PCR)

Tehnika oprema i uređaji

Adapteri za centrifugu: Adapteri za 0.2 mL PCR-mikroeprovete 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 Koreja)
Mikropipete: Pipetman 2 μ L, 20 μ L, 200 μ L, 1000 μ L 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)
Rezač parafilma: Heathrow Scientific (SAD)
Termostat: ThermoStat plus (Eppendorf, Njemačka)
Thermal cycler: Mastercycler personal (Eppendorf, Njemačka)
Transiluminator: UV Transilluminator TR2000 (Bio-Rad, SAD)
Vodene kupelji: High Performance Water Bath 1225 (Shell Lab, SAD)
Vortex miješalica : Bibby Sturat Vortex Mixer SA7 (Barloworld, UK)
Zamrzivač -80 °C: Ultra Low Temperature Freezer U101-86 (New Brunswick Scientific, UK)
Zamrzivač -20 °C i hladnjak +4 °C: Express Cool GR-282MF (LG, Republika Koreja)
Zatvarač za PCR-mikroeprovete: Capping Aid (Eppendorf, Njemačka)
Zaštitni pokrov od UV zračenja za transiluminator s nosačem za digitalnu kameru: Digital Hood DH-27 (Peca Products Inc., SAD)

3.2. METODE

3.2.1. Izolacija DNA

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. Time smo dobili dvije različite koncentracije DNA koje smo koristili u eksperimentu.

3.2.2. Umnažanje fragmenata DNA lančanom reakcijom polimerazom (PCR)

Reakcija umnažanja fragmenata DNA lančanom reakcijom polimerazom izvedena je u volumenu reakcijske smjese od 50 µL koja je sadržavala pojedine reagensne, u sljedećim omjerima:

Enzim HotMaster™ Taq – Taq 1,5U, PCR pufer 1 X,
dNTP 0,25 mM, MgCl₂ 2,5 mM, Početnice 0,4 µL, DNA kalup 25-200 ng

Uz svaki niz PCR reakcija upotrebljavana je negativna kontrola koja sadrži iste količine svih sastojaka kao i PCR smjesa izuzev prisutnosti kalupa DNA. Negativne kontrole u svakom nizu PCR reakcija radimo kako bi ustanovili eventualnu kontaminaciju kompleta reagensa ili pojedinih sastojaka PCR smjese.

Umnažanje fragmenata DNA lančanom reakcijom polimerazom započinjalo je dvominutnom preddenaturacijom kalupa DNA na 94 °C iz čega je uslijedilo 30 do 35 ciklusa programa. Svaki ciklus se sastoji od tri karakteristična koraka. Prvo se odvija denaturacija kalupa DNA, nakon denaturacije dolazi do sljepljivanja početnica i DNA kalupa, te na kraju do sinteze novih fragmenata DNA molekule. Ovisno o uporabljenom kompletu reagensa ili enzima pojedini koraci su imali različita vremena trajanja (Tablica 6). Broj ciklusa (n) je bio 30 ili 35 ovisno o korištenom kompletu reagensa ili enzima.

Svaki program okončan je završnom reakcijom sinteze DNA u trajanju 7 minuta na 65 °C ili 72 °C ovisno o kompletu reagensa ili enzimu. Time je omogućeno dovršavanje sinteze svih započetih fragmenata DNA te dodavanje adenzina na 3' kraj svakog fragmenata koji omogućava, prema potrebi, kloniranje PCR produkata u T-plazmidni vektor.

TABLICA 6. Vremena trajanja (t/s) i temperature (T/°C) na kojima su se odvijali pojedini koraci ciklusa umnažanja fragmenata lančanom reakcijom polimerazom (PCR), n – broj ciklusa

Kit/Enzim	PRE-DENATURACIJA		DENATURACIJA		SLJEPLJIVANJE		SINTEZA		ZAVRŠNA SINTEZA		n
	T°C	t/s	T°C	t/s	T°C	t/s	T°C	t/s	T°C	t/s	
PCR Master	94	120	94	30	55	40-45	65	60	72	420	30
HotMasterMix	94	120	94	30	50	40-45	72	40	72	420	35

U reakcijama lan anom reakcijom polimezarom korištene su po etnice za umnažanje fragmenta 16S rRNA gena (Simon i sur. 1994) i po etnice za umnažanje fragmenta gena za podjedinicu I citoktom-oksidge (COI) (Folmer i sur., 1991).

16Sar: 5' - CGCCTGTTTATCAAAAACAT - 3'

16Sbr: 5' - CCGGTCTGAACTCAGATCACGT - 3'

LCO-1490: 5' – GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG – 3'

HCO-2198: 5' – TAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA -3'

Po etnica 16Sar duga je 20 parova baza, a 16Sbr 22 parova baza. Obje su uravnoteženog nukleotidnog sastava, te nemaju osi simetrije. Stupanj me usobne sli nosti u nukleotidnom slijedu izme u po etnica specifi nih za umnažanje pojedinog fragmenta je nizak. Ostale karakteristike po etnica dane su u tablici.

Po etnice za COI su duge 25 i 26 nukleotida, te su uravnoteženog nukleotidnog sastava. Nemaju osi simetrije. Stupanj me usobne sli nosti u nukleotidnom slijedu me u po etnicama specifi nim za umnažanje pojedinog fragmenta je nizak (Tablica 7).

TABLICA 7. Karakteristike po etnica 16Sar i 16Sbr

Po etnica	G + C %	T _m	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

G + C % - postotak udjela gvanina i citozina u po etnici

T_m – temperatura mekšanja po etnice

Mr – molekulska masa po etnice

Pb – broj parova baza po etnice

3.2.3. Elektroforetsko odjeljivanje fragmenata DNA

Elektroforeza je standardna metoda za brzu i jednostavnu analizu DNA (identifikaciju, razdvajanje, odre ivanje koli ine i pro iš avanje DNA).

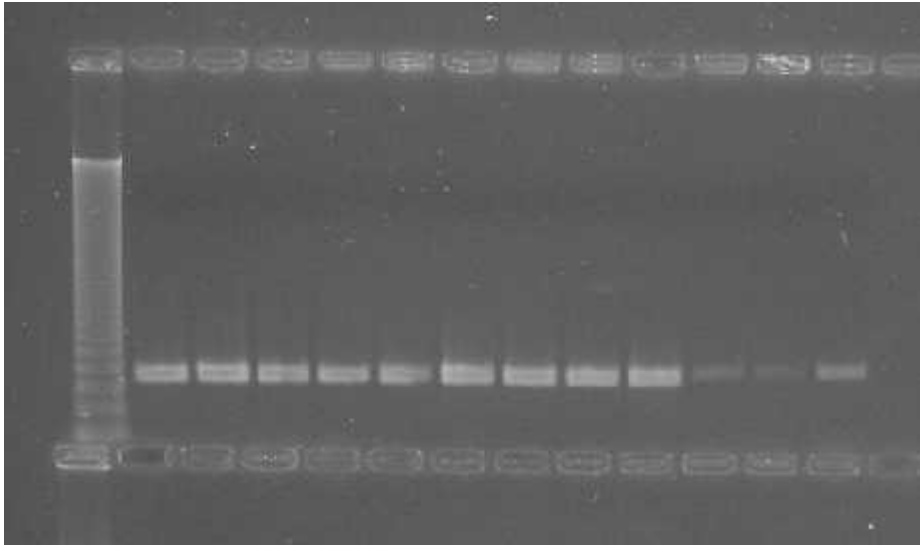
Fragmenti koji su dobiveni nakon lan ane reakcije polimeraze razdvajani su na 1% agaroznom gelu. Agarozni gelovi su pripremani u 1 X TAE puferu.

Elektroforeza je provo ena u istom puferu pri jakosti struje od 70 do 120 mA i u elektri nom polje jakosti 5 V/cm. Radi pra enja elektroforeze u uzorke smo dodali boju orange G (1/3 ukupnog volumena).

Za odre ivanje veli ine fragmenata na gelu korišteni je standard genomske DNA *Tenebrio molitor* razgra en pomo u restriksijske endonukleaze *EcoRI*

Da bi DNA u inili vidljivom pod UV svjetlom valne duljine 312 nm agarozne gelove smo nakon elektroforeze uronili u 0,5 mg/ml vodenu otopinu etidij-bromida 15-20 minuta nakon

ega su fotografirani na transiluminatoru pomoću digitalnog fotoaparata spojenog na osobno računalo (Slika 10).



SLIKA 10. Fotografija agaroznog gela nakon elektroforeze i bojanja u etidij bromidu

3.2.4. Određivanje primarne strukture DNA (sekvenciranje)

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

Nukleotidni sljedovi fragmenta molekula DNA učitani su s korisničke stranice Macrogen inc. u obliku **fasta**, **pdf** i **scf** datoteka. Za učitavanje **scf** datoteka upotrebljavan je računalo program **Chromas LITE 2.0** učitano sa internet stranice www.technelysium.com.au/chromas.html.

3.2.5. Molekularno-filogenetičke analize

a) Sravnjivanje sekvenci i pretraživanje baze podataka

Sekvence su sravnjene globalno i lokalno.

Kvaliteta globalnog sravnjivanja sekvenci izravno utječe na rezultate molekularno filogenetske analize jer se stope i uzorci promjena u sekvencama ne mogu analizirati osim ako se one mogu sravniti.

U slučaju da su sekvence evolucijski povezane, prilikom sravnjivanja njihovi ostaci slagati u iste kolone. Razlike koje su vidljive između dvije sekvence posljedica su insercija, delecija i/ili supstitucija u sekvenci tijekom evolucijske prošlosti.

Primarni sljedovi nukleotida dobiveni sekvenciranjem gena za COI iz vrsta *Austropotamobius torrentium*, *Astacus astacus* višestruko su sravnjeni i ure eni pomo u programa **ClustalX 1.83** (Thompson i sur., 1997) i **BioEdit 7.0.5.2** (Hall, 1999).

Metode lokalnog sravnjivanja temelje se na pronalaženju homolognih regija izme u sekvenci koje se uspore uju, s time da nije bitno na kojem se mjestu nalaze te homologne regije (na primjer, pozicija od prvog do 20. nukleotidnog ostatka u sekvenci 1 može se sravniti s pozicijama 70 do 90 sekvence 2). Ova je metoda puno fleksibilnija od metode globalnog sravnjivanja i omogu uje pronalaženje homolognih regija koje se nalaze na razli itim mjestima u razli itim sekvencama.

Konsenzus sekvenca gena COI i 16S uspore ene su sa sekvencama dostupnima preko baza podataka NCBI, EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*) i DDBJ (*DNA Data Bank of Japan*). Usporedbe su napravljene pomo u programa **BLAST** (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul i sur., 1990, 1997) koji služi za pronalaženje homologije me u sekvencama obra enim u eksperimentalnom dijelu i sekvencama koje se nalaze u bazama podataka. BLAST je postao *de facto* standard za pretraživanje i lokalno sravnjivanje (Altschul i sur., 1990), a njegov se algoritam, koji je postao vrlo popularan zbog pristupa nosti, brzine i to nosti, i dalje razvija.

Sekvence dobivene iz uzoraka vrste *Austropotamobius torrentium*, prikazane u tablici 3, unesene su u bazu podataka upotrebom programa **Sequin 6.0**.

b) Bayesian analiza

Ovo je relativno nova metoda u filogenetskoj analizi, koja postaje metodom izbora kod ve ine najnovijih filogenetskih istraživanja (Mallatt i sur., 2004, Utevsky i Trontelj, 2004, Waters i Roy, 2004, Wahlberg 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 (*posterior probabilities*).

Bayesian analiza provedena je pomo u 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 izme u potraga. Dvije najve e prednosti Bayesian analize, pred ostalim sli nim tipovima analiza, prije svega u odnosu na analizu metodom najve e vjerojatnosti, leže u sposobnosti algoritma da traži grupe najboljih stabala, a ne jedno najbolje stablo, kao i mogu nost izmjene informacija tijekom analize me u više neovisnih potraga za najboljom grupom stabala.

c) Izra unavanje geneti ke udaljenosti (p) i nukleotidne raznolikosti (f)

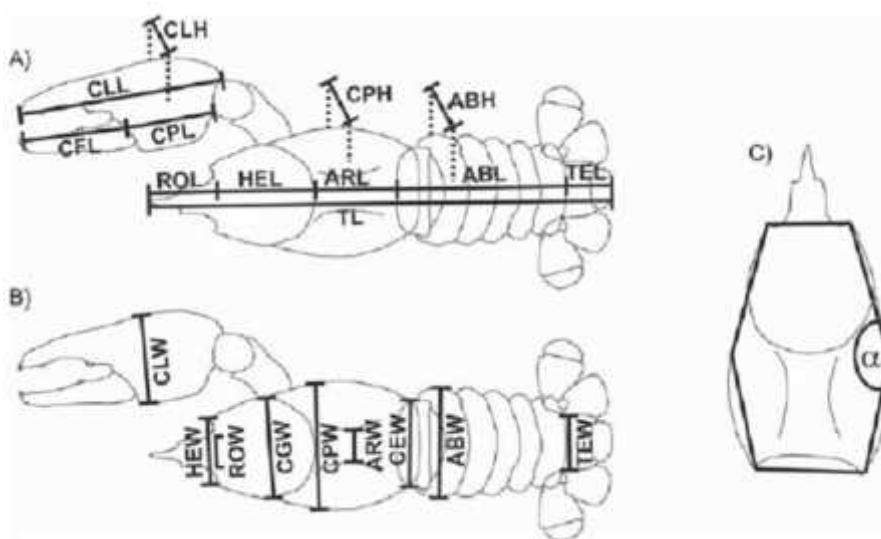
Geneti ka udaljenost (p) je broj koji govori koliko se dvije uspore ivane sekvence razlikuju (Nei i Kumar, 2000). Sekvence koje su evoluirale od nekog zajedni kog pretka tijekom vremena nakupljaju promjene kao rezultat djelovanja evolucijskih procesa. Najjednostavniji na in za mjerenje divergencije me u sekvencama je brojanje pozicija na kojima se razlikuju nukleotidi. Ukoliko znamo geneti ke udaljenosti me u svim parovima sekvenci unutar skupa od N sekvenci, te udaljenosti pružaju temelj za rekonstrukciju evolucijskog stabla koje povezuje te sekvence, odnosno iz geneti ke udaljenosti može se izra unati vrijeme koje je proteklo od odvajanja sekvenci pod pretpostavkom djelovanja molekuskog sata.

Nukleotidna raznolikost (π) je broj koji pokazuje raznolikost nukleotidnih sekvenci unutar skupine haplotipova.

Geneti ka udaljenost izra unata je programom **MEGA 3.1**. (Kumar i sur., 2004), a kako taj program nema HKY model s gama distribucijom, korišten je Tajima-Nei model s gama distribucijom kao najsl i niji modelu HKY (Nei i Kumar, 2000).

3.2.6. Morfometrijska i meristi ka mjerenja

Svakom ulovljenom raku su izmjerene, pomo u digitalnog pomi nog mjerila, **23 morfometrijske zna ajke** (od kojih neke i za desnu i za lijevu stranu životinje) (Slika 11 i Tablica 8) i zabilježeno je **5 meristi kih zna ajki** za lijevu i desnu stranu životinje (broj trnova na telzonu, broj trnova na egzopoditu antena, broj i položaj trnova na merusu tre eg maksilipeda, prisutnost i veli ina talona na drugom paru pleopoda u mužjaka, prisutnost i naglašenost rostralne kreste) (Slika 12 i Tablica 9).



SLIKA 11. Mjerenje morfometrijskih zna ajki (preuzeto iz Sint et al., 2005)

TABLICA 8. Objašnjenje kratica korištenih u morfometrijskim mjerenjima.

KRATICA	ZNAJKA
CLL	Duljina nepomi nog prsta
CFL	Duljina pomi nog prsta
CPL	Duljina dlana
CLH	Debljina kliješta
APP	Duljina apeksa
ROL	Duljina rostruma
HEL	Duljina glave
ARL	Duljina prsa
CEF	Duljina cefalotoraksa
CPH	Debljina prsa
ABL	Duljina repa
ABH	Debljina repa
TEL	Duljina telzona
TL	Totalna duljina
CLW	Širina kliješta
HEW	Širina glave iza oiju
ROW	Širina rostruma
CGW	Širina glave ispred cerviklane brazde
CPW	Širina prsa iza cervikalne brazde
ARW	Širina areole
CEW	Širina cefalotoraksa prije repa
ABW	Širina prvog zaanog kolutina
TEW	Širina telzona

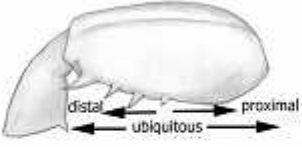
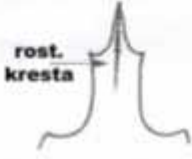



Obzirom da se morfološka obilježja karapaksa mogu pokazati korisnima pri razlikovanju populacija (Sinti i sur., 2005), u daljnje analize uključena je i bo na zakrivljenost karapaksa izražena kao kut (Slika 11). Bo na zakrivljenost izražena je u stupnjevima (degrees), a izražena je na najširem dijelu karapaksa korištenjem slijedeće formule:

$$\alpha = \arctg \left(\frac{HFI.}{\frac{CPW - HFW}{2}} \right) + \arctg \left(\frac{ARI.}{\frac{CPW - CEW}{2}} \right)$$

Morfometrijska mjerenja su izvršena digitalnim pomičnim mjerilom s točnošću od 0,01 mm. Za svako mjereno morfometrijsko obilježje populacije su opisane standardnim deskriptivnim statističkim metodama (broj jedinki, srednja vrijednost, minimum, maksimum, standardna devijacija), koje se upotrebljavaju kako bi se opisale značajke neke skupine rezultata. Nakon toga podaci za morfometrijska obilježja su normalizirani tako što im je vrijednost podijeljena s odgovarajućom postorbitalnom duljinom (POL=HEL+ARL) i u rezultatima koji se odnose na morfometrijske značajke uzimali smo u obzir samo normalizirane ulazne vrijednosti.

Morfometrijski i statistički podaci su zatim obrađeni Mann-Whitney U testom kako bi se utvrdile razlike između mužjaka i ženaka, kao i među populacijama grupiranim prema rezultatima genetičke analize. Stepwise metodom izdvojena su morfometrijska obilježja koja najviše doprinose diskriminaciji populacija te je provedena diskriminantna analiza.

Cjelokupna statistička obrada podataka izvedena je pomoću programa Microsoft Excel i Statistica, a u svim statističkim analizama korišten je nivo značajnosti od 5% ($p < 0,05$).

MERISTIČKE ZNAČAJKE	OPIS ZNAČAJKE
	Merus 3. maksilipeda s opisom pozicije trnova. Popis kratice korišten za opis i poziciju trnova na merusu 3. maksilipeda prikazan je u tablici 9.
	Položaj rostralne kreste na rostrumu.
	Položaj i izgled egzopodita antene i izgled trnova na njemu. Kratice ScafopL (lijevo) i ScafopD (desno)
	Oblik drugog para pleopoda u mužjaka i pozicija i oblik talona.
	Telson i pozicija trnova na njemu. Kratice TELTRNL (lijevo) i TELTRND (desno)

SLIKA 12. Bilježene merističke značajke.

TABLICA 9. Popis kratica i nazivi vezani uz merističku značajku merus 3. maksilipeda

kratica	značenje
MxLDis (MLVD)	Lijevi merus, pozicija trnova ventralna distalno
MxLProx (MLVP)	Lijevi merus, pozicija trnova ventralna proksimalno
MxLCentr (MLVC)	Lijevi merus, pozicija trnova ventralna centralno
MxLUbiq (MLVU)	Lijevi merus, pozicija trnova ventralna ubikvitalna (posvuda)
MxDDis (MDVD)	Desni merus, pozicija trnova ventralna distalno
MxDProx (MDVP)	Desni merus, pozicija trnova ventralna proksimalno
MxDCentr (MDVC)	Desni merus, pozicija trnova ventralna centralno
MxDUbiq (MDVU)	Desni merus, pozicija trnova ventralna ubikvitalna (posvuda)

3.3. PODRU JE ISTRAŽIVANJA

Park prirode Žumberak - Samoborsko gorje obuhvaća oko 350 km², a zakonom je proglašen parkom prirode 28. svibnja 1999. Prema zakonu o zaštiti prirode, park prirode je prostrano prirodno ili dijelom kultivirano područje s naglašenim estetskim, ekološkim, odgojno-obrazovnim, kulturno-povijesnim i turističko-rekreacijskim vrijednostima, a u njemu su dopuštene djelatnosti kojima se ne ugrožavaju njegove bitne značajke i uloge (Zakon o zaštiti prirode, 2005).

Park prirode smješten je 30-ak kilometara jugozapadno od Zagreba (Slika 13) te predstavlja izdvojeno brdsko ruralno područje koje u svom sastavu nema niti jednog gradskog naselja. Obuhvaća najveći dio prostora masiva Samoborskog i Žumberačkog gorja: Žumberačko gorje više je i zapadnije, s najvišim vrhom Sv. Gera (1178 m), a Samoborsko gorje niže je i pitomije s najvišim vrhom Japeti (871 m).



SLIKA 13. Geografski položaj Parka prirode Žumberak- Samoborsko gorje

Najveći dio teritorija je područje krškog reljefa s brojnim površinskim i podzemnim krškim i fluviokrškim reljefnim oblicima i krškom hidrologijom. Prema geološkoj starosti najstarije stijene na području Parka datiraju iz razdoblja paleozoika (perm - više od 250 milijuna godina), a ugrađeni i prevladavaju dolomiti trijaski starosti te jurske i kredne naslage vapnenca, što je uvjetovalo postanku krša koji prekriva čak 90% površine PP. Pojava,

prostorni raspored i značajke krškog reljefa u uskoj su vezi s uvjetima koji su utjecali na njihovo stvaranje: geološkom građom (dolomiti/vapnenac) i tektonskom strukturom terena, paleoklimatskim i recentnim klimatskim i hidrogeografskim uvjetima, biljnim pokrovom, a posredno i antropogenim utjecajima (Buzjak, 2002).

Glavni vodotoci Bregane, Lipovske i Rudarske Gradne, Kupine i Slapnice tvore morfološki i biološki zanimljive duboke usjekačke doline, a u nekim od njih nailazi se i na slapove i još uvijek aktivne sedrene barijere.

Osim rijeka, područje Parka prirode karakterizira velik broj izvora. Do sada su prikupljeni osnovni podaci za ukupno 337 izvora, a među njima se po svojoj izdašnosti ističe 5 izvora koji uvijek daju od 10 do 100 litara vode u sekundi (Slika 14).



SLIKA 14. Potok Zeleni Vir na kojem je ulovljeno 8 jedinki vrste *A.torrentium*

Raznolikost staništa uvjetovala je veliku biološku raznolikost ovoga kraja.

Vegetacijski pokrov čine većinom listopadne šume, i to bukove, miješane hrastovo-bukove i hrastovo-grabove šume u nižim predjelima. Šumski pokrov izmjenjuje se s vegetacijom travnjaka, polja, livada, pašnjaka, ali i kultiviranim površinama kao što su polja, voćnjaci i vinogradi.

Osim biljnim, ovo područje obiluje i životinjskim vrstama, što kralježnjacima, što beskralježnjacima, od kojih su mnoge i zaštićene Zakonom Republike Hrvatske (<http://www.pp-zumberak-samoborsko-gorje.hr>).

REZULTATI

4.1. MOLEKULARNO – FILOGENETI KE ANALIZE

4.1.1. SraVnjivanje i obrada sekvenci

Za sekvence korištene pri globalnom sraVnjivanju smatra se da imaju zajedni kog pretka. Homologni ostaci sekvenci se poredaju u iste kolone, te je ponekad pri takvom sraVnjivanju potrebno uvesti razmake (*gaps*) jer su sekvence razli itih duljina.

Primarni sljedovi nukleotida dobiveni sekvenciranjem gena za COI i 16S rRNA iz vrsta *Austropotamobius torrentium* i *Astacus astacus* višestruko su sraVnjeni i ure eni. Prilikom ure ivanja izostavljeni su po etci i krajevi sekvenci koji su bili puno duži od ostataka sekvenci ili su imali vrlo velika podru ja insercija i delecija nakon sraVnjivanja. Na ovaj na in su se analizirala jedino mjesta koja su filogenetski informativna.

Sekvence COI imale su duljinu 592 do 601 pb, a konsenzus sekvenca COI bila je duga ka 596 pb. Sekvence 16S imale su duljinu od 462 do 464 pb, a konsenzus sekvenci 16S bila je duga ka 463 pb.

Analiza sraVnjenih sekvenci pokazuje karakteristi an nukleotidni sastav za mitohondrijsku DNA beskralješnjaka (Wolstenholme, 1992). Nukleotidni sastav razli itih sekvenci vrlo malo varira oko srednje vrijednosti te pokazuje vrlo ujedna en raspored baza. Jedino uzorak *A. astacus* pokazuje ve u varijabilnost prema ostalim uzorcima te je zbog toga korišten kao vanjska grupa pomo u koje su ukorijenjena filogenetska stabla.

Lokalno sraVnjivanje provedeno je uspore ivanjem konsenzusa sekvenci gena COI i 16S sa sekvencama dostupnima preko baza podataka NCBI, EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*) i DDBJ (*DNA Data Bank of Japan*). Kao i kod višestrukog sraVnjivanja, i ovdje je ponekad potrebno uvesti razmake (*gaps*) kao kompenzaciju za mogu e insercije ili delecije u sekvenci koja je relativna nekoj drugoj.

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

SraVnjivanje je pokazalo da su sekvence odre enih jedinki identit ne pa su takve sekvence svedene pod zajedni ki haplotip.

Identi ne **16S rRNA** sekvence za jedinke *A. torrentium* iz PP Žumberak-Samoborsko gorje su :

Haplotype1: >6ZS_16Sar - >8ZS_16Sar - >10ZS_16Sar - >4ZS_16Sar
 Haplotype2: >1ZS_16Sar - >2ZS_16Sar
 Haplotype3: >21ZS_16Sar - >22ZS_16Sar - >25ZS_16Sar - >26ZS_16Sar - >27ZS_16Sar
 - >28ZS_16Sar - >29ZS_16Sar - >30ZS_16Sar - >31ZS_16Sar - >32ZS_16Sar -
 >50ZS_16Sar - >51ZS_16Sar - >52ZS_16Sar - >53ZS_16Sar - >54ZS_16Sar -
 >55ZS_16Sar - >56ZS_16Sar - >57ZS_16Sar - >59ZS_16Sar - >60ZS_16Sar -
 >61ZS_16Sar
 Haplotype4: >23ZS_16Sar - >58ZS_16Sar
 Haplotype5: >11ZS_16Sar - >12ZS_16Sar
 Haplotype6: >13ZS_16Sar - >14ZS_16Sar - >15ZS_16Sar - >16ZS_16Sar - >17ZS_16Sar
 - >18ZS_16Sar - >19ZS_16Sar - >20ZS_16Sar - >33ZS_16Sar - >34ZS_16Sar -
 >35ZS_16Sar - >36ZS_16Sar - >37ZS_16Sar - >39ZS_16Sar - >41ZS_16Sar
 Haplotype7: >42ZS_16Sar - >46ZS_16Sar
 Haplotype8: >43ZS_16Sar - >47ZS_16Sar - >48ZS_16Sar - >49ZS_16Sar
 Haplotype9: >44ZS_16Sar - >45ZS_16Sar

Identi ne **COI** sekvence za jedinke *A. torrentium* iz PP Žumberak-Samoborsko gorje su :

Haplotype1: >50ZS_LCO - >52ZS_LCO - >53ZS - >61ZS_LCO
 Haplotype2: >21ZS_LCO - >28ZS_LCO - >29ZS_LCO - >30ZS_LCO
 Haplotype3: >22ZS_LCO - >25ZS_LCO - >26ZS_LCO
 Haplotype4: >57ZS_LCO - >58ZS_LCO
 Haplotype5: >56ZS_LCO - >60ZS_LCO
 Haplotype6: >44ZS_LCO - >46ZS_LCO
 Haplotype7: >15ZS_LCO - >19ZS_LCO - >35ZS_LCO - >36ZS_LCO - >39ZS_LCO -
 >40ZS_LCO - >41ZS_LCO
 Haplotype8: >14ZS_LCO - >16ZS_LCO - >17ZS_LCO - >18ZS_LCO

Haplotipovi su imenovani ovisno o lokaciji gdje su jedinke ulovljene, uzimaju i u obzir da ponekad jedinke s različitih lokacija pripadaju istom haplotipu. Obzirom da su se 16S sekvence grupirale različitno od COI sekvenci, ime 16S haplotipa ponekad ne odgovara imenu COI haplotipa. Popis svih sekvenci s pridruženim haplotip imenom nalazi se u tablici 3.

Analiziraju i sve korištene sekvence (Tablica 3 do 5), dvije **16s rRNA** sekvence izolirane u ovom istraživanju pokazale su se identične s sekvencama izoliranim u ranijim istraživanjima, a imaju i dva haplotipa:

Haplotype1: >CrniLug - >Blatizvm1
 Haplotype2: >Dolje - >Jarcur1

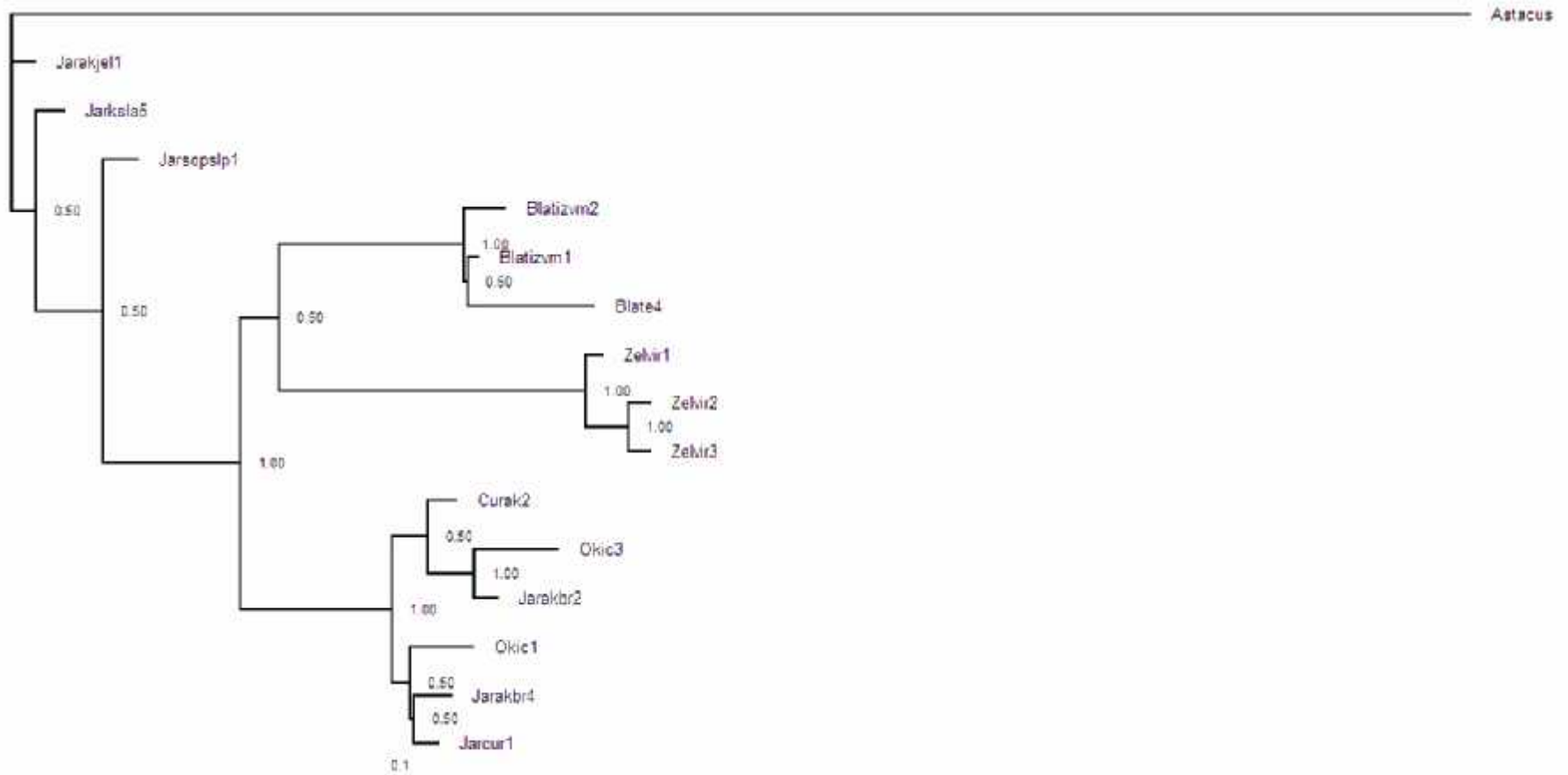
Takvi rezultati odmah ukazuju na prisutnost barem dvije genetski distinktivne populacije rakova na području PP Žumberak-Samoborsko gorje: jedne vezane uz područje srednje i jugoistočne Europe, odnosno Dunavski sliv (Dolje - Jarcur1) i druge koji pripadaju populaciji rakova iz Gorskog Kotara (CrniLug - Blatizvm1).

Za sekvence **COI** se nije pokazalo nikakvo preklapanje postojećih haplotipova.

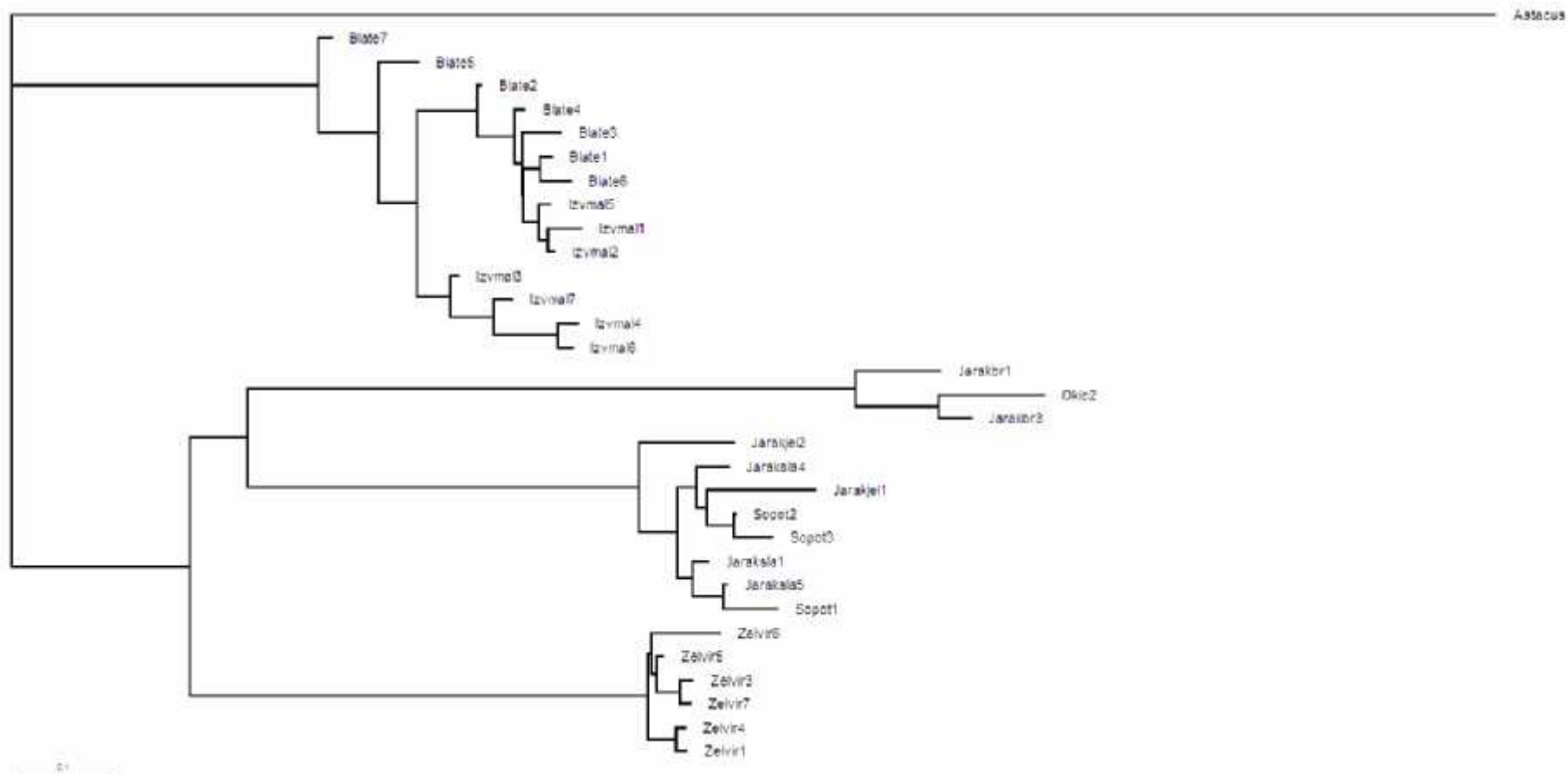
4.1.2. Bayesian analiza

Rezultat analize su ukorijenjeni filogrami odnosa sekvenci za gen 16S rRNA i gen COI s vrijednostima naknadnih vjerojatnosti u vorištima grananja (Slika 15 - 18).

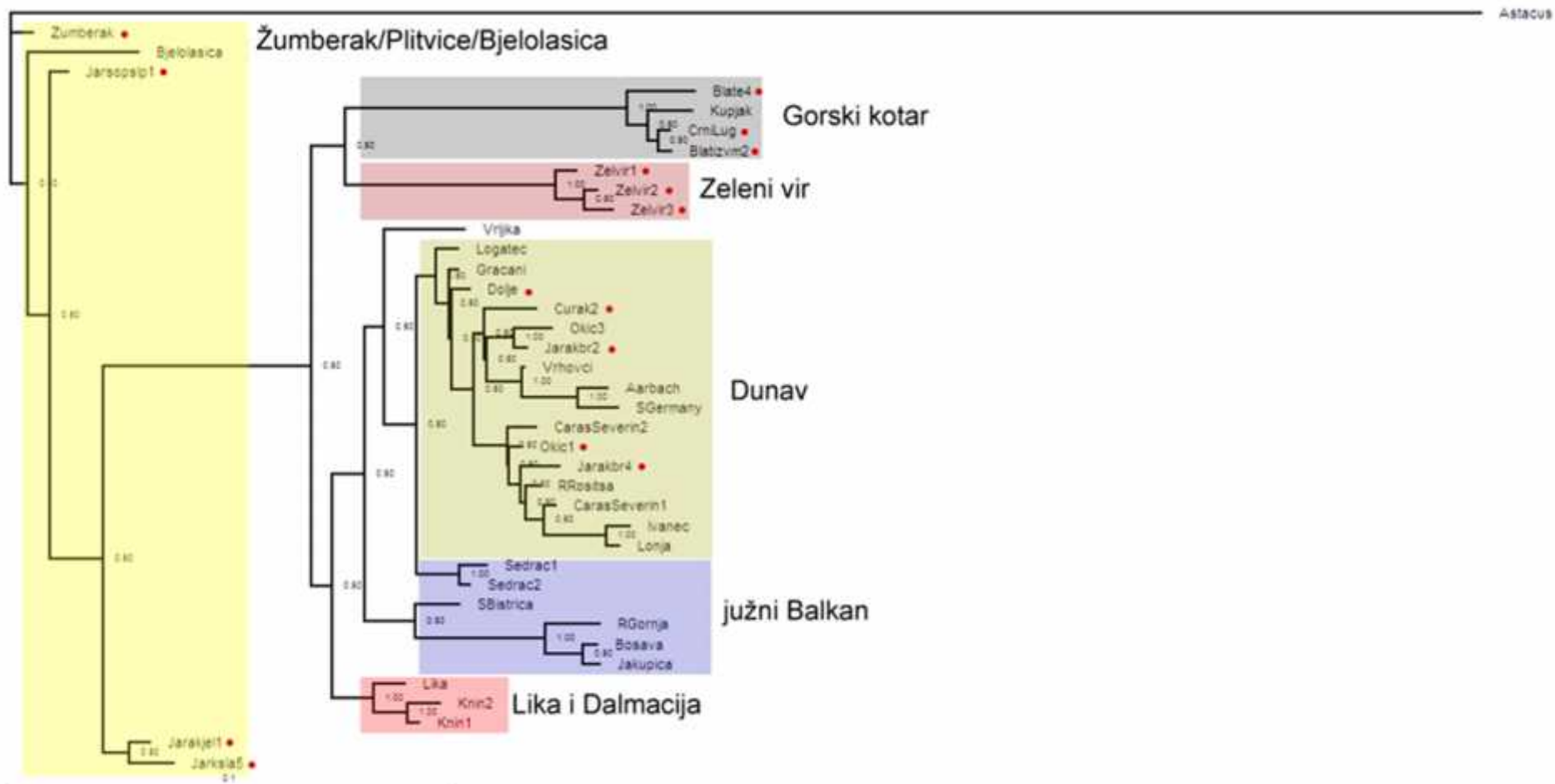
Iz filograma je vidljivo da se sekvence prikupljene s različitih lokacija unutar PP Žumberak – Samoborsko gorje uglavnom grupiraju ovisno o lokaciji, primjerice sekvence iz Zelenog vira jasno su odijeljene od ostalih (Slika 15 i 16). Kako bi imali bolji uvid u njihov geografski i genetički kontekst, ove sekvence korelirane su s onima preuzetima iz ranijih istraživanja i iz internetske baze sekvenci, obzirom da su haplogrupe za te sekvence već utvrđene. Dobiveni filogrami nalaze se na slici 17 i 18.



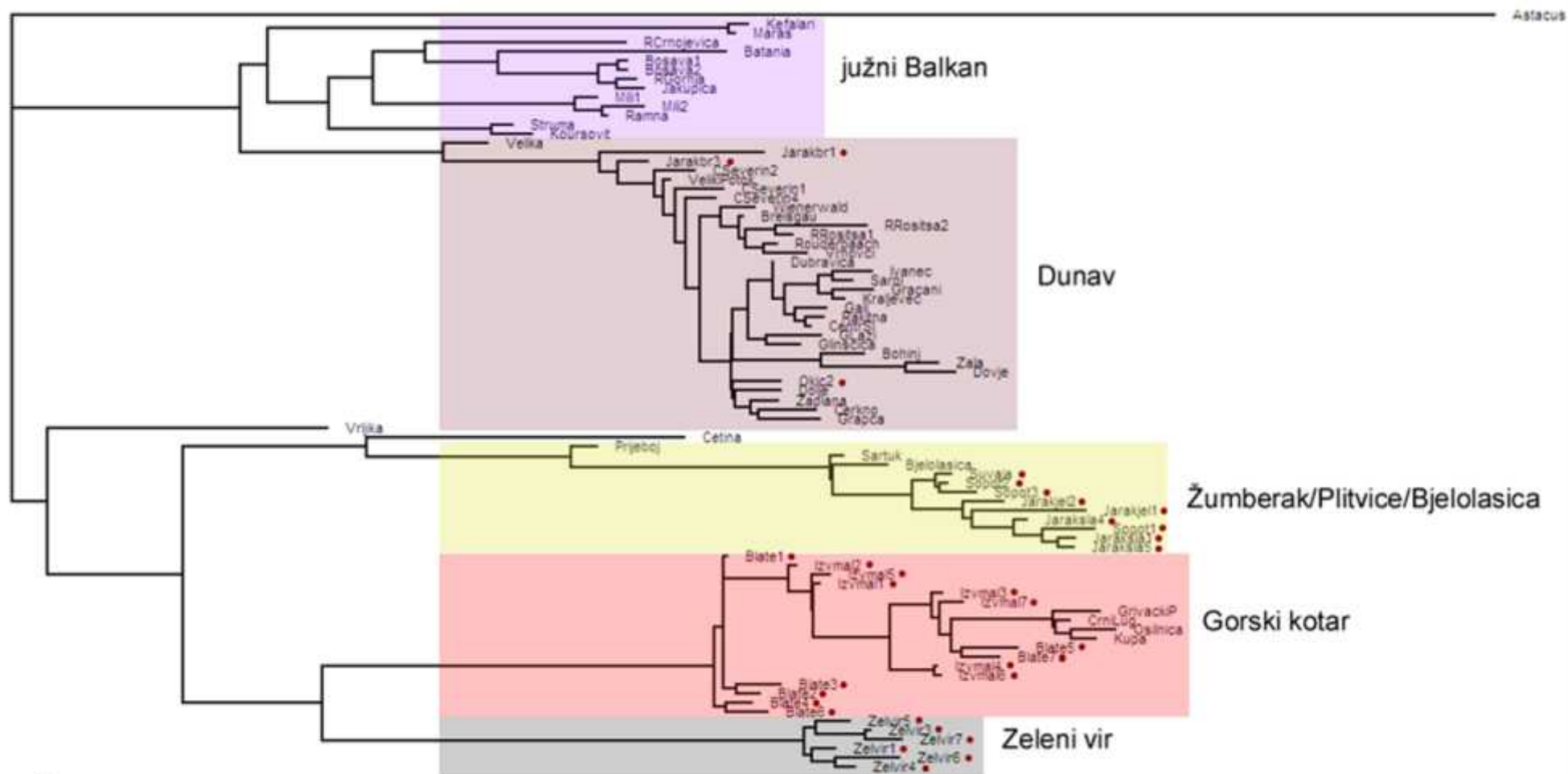
SLIKA 15. Ukorijenjeni konsenzus filogram odnosa sekvenci-haplotipova gena za 16S rRNA vrste *Austropotamobius torrentium* na području PP Žumberak Samoborsko Gorje dobiven *Bayesian analizom* prema HKY85 modelu s gama distribucijom (Hasegawa i sur. 1985) upotrebom metode Metropolis-coupled Markov Chain Monte Carlo. Kratice su objašnjene u Tablici 3.



SLIKA 16. Ukorijenjeni konsenzus filogram odnosa sekvenci-haplotipova gena za COI vrste *Austroptamobius torrentium* na području PP Žumberak Samoborsko Gorje dobiven *Bayesian analizom* prema HKY85 modelu s gama distribucijom (Hasegawa i sur. 1985) upotrebom metode Metropolis-coupled Markov Chain Monte Carlo. Kratice su objašnjene u Tablici 3.



SLIKA 17. Ukorijenjeni konsenzus filogram odnosa sekvenci-haplotipova gena za 16S rRNA vrste *Austropotamobius torrentium* na području Europe dobiven *Bayesian analizom* prema HKY85 modelu s gama distribucijom (Hasegawa i sur. 1985) upotrebom metode Metropolis-coupled Markov Chain Monte Carlo. Sekvence dobivene iz jedinki iz PP Žumberak-Samoborsko gorje označene su crvenom točkom. Kratice su objašnjene u tablicama 3 i 4.



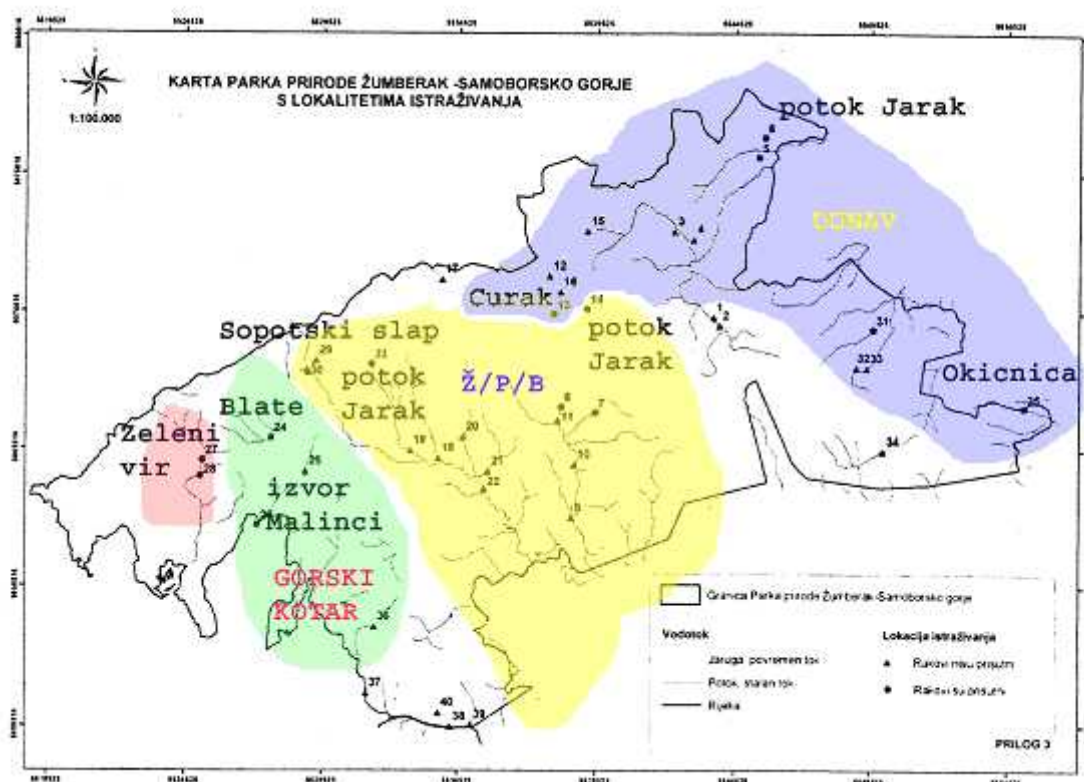
SLIKA 18. Ukorijenjeni konsenzus filogram odnosa sekvenci-haplotipova gena za COI vrste *Austropotamobius torrentium* na području Europe dobiven *Bayesian analizom* prema HKY85 modelu s gama distribucijom (Hasegawa i sur. 1985) upotrebom metode Metropolis-coupled Markov Chain Monte Carlo. Sekvence dobivene iz jedinki iz PP Žumberak-Samoborsko gorje označene su crvenom točkom. Kratice su objašnjene u tablicama 3 i 5.

Konstruirani filogrami pokazuju da sekvence-haplotipove možemo grupirati u pet (COI), odnosno šest (16S) odvojenih haplotip tj. geografskih skupina:

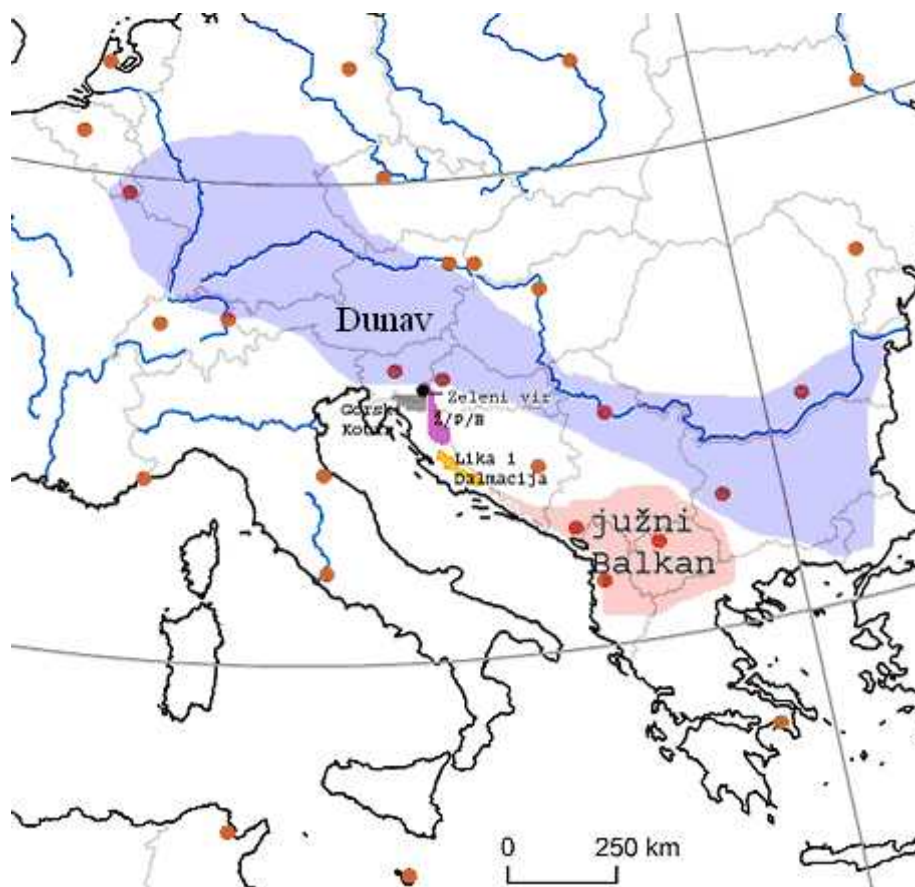
- središnja i jugoisto na Europa (Dunav)
- južni Balkan
- Gorski kotar
- Žumberak/Plitvice/Bjelolasica (Ž/P/B)
- Zeleni vir
- Lika i Dalmacija (samo 16S rRNA)

Svaki haplotip karakterizira jedinstven slijed nukleotida. Izme u sekvenci unutar istog haplotipa ne postoji nikakva geneti ka udaljenost (*engl. pairwise distance*).

Jedinke ulovljene na podru ju PP Žumberak-Samoborsko gorje su se na osnovu molekularnih analiza mitohondrijskih gena 16S i COI svrstale u etiri od šest geografskih skupina: Dunav, Gorski kotar, Zeleni vir i Žumberak/Plitvice/Bjelolasica (Slika 19 i 20) što je predstavlja ogromnu geneti ku raznolikost i bogatstvo na tako maloj geografskoj površini u odnosu na cjelokupni areal vrste.



SLIKA 19. Haplotip (geografske) skupine potonih rakova (*A. torrentium*) u PP Žumberak-Samoborsko gorje



SLIKA 20. Haplotip (geografske) skupine poto nih rakova (*A. torrentium*) PP Žumberak-Samoborsko gorje u odnosu na ostatak europskih populacija.

4.1.3. Geneti ka udaljenost (p) i nukleotidna raznolikost ()

Geneti ka udaljenost (p) je broj koji govori koliko se dvije uspore ivane sekvence razlikuju (Nei i Kumar, 2000). Zbog ovisnosti varijabilnosti sekvenci o mjestu u kodonu koristi se kodon specifi no izra unavanje geneti ke udaljenosti izme u razli itih sekvenci (Trontelj i sur 2005).

Dobiveni rezultati su pokazali vrlo visoke geneti ke udaljenosti izme u haplotip odnosno geografskih grupa (Tablica 10). Najve e udaljenosti su ustanovljene izme u pojedinih grupa prisutnih u PP Žumberak-Samoborsko gorje (Gorski kotar, Zeleni vir i Žumberak/Plitvice/Bjelolasica) te izme u njih i haplogrupa središnja i jugoisto na Europa (Dunav) i južni Balkan. Najve e geneti ke udaljenosti za gen **16S rRNA** ustanovljene su izme u haplogrupe Zeleni vir i Gorski kotar (0,044-0,054), Gorski kotar i Žumberak/Plitvice/Bjelolasica (0,037-0,048) i Zeleni vir i južni Balkan (0,033-0,044). Za mitohondrijski gen **COI** ustanovljene su najve e udaljenosti izme u haplogrupe Gorski kotar i Dunav odnosno južni Balkan (0,077-0,100 i 0,078-0,098) te Zeleni vir i Dunav (0,078-0,095).

TABLICA 10. Geneti ka udaljenost (p) za 16S i COI sekvence izme u haplotip grupa: ŽPB- Žumberak/Plitvice/Bjelolasica, LD – Lika i Dalmacija, JB – južni Balkan, Dunav – središnja i jugoisto na Europa, GK – Gorski Kotar, ZV – Zeleni vir

	16S	COI
ŽPB – LD	0,013 - 0,028	/
ŽPB- JB	0,020 – 0,037	0,069 – 0,097
ŽPB – Dunav	0,018 – 0,031	0,067 – 0,090
ŽPB – GK	0,037 – 0,048	0,066 – 0,078
ŽPB – ZV	0,028 – 0,041	0,072 – 0,086
LD – JB	0,015 – 0,031	/
LD – Dunav	0,013 – 0,031	/
LD – GK	0,028 – 0,037	/
LD – ZV	0,028 – 0,039	/
JB – Dunav	0,007 – 0,029	0,033 – 0,062
JB – GK	0,031 – 0,044	0,078 – 0,098
JB – ZV	0,033 – 0,044	0,078 – 0,090
Dunav – GK	0,031 – 0,041	0,077 – 0,100
Dunav – ZV	0,031 – 0,048	0,078 – 0,095
GK – ZV	0,044 – 0,054	0,064 – 0,071

/ - haplogrupa LD nije zastupljena COI sekvencama

Nukleotidna raznolikost (π) je broj koji nam pokazuje raznolikost nukleotidnih sekvenci unutar skupine haplotipova. Zbog malih areala haplogrupa, gdje je bilo mogu e izra unali smo i π/d , odnosno nukleotidnu raznolikost na rasponu od 100km, a rezultati su prikazani u tablici 11. Nukleotidna raznolikost pokazala se najve om za južni Balkan (0,013 za 16S i 0,032 za COI), a najmanja za Gorski Kotar (0,003 za 16S) odnosno Zeleni vir (0,003 za COI). Rezultati se mijenjaju kada nukleotidnu raznolikost koreliramo s promjerom areala, što je bilo mogu e za sve populacije osim za Zeleni vir zbog toga što su jedinke ove haplogrupe prona ene u samo jednom potoku. Svedeno na zajedni ki nazivnik od 100km, najve u nukleotidnu raznolikost za 16S sekvencu pokazuje haplogrupa ŽPB (0,0960) i GK (0,0865), a za COI haplogrupa GK (0,01914) dok je najmanja nuklearna raznolikost zabilježena za Dunav i to i za 16S (0,00049) i za COI sekvencu (0,00055).

TABLICA 11. . Nukleotidna raznolikost (π) i nukleotidna raznolikost na 100km (π/d) za 16S i COI sekvence za pojedine haplotip grupe: ŽPB- Žumberak/Plitvice/Bjelolasica, LD – Lika i Dalmacija, JB – južni Balkan, Dunav – središnja i jugoisto na Europa, GK – Gorski Kotar, ZV – Zeleni vir

	16S		COI	
	π	π/d	π	π/d
ŽPB	0,005	0,00960	0,014	0,00747
LD	0,004	0,00281	/	/
JB	0,013	0,00252	0,032	0,00738
Dunav	0,007	0,00049	0,010	0,00055
GK	0,003	0,00865	0,005	0,01914
ZV	0,007	*	0,003	*

/ - haplogrupa LD nije zastupljena COI sekvencama

* nije izraženo zbog malog areala jedinki haplogrupe Zeleni vir (prona ene u samo jednom potoku duljine oko 100m)

4.1.4. Vrijeme razdvajanja

Vrijeme razdvajanja prema mitohondrijskom genu za COI izra unato je prema molekularnom satu temeljenom na prosje noj stopi nukleotidnih supstitucija po milijun godina kod dekapodih rakova, koji iznosi 0,020 (Wares i Cunningham, 2001).

Dobiveni podaci prikazani su u tablici 12.

TABLICA 12. Vrijeme odvajanja izme u haplotip skupina. Ra unati su haplotipovi izme u kojih je geneti ka udaljenost najve a. Vrijednosti su izražene u milijunima godina; crvenom bojom ozna ena su najstarija razdvajanja pojedinih haplotipova, a plavom bojom najmla a. (j.Balkan – južni Balkan; Dunav – središnja i jugoisto na Europa; GK – Gorski Kotar; Ž/P/B – Žumberak/Plitvice/Bjelolasica, Z.VIR – Zeleni vir)

	j.Balkan	Dunav	GK	Ž/P/B
Dunav	1.65 - 3.1			
GK	3,9 - 4,9	3,85 - 5		
Ž/P/B	3,45 - 4,85	3,35 - 4,5	3,3 - 3,9	
Z.VIR	3,9 - 4,5	3,8 - 4,75	3,2 - 3,55	3,6 - 4,3

Najranije razdvajanje nastupilo je izme u skupine haplogrupa Gorski kotar - Zeleni vir-Žumberak/Plitvice/Bjelolasica (Ž/P/B) i skupine haplogrupa Dunav - južni Balkan, prije izme u 3,5 i 5 milijuna godina. Primjetno je da je do odvajanja unutar ovih grupa (Gorski kotar - Zeleni vir-Žumberak/Plitvice/Bjelolasica i Dunav - južni Balkan) došlo nešto kasnije, a najkasnije izme u grupa južni Balkan i Dunav koje se je odigralo tek prije 1,65 do 3,1 mil godina.

Mogu i scenarij razdvajanja prvobitnih grupa poto nog raka:

1. Gorski kotar-Zeleni vir-Ž/P/B odvajanje od grupe južni Balkan – Dunav prije 3,4 - 5 mil g
2. Gorski kotar-Zeleni vir odvajanje od grupe Ž/P/B prije 3,3 - 4,3 mil g.
3. Gorski kotar se odvojio od grupe Zeleni vir prije 3,2 - 3,55 mil g.
- 4.južni Balkan se odvojio od grupe Dunav prije 1,65 - 3,1 mil.g.

4.2. MORFOMETRIJSKE I MERISTI KE ZNA AJKE

Ukupno je izmjerena šezdeset i jedna životinja; 37 mužjaka i 24 ženke. Kako bismo utvrdili razlikuju se me usobno mužjaci i ženke proveden je Mann-Whitney U test uz nivo značajnosti $p < 0,05$ (Tablica 13).

TABLICA 13. Rezultati Mann-Whitney U testa za razlike između mužjaka i ženki. Statistički značajne vrijednosti p su označene crvenom bojom. (Objašnjenja kratica za izmjerena morfološka obilježja nalaze se u tablici 8.)

Morf. značajka	Broj jedinki (mužjaci)	Broj jedinki (ženke)	U	Z	p-vrijednost
dcll	36	24	142,0000	4,37589	0,000012
dcfl	36	24	210,0000	3,34982	0,000809
dcpl	36	23	384,0000	0,46625	0,641035
dclw	36	24	152,0000	4,22500	0,000024
dclh	36	24	128,0000	4,58714	0,000004
lcfl	37	24	151,0000	4,32570	0,000015
lcfl	37	24	221,0000	3,29225	0,000994
lcpl	37	24	139,0000	4,50286	0,000007
lcw	37	24	193,0000	3,70563	0,000211
lch	37	24	156,0000	4,25188	0,000021
dcef	37	24	406,0000	-0,56101	0,574790
cef	37	24	396,0000	-0,70865	0,478545
rol	37	24	326,0000	-1,74209	0,081494
apex	37	24	416,0000	-0,41338	0,679331
row	37	24	404,0000	-0,59054	0,554830
hew	37	24	341,0000	1,52064	0,128352
cgw	37	24	430,0000	0,20669	0,836253
cpw	37	24	387,0000	0,84152	0,400059
hel	37	24	314,0000	-1,91925	0,054954
arl	37	24	314,0000	1,91925	0,054954
arw	37	24	388,0000	-0,82675	0,408377
cph	37	24	350,0000	-1,38777	0,165209
cew	37	24	360,0000	-1,24013	0,214928
abw	37	24	48,0000	-5,84633	0,000000
abl	37	24	191,0000	-3,73516	0,000188
abh	37	24	131,0000	-4,62096	0,000004
tel	37	24	197,0000	-3,64658	0,000266
tew	37	24	261,0000	-2,70171	0,006899
tl	37	24	183,0000	-3,85326	0,000117
alfa	37	24	339,0000	-1,55016	0,121103

Ovdje treba napomenuti kako je upotrebom Spearmanovog koeficijenta korelacije utvrđeno da je većina morfoloških značajki statistički značajno korelirana i za mužjake i za ženke (Prilog I i II), što je uobičajeno za rakove iz porodice Astacidae (Streissl and Hödl, 2002). Ipak, kako bismo dobili što bolji uvid u morfološku varijabilnost populacija potonog raka, obrađeni su podaci za lijevu i desnu stranu životinja.

Kako je vidljivo iz Tablice 13, mužjaci i ženke svih populacija najviše se međusobno razlikuju po izmjerenim vrijednostima za kliješta (CLL, CFL, CLW, CLH) za lijevu i desnu

stranu tijela, abdomen (ABW, ABL, ABH), telzon (TEL, TEW) te ukupnu duljinu tijela (TL). Razlike u veli ini i obliku kliješta i abdomena posljedica su spolnog dimorfizma koji je prisutan u rakova porodice Astacidae (Streissl and Hödl, 2002) i zbog kojeg smo podatke za mužjake i ženke analizirali odvojeno.

Nakon podjele jedinki u odgovaraju e grupe (Dunav: osam mužjaka i dvije ženke, Žumberak/Plitvice/Bjelolasica: devet mužjaka i deset ženki, Gorski Kotar: 13 mužjaka i 11 ženki, Zeleni vir: sedam mužjaka i jedna ženka), proveden je Mann-Whitney U test za one grupe gdje je bilo dovoljno jedinki (ŽPB i GK) te su utvr ene razlike me u spolovima i unutar grupa. Mužjaci i ženke u više se karakteristika razlikuju unutar grupe Gorski Kotar: skoro sve vrijednosti izmjerene za kliješta: DCLL, LCLL, DCFL, LCFL, DCLW, LCLW, DCLH, LCLH, LCPL i sve vrijednosti za abdomen: ABW, ABL, ABH, duljina rostruma (ROL), širina areole (ARH), duljina telzona (TEL) i ukupna duljina jedinki (TL). Jedinke grupe Žumberak/Plitvice/Bjelolasica me usobno se razlikuju po nekim karakteristikama kliješta (DCLW, LCLW, DCLH, LCLH, LCPL) i abdomena (ABW, ABL, ABH) te obliku karapaksa (kut). Za grupe Dunav i Zeleni vir nije bilo mogu e provesti statisti ku analizu zbog ograni enog broja jedinki (dvije odnosno jedna ženka) (rezultati nisu prikazani).

Statisti ki deskriptivno opisane izmjerene zna ajke mužjaka i ženki prikazane za svaku populaciju zasebno prikazane su u tablicama 14 do 17.

TABLICA 14. Deskriptivnom statistikom opisane morfometrijske i meristi ke zna ajke mužjaka (a) i ženki (b) populacija grupe središnja i jugoisto na Europa (Dunav). (Objašnjenja kratica za izmjerena morfometrijska obilježja nalaze se u Tablici 8.)

a)	Morf. značajka	Broj jed	Srednja Vrijed.	Min	Maks	Std. Dev.
	dcil	8	1,026800	0,877853	1,141045	0,078031
	dcfl	8	0,593975	0,445268	0,661734	0,071345
	dcpl	7	0,451749	0,233162	0,874152	0,219443
	dclw	8	0,439247	0,320983	0,497268	0,062177
	dclh	8	0,258746	0,123274	0,302385	0,062375
	lcll	8	1,000962	0,883405	1,122924	0,074535
	lcfl	8	0,583619	0,479960	0,671096	0,062840
	lcpl	8	0,373581	0,310542	0,448868	0,049733
	lclw	8	0,413677	0,345981	0,489461	0,051671
	lclh	8	0,247212	0,159650	0,297424	0,043097
	dcef	8	1,160696	1,062984	1,223263	0,052282
	lcef	8	1,153456	1,063321	1,209727	0,046655
	rol	8	0,292313	0,171549	0,341141	0,054910
	apex	8	0,104171	0,075808	0,133305	0,016113
	row	8	0,171368	0,132286	0,199844	0,021294
	hew	8	0,404331	0,349139	0,458974	0,037680
	cgw	8	0,607958	0,569231	0,644662	0,031126
	cpw	8	0,685021	0,642813	0,740630	0,035156
	hel	8	0,558205	0,535256	0,573680	0,011279
	arl	8	0,441795	0,426320	0,464744	0,011279
	arw	8	0,238859	0,164301	0,362179	0,057861
	cph	8	0,562252	0,528535	0,613973	0,027088
	cew	8	0,502032	0,438840	0,546058	0,031896
	abw	8	0,582129	0,501661	0,625213	0,039389
	abl	8	1,037406	0,854123	1,375488	0,181943
	abh	8	0,321952	0,277166	0,379391	0,034198
	tel	8	0,372072	0,315917	0,416525	0,028259
	tew	8	0,312552	0,264573	0,341141	0,027943
	tl	8	2,582675	2,340079	2,731687	0,134723
	alfa	8	1,479720	1,380051	1,551828	0,063108

b)	Morf. značajka	Broj jedinki	Srednja Vrijed.	Min	Maks	Std. Dev.
	dcil	2	0,843913	0,838871	0,848955	0,007130
	dcfl	2	0,512850	0,510452	0,515248	0,003391
	dcpl	2	0,422829	0,385030	0,460628	0,053456
	dclw	2	0,386753	0,385705	0,387802	0,001483
	dclh	2	0,248350	0,245448	0,251252	0,004104
	lcll	2	0,839538	0,822030	0,857047	0,024760
	lcfl	2	0,500417	0,496966	0,503869	0,004881
	lcpl	2	0,316178	0,315430	0,316925	0,001057
	lclw	2	0,364248	0,346837	0,381659	0,024623
	lclh	2	0,228559	0,213018	0,244100	0,021978
	dcef	2	1,162215	1,134274	1,190155	0,039514
	lcef	2	1,178811	1,146563	1,211059	0,045605
	rol	2	0,315891	0,308159	0,323623	0,010935
	apex	2	0,105640	0,102495	0,108785	0,004448
	row	2	0,183000	0,169777	0,196224	0,018701
	hew	2	0,380591	0,354574	0,406608	0,036793
	cgw	2	0,599339	0,580337	0,618341	0,026873
	cpw	2	0,679448	0,667729	0,691167	0,016573
	hel	2	0,556832	0,555630	0,558034	0,001699
	arl	2	0,443168	0,441966	0,444370	0,001699
	arw	2	0,215781	0,213082	0,218480	0,003817
	cph	2	0,549271	0,545516	0,553027	0,005311
	cew	2	0,496548	0,496131	0,496966	0,000590
	abw	2	0,636241	0,623122	0,649359	0,018552
	abl	2	1,033682	0,994538	1,072825	0,055358
	abh	2	0,321142	0,305462	0,336823	0,022176
	tel	2	0,387377	0,379609	0,395145	0,010966
	tew	2	0,327843	0,325691	0,329995	0,003044
	tl	2	2,678065	2,589440	2,766689	0,125334
	alfa	2	1,485918	1,464415	1,507422	0,030411

TABLICA 15. Deskriptivnom statistikom opisane morfometrijske i meristi ke zna ajke mužjaka (a) i ženki (b) populacija grupe Žumberak/Plitvice/Bjelolasica (ŽPB). (Objašnjenja kratica za izmjerena morfometrijska obilježja nalaze se u Tablici 8.)

a)	Morf. značajka	Broj jed	Srednja Vrijed.	Min	Maks	Std. Dev.
	dcil	9	1,188265	0,894112	1,451468	0,228956
	dcfl	9	0,731455	0,514833	0,914573	0,151959
	dcpl	9	0,389243	0,181031	0,508900	0,097803
	dcw	9	0,513621	0,428300	0,576157	0,050297
	dclh	9	0,303473	0,258653	0,343242	0,028147
	lcil	9	1,107219	0,801603	1,384333	0,219685
	lcfl	9	0,704490	0,557736	0,888125	0,137488
	lcpl	9	0,403366	0,315833	0,493333	0,062070
	lclw	9	0,480008	0,290964	0,545667	0,079313
	lclh	9	0,280746	0,155568	0,321000	0,051220
	dcef	9	1,200250	1,156120	1,251667	0,036004
	lcef	9	1,194155	1,140389	1,260333	0,039907
	rol	9	0,290128	0,256546	0,322684	0,023800
	apex	9	0,068529	0,051823	0,080329	0,011386
	row	9	0,166394	0,145344	0,180739	0,012880
	hew	9	0,368061	0,323828	0,389217	0,017086
	cgw	9	0,600993	0,552509	0,626724	0,025912
	cpw	9	0,690008	0,643971	0,735333	0,028625
	hel	9	0,567489	0,534042	0,589389	0,015550
	arl	9	0,432511	0,410611	0,465958	0,015550
	arw	9	0,206703	0,182342	0,238667	0,022221
	cph	9	0,576669	0,535945	0,618895	0,030185
	cew	9	0,435166	0,390458	0,502952	0,037196
	abw	9	0,528917	0,063614	0,621752	0,177189
	abl	9	0,914746	0,823432	1,040929	0,063550
	abh	9	0,322790	0,300795	0,348682	0,018908
	tel	9	0,375379	0,353413	0,400520	0,019473
	tew	9	0,302776	0,270034	0,350256	0,025583
	tl	9	2,605086	2,454894	2,764660	0,114708
	alfa	9	1,430245	1,364295	1,495284	0,041382

b)	Morf. značajka	Broj jedinki	Srednja Vrijed.	Min	Maks	Std. Dev.
	dcl	10	1,006579	0,794423	1,584656	0,215619
	dcf	10	0,639453	0,503007	0,993651	0,131629
	dcpl	10	0,404226	0,143858	0,597320	0,141468
	dcw	10	0,440921	0,320467	0,724339	0,107759
	dch	10	0,246737	0,155895	0,393651	0,059824
	lcil	10	0,993516	0,825041	1,562963	0,209322
	lcfl	10	0,644417	0,504101	1,030688	0,145864
	lcpl	10	0,343793	0,281291	0,549735	0,076068
	lclw	10	0,440832	0,347167	0,719048	0,101813
	lclh	10	0,249010	0,184453	0,415344	0,061253
	dcef	10	1,260634	1,128854	2,033862	0,272998
	lcef	10	1,259912	1,137233	2,025397	0,269835
	rol	10	0,318964	0,264127	0,470899	0,058573
	apex	10	0,076663	0,045894	0,106878	0,015991
	row	10	0,175784	0,154399	0,266138	0,033109
	hew	10	0,367741	0,310082	0,563492	0,071581
	cgw	10	0,629385	0,565883	1,011111	0,135176
	cpw	10	0,714823	0,620011	1,170899	0,161090
	hel	10	0,606894	0,546636	0,937037	0,116649
	arl	10	0,393106	0,062963	0,453364	0,116649
	arw	10	0,211000	0,166068	0,350265	0,052775
	cph	10	0,637007	0,556983	1,073016	0,154320
	cew	10	0,496230	0,438963	0,785185	0,102871
	abw	10	0,726394	0,586113	1,212698	0,175743
	abl	10	1,054750	0,944644	1,886243	0,224064
	abh	10	0,376062	0,329542	0,613757	0,084855
	tel	10	0,409712	0,358209	0,615344	0,074827
	tew	10	0,337274	0,294796	0,525926	0,067950
	tl	10	2,851356	2,607436	4,575661	0,606816
	alfa	10	1,418882	0,755628	1,576028	0,235394

TABLICA 16. Deskriptivnom statistikom opisane morfometrijske i meristi ke zna ajke mužjaka (a) i ženki (b) populacija grupe Zeleni vir. (Objašnjenja kratica za izmjerena morfometrijska obilježja nalaze se u Tablici 8.)

a)	Morf. značajka	Broj jed	Srednja Vrijed.	Min	Maks	Std. Dev.
	dcll	7	1,215629	1,019396	1,298655	0,109670
	dcfl	7	0,743633	0,595300	0,818994	0,080304
	dcpl	7	0,453129	0,260914	0,641596	0,148845
	dclw	7	0,503174	0,388661	0,565022	0,066126
	dclh	7	0,302118	0,229392	0,348238	0,048039
	icll	7	1,196800	1,088400	1,301506	0,081631
	icfl	7	0,754516	0,676240	0,859842	0,067694
	icpl	7	0,444068	0,409497	0,492377	0,029495
	iclw	7	0,502808	0,428644	0,567713	0,046396
	iclh	7	0,298413	0,233597	0,338117	0,035411
	dcef	7	1,194350	1,173067	1,226784	0,021253
	lcef	7	1,199578	1,165688	1,237145	0,027121
	rol	7	0,324507	0,292141	0,373368	0,032768
	apex	7	0,086219	0,070223	0,103459	0,014326
	row	7	0,161048	0,140921	0,179437	0,015224
	hew	7	0,359974	0,328236	0,401381	0,024325
	cgw	7	0,602653	0,584886	0,628933	0,014846
	cpw	7	0,686161	0,658157	0,721328	0,022568
	hel	7	0,550996	0,533001	0,566207	0,012860
	arl	7	0,449004	0,433793	0,466999	0,012860
	arw	7	0,190863	0,168564	0,211861	0,013422
	cph	7	0,584226	0,560378	0,614351	0,020263
	cew	7	0,458222	0,436404	0,512279	0,027073
	abw	7	0,590297	0,555267	0,639678	0,033579
	abl	7	0,898114	0,841982	0,974290	0,047993
	abh	7	0,332225	0,315516	0,349962	0,012109
	tel	7	0,370781	0,342276	0,407371	0,021989
	tew	7	0,309848	0,282564	0,333461	0,016073
	tl	7	2,572524	2,460820	2,690714	0,091827
	alfa	7	1,453644	1,384831	1,496937	0,037335

b)	Morf. značajka	Broj jedinki	Srednja Vrijed.	Min	Maks
	dcll	1	1,073641	1,073641	1,073641
	dcfl	1	0,618837	0,618837	0,618837
	dcpl	1	0,302149	0,302149	0,302149
	dclw	1	0,421302	0,421302	0,421302
	dclh	1	0,248104	0,248104	0,248104
	icll	1	0,919722	0,919722	0,919722
	icfl	1	0,667826	0,667826	0,667826
	icpl	1	0,324905	0,324905	0,324905
	iclw	1	0,330278	0,330278	0,330278
	iclh	1	0,194374	0,194374	0,194374
	dcef	1	1,216182	1,216182	1,216182
	lcef	1	1,219027	1,219027	1,219027
	rol	1	0,321745	0,321745	0,321745
	apex	1	0,039823	0,039823	0,039823
	row	1	0,154235	0,154235	0,154235
	hew	1	0,384324	0,384324	0,384324
	cgw	1	0,597977	0,597977	0,597977
	cpw	1	0,680152	0,680152	0,680152
	hel	1	0,574589	0,574589	0,574589
	arl	1	0,425411	0,425411	0,425411
	arw	1	0,194374	0,194374	0,194374
	cph	1	0,599241	0,599241	0,599241
	cew	1	0,522124	0,522124	0,522124
	abw	1	0,727876	0,727876	0,727876
	abl	1	1,002845	1,002845	1,002845
	abh	1	0,395702	0,395702	0,395702
	tel	1	0,422566	0,422566	0,422566
	tew	1	0,327750	0,327750	0,327750
	tl	1	2,770228	2,770228	2,770228
	alfa	1	1,494348	1,494348	1,494348

TABLICA 17. Deskriptivnom statistikom opisane morfometrijske i meristi ke zna ajke mužjaka (a) i ženki (b) populacija grupe Gorski Kotar (GK). (Objašnjenja kratica za izmjerena morfometrijska obilježja nalaze se u tablici 8.)

a)	Morf. značajka	Broj jed	Srednja Vrijed.	Min	Maks	Std. Dev.
	dcil	12	1,166192	0,962553	1,306413	0,111007
	dcfl	12	0,690302	0,550213	0,751221	0,063509
	dcpl	13	0,437220	0,238747	0,724699	0,129409
	dclw	12	0,536164	0,454437	0,598298	0,042543
	dclh	12	0,307494	0,275745	0,333029	0,019113
	lcil	13	1,171475	0,952766	1,318941	0,114165
	lcfl	13	0,682625	0,539574	0,778463	0,066386
	lcpl	13	0,457274	0,398723	0,492252	0,025271
	lclw	13	0,540949	0,466375	0,594044	0,041473
	lclh	13	0,312976	0,277756	0,335132	0,018815
	dcef	13	1,206267	1,160764	1,254330	0,027551
	lcef	13	1,209589	1,148428	1,259799	0,028773
	rol	13	0,271165	0,229817	0,298177	0,017420
	apex	13	0,085561	0,061706	0,099035	0,011366
	row	13	0,158539	0,144179	0,176813	0,011868
	hew	13	0,378288	0,325109	0,403044	0,022328
	cgw	13	0,593375	0,392052	0,643547	0,063128
	cpw	13	0,699593	0,629369	0,783045	0,042498
	hel	13	0,555073	0,525930	0,580458	0,015725
	arl	13	0,444927	0,419542	0,474070	0,015725
	arw	13	0,199508	0,180383	0,230402	0,015796
	cph	13	0,574668	0,530442	0,604072	0,021472
	cew	13	0,475845	0,414246	0,512610	0,033640
	abw	13	0,602942	0,532970	0,650340	0,032992
	abl	13	0,981765	0,902339	1,198125	0,075001
	abh	13	0,322887	0,290079	0,378977	0,025437
	tel	13	0,375282	0,341899	0,405106	0,017321
	tew	13	0,323883	0,287659	0,350638	0,015917
	tl	13	2,589753	2,465820	2,693617	0,066318
	alfa	13	1,439671	1,321337	1,594009	0,067896

b)	Morf. značajka	Broj jedinki	Srednja Vrijed.	Min	Maks	Std. Dev.
	dcil	11	0,944221	0,649794	1,114203	0,113961
	dcfl	11	0,597442	0,511889	0,692447	0,047372
	dcpl	10	0,410946	0,321287	0,546260	0,072853
	dclw	11	0,442336	0,354321	0,519335	0,040983
	dclh	11	0,247728	0,193827	0,301409	0,026228
	lcil	11	0,952327	0,874074	1,118179	0,066830
	lcfl	11	0,583714	0,539127	0,648717	0,030828
	lcpl	11	0,362888	0,308642	0,443079	0,033614
	lclw	11	0,444201	0,360082	0,527286	0,041898
	lclh	11	0,249970	0,198354	0,306831	0,026038
	dcef	11	1,222663	1,191358	1,306865	0,033152
	lcef	11	1,222457	1,197985	1,308519	0,032902
	rol	11	0,293702	0,221900	0,333745	0,028526
	apex	11	0,093984	0,081364	0,114222	0,011569
	row	11	0,163038	0,153372	0,179617	0,009164
	hew	11	0,367304	0,324148	0,416460	0,028274
	cgw	11	0,617736	0,584955	0,664185	0,019750
	cpw	11	0,698879	0,655185	0,794458	0,036596
	hel	11	0,561785	0,542184	0,578644	0,011881
	arl	11	0,438215	0,421356	0,457816	0,011881
	arw	11	0,212129	0,200611	0,225881	0,008918
	cph	11	0,580255	0,519084	0,628205	0,026954
	cew	11	0,493398	0,453700	0,587262	0,039364
	abw	11	0,719840	0,595591	0,836642	0,061644
	abl	11	1,034338	0,744194	1,172870	0,110909
	abh	11	0,375897	0,332429	0,431348	0,029789
	tel	11	0,402663	0,374263	0,451199	0,023781
	tew	11	0,342961	0,323621	0,378412	0,021499
	tl	11	2,737129	2,638144	3,021505	0,115855
	alfa	11	1,448002	1,339417	1,533437	0,048698

U daljnjim analizama koncentrirali smo se na eventualne razlike među jedinkama različitih grupa te smo, gdje je to bilo moguće, Mann-Whitney U testom međusobno usporedili sve četiri grupe odvojeno za svaki spol.

Kompletna tablica prikaz svih uspoređivanih morfometrijskih obilježja nalazi se u prilogu (Prilog III).

a) mužjaci: Najviše se razlikuju mužjaci grupe Dunav i grupe Zeleni vir i to u čak 12 od uspoređivanih 30 morfometrijskih obilježja: oblik kliješta (DCLL, LCLL, DCFL, LCFL, LCPL, LCLW, LCLH), širina glave (HEW), bočno mjerena duljina karapaksa (LCEF), širina areole (ARW), širina karapaksa na njegovom posteriornom dijelu (CEW) i duljina abdomena (ABL). Mužjaci grupe Dunav i grupe Gorski Kotar (GK) međusobno se razlikuju u 13 mjerenih morfometrijskih obilježja, ali se u ovom slučaju više različitih vrijednosti odnosi na oblik kliješta (DCLL, LCLL, DCFL, LCFL, DCLW, LCLW, DCLH, LCLH, LCPL). Jedinke se uz to razlikuju i po duljini apeksa, širini areole (ARW), širini karapaksa na njegovom posteriornom dijelu (CEW) i po duljini karapaksa mjerenoj na lijevoj strani tijela (LCEF). U najmanje mjerenih obilježja se međusobno razlikuju mužjaci grupe Žumberak/Plitvice/Bjelolasica (ŽPB) i grupe Zeleni vir, odnosno samo u duljini rostruma (ROL), te mužjaci grupe Zeleni vir i grupe GK (duljina rostruma i duljina abdomena).

b) ženke: Zbog ograničenog broja jedinki, bilo je moguće usporediti samo ženke grupe ŽPB i grupe GK. Rezultati pokazuju razlike u sedam mjerenih obilježja: duljina apeksa, duljina dlana lijevog kliješta (LCPL), duljina karapaksa (DCEF, LCEF), širina karapaksa na prednjem kraju (CGW) i na najširem dijelu (CPW) te kut. Obzirom na premali broj uzoraka iz grupe Zeleni vir (jedna jedinka) i grupe Dunav (dvije jedinke), ove grupe nije bilo moguće usporediti s ostalima.

Kako je utvrđeno postojanje razlika u nekim morfometrijskim značajkama između proučavanih grupa populacija, uslijedila je primjena diskriminantne analize (DA) kako bi iz svih mjerenih morfometrijskih značajki pronašli one koje najbolje razdvajaju (diskriminiraju) proučavane grupe populacija. Iako su razlike utvrđene i za mužjake i za ženke, zbog premalog broja ženki u pojedinim grupama (Zeleni vir i Dunav) DA smo proveli samo za mužjake.

Metodom «stepwise» obrađeno je 19 odabranih morfometrijskih značajki, a rezultati diskriminantne analize prikazani su u tablici 18. Vidljivo je da su vrijednosti koje opisuju oblik kliješta jedne od najznačajnijih pri diskriminaciji populacija. Duljina lijevog kliješta ima najviše vrijednosti u sve tri diskriminantne funkcije (Root 1, Root 2, Root 3), a uz nju visoke vrijednosti u prvoj diskriminantnoj funkciji imala je i širina lijevog kliješta (LCLW), te u drugoj i trećoj funkciji duljina prsta lijevog kliješta (LCFL).

TABLICA 18. Rezultati diskriminantne analize (DA) za mužjake: Standardizirani koeficijenti kanoni kih diskriminantnih funkcija

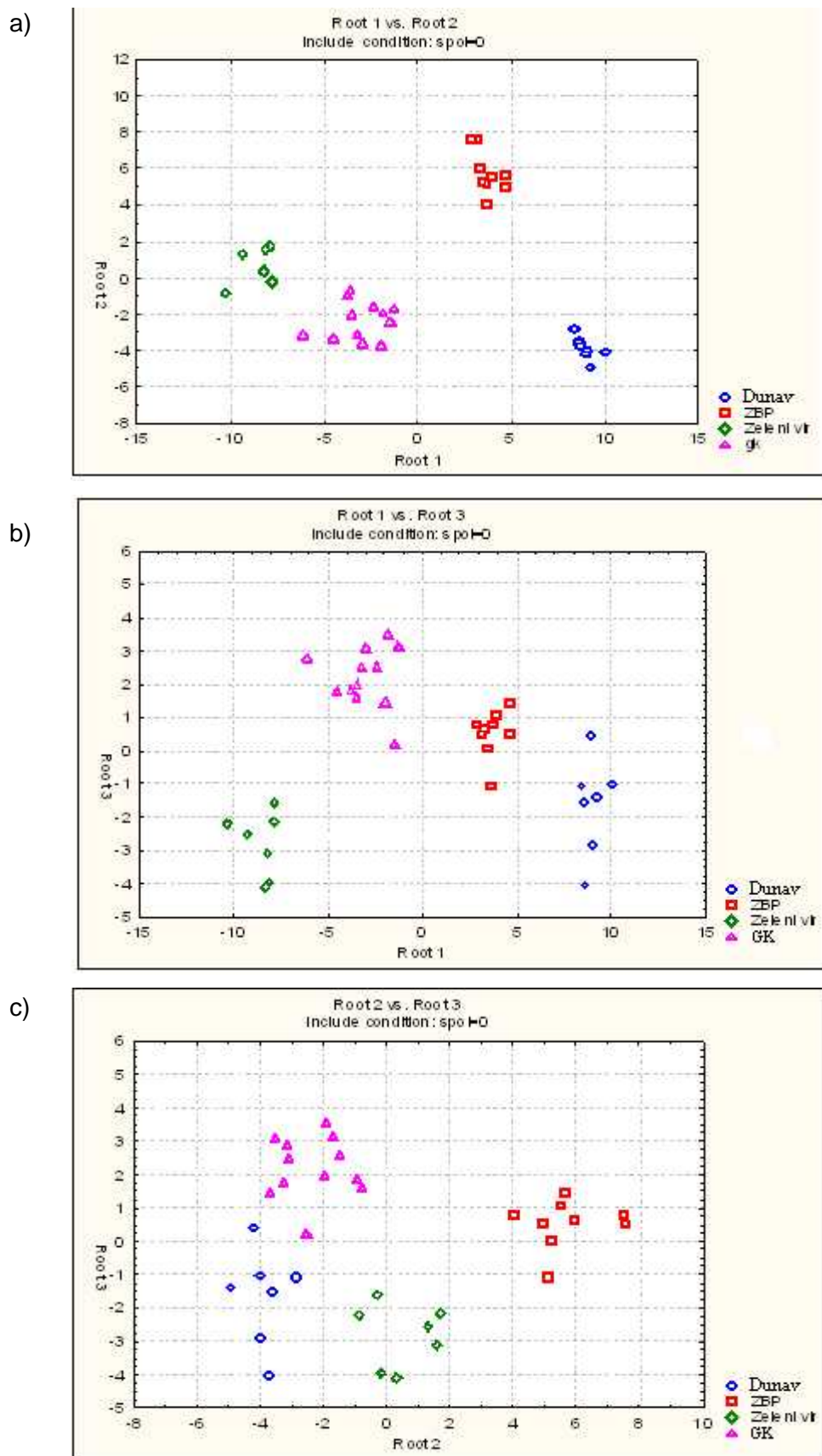
Morf. zna ajka	Root 1 (diskriminantna funkcija)	Root 2 (diskriminantna funkcija)	Root 3 (diskriminantna funkcija)
apex	-1,82490	-1,22919	-0,49063
rol	-2,35994	0,34750	-0,86924
lcpl	-2,46832	-0,38323	-0,25919
lcfi	-3,62952	5,14332	-3,99945
lcil	7,08577	-5,70611	3,88649
lclw	-5,32607	1,31986	0,12933
arw	2,49451	-0,39534	0,19612
hel	4,20308	0,66947	0,98451
lclh	3,54593	-0,06554	-0,45965
tl	2,63359	4,02615	0,43699
cew	3,46766	0,20222	-1,02163
tew	-4,60753	-2,34293	1,24041
lcef	-3,69798	-1,79657	1,57136
cgw	-1,39712	-1,29312	-0,12293
dcef	1,83004	1,09751	1,43383
abh	2,71617	0,03704	0,12915
dcpl	-1,04216	-0,38048	-0,64804
dclw	1,66728	0,75492	0,74878
dcfi	-3,04929	0,00250	-0,29789
Eigenvalue	42,31983	15,12942	4,34250
Cumulative proportion	0,68488	0,92972	1,00000

Ukupni broj to no klasificiranih mužjaka po grupama bio je vrlo visok (Tablica 19); op enito je to nost klasifikacije bila 100%.

TABLICA 19. Rezultati diskriminantne analize za mužjake: Postotak to no klasificiranih jedinki u odre enu grupu.

Grupa	Postotak to no klasificiranih jedinki	Dunav p=,20000	ŽPB p=,25714	Zeleni vir p=,20000	GK p=,34286
Dunav	100,000	7	0	0	0
ŽPB	100,000	0	9	0	0
Zeleni vir	100,000	0	0	7	0
GK	100,000	0	0	0	12
Ukupno	100,000	7	9	7	12

Vizualni prikaz diskriminacije razli itih grupa mužjaka prikazan je na slici 21. Mužjaci svih grupa se u potpunosti me usobno odvajaju.



SLIKA 21. Diskriminacija različitih populacija za mužjake: odvajanje jedinki na temelju prve dvije diskriminantne funkcije (a), prve i treće diskriminantne funkcije (b) i zadnje dvije funkcije (c). Detalji diskriminantnih funkcija nalaze se u tablici 18. Dunav – središnja i jugoistočna Europa (Dunav), ŽPB – Žumberak/Plitvice/Bjelolasica, GK – Gorski Kotar

Prije nego smo krenuli u analizu bilježenih merističkih značajki, Wald – Wolfowitz testom smo provjerili ovise li izmjerene vrijednosti o spolu jedinki. Obzirom da rezultati ovog testa ukazuju da merističke značajke ne ovise o spolu, u daljnjim analizama mužjake i ženke promatrali smo zajedno.

Ovdje treba istaknuti da je tijekom analize uočeno da trnovi na egzopoditu antene nisu uvijek jasno istaknuti te da u nekim slučajevima izgledaju više kao kvržice pa je na ovom stupnju uvedena nova kategorije, tj došlo je do bifurkacije prvotne značajke u egzopodit antene s trnom (**scafopodtrn**) i egzopodita antene s kvržicom (**scafopodkvrg**).

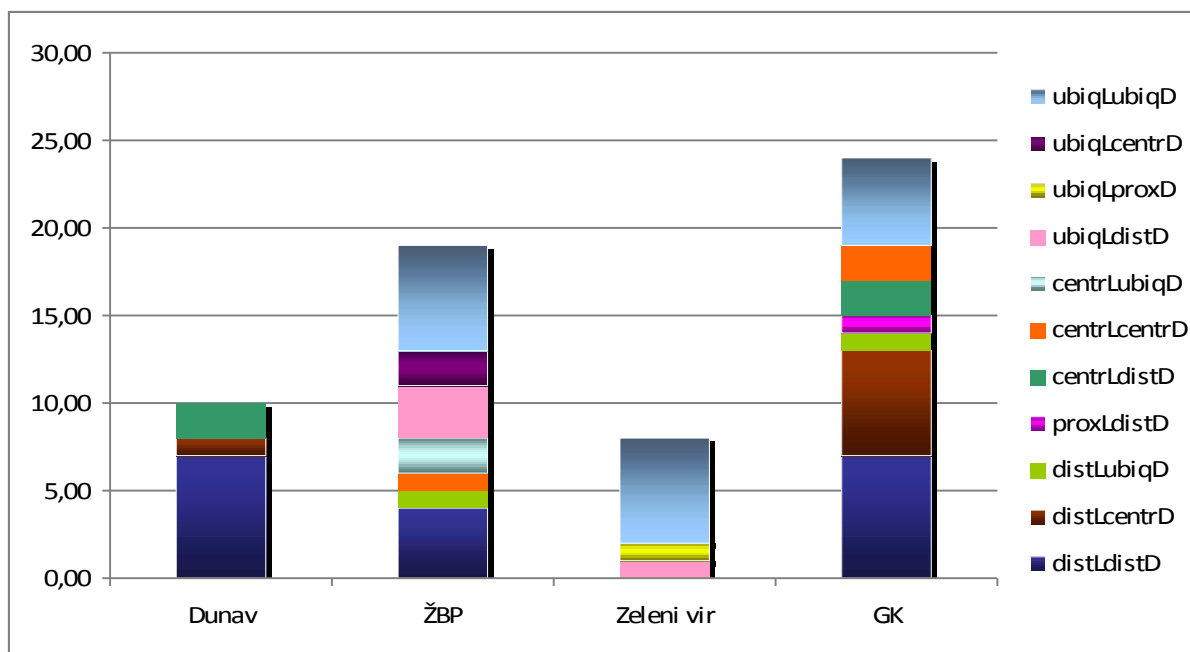
Sve su merističke značajke bilježene i za lijevu i za desnu stranu tijela raka (osim rostralne kreste). Iako je Spearmanovim koeficijentom korelacije utvrđena simetrija na distribucija broja trnaca na telzonu, broja trnaca na skafofodu te položaja trnova na trećem maksilipedu (Prilog IV), obratni su podaci i za lijevu i desnu stranu životinja kako bismo dobili što bolji uvid u morfološku varijabilnost populacija potonog raka.

Mann-Whitney U testom provjereno je razlikuju li se međusobno grupe populacija obzirom na merističke značajke i pregled grupa i značajki po kojima se međusobno razlikuju dan je u tablici 20.

TABLICA 20. Merističke značajke u kojima se grupe jedinki međusobno razlikuju prema Mann-Whitney U testu. (Značenje kratica za opis položaja trnova na trećem maksilipedu dan je u tablici 3.)

	Dunav	ŽPB	Zeleni vir	GK
Dunav	/			
ŽPB	telztrnciL, telztrnciD, skafofodLkvrg	/		
Zeleni vir	skafofodDtrn, skafofodLtrn	telztrniL, skafofodDtrn, skafofodLtrn, MLVU, MDVU	/	
GK	telztrnciL, skafofodDtrn, skafofodLtrn, MLVD	skafofodDtrn, skafofodLtrn	telztrnciL, MLVU	/

Posebna pažnja tijekom analize merističkih značajki posvećena je broju trnova na trećem maksilipedu, obzirom da je to značajka koju je Karaman (1961) isticao kao bitnu u opisu geografskih rasa. Prikaz pozicije trnova na trećem maksilipedu u proučavanjima dan je na Slici 22.



SLIKA 22. Prikaz pozicije trnova na merusu tre eg maksilipeda u istraživanih populacija.

Najve i broj kombinacija položaja trnova prisutan je u populacijama koje pripadaju grupama Gorski Kotar i Žumberak/Plitvice/Bjelolasica (sedam kombinacija, od kojih četiri zajedničke), dok je kod populacija grupa Dunav i Zeleni vir prisutno samo tri kombinacije. Najveće razlike među grupama mogu se zamijetiti upravo između ove dvije grupe (Dunav i Zeleni vir) jer ne dijele niti jednu kombinaciju položaja trnova, a najčešća kombinacija u jednoj grupi (na oba maksilipeda distalno ili jednoliko raspoređeni trnovi) je upravo ona koja nedostaje u drugoj grupi. Na jedinki grupe Zeleni vir nikad nije zabilježen slučaj gdje su na oba treća maksilipeda trnovi postavljeni distalno (distLdistD), dok je to bio slučaj u ostale tri grupe. Također, kod jedinki grupe Dunav nije zabilježen nijedan slučaj jednoliko raspoređenih trnova duž oba maksilipeda (ubiqLubiQD), dok je to bila česta kombinacija u ostale tri grupe. Kombinacija distalno smještenih trnova na lijevom, a centralno smještenih na desnom maksilipedu (distLcentrD) česta je u jedinki grupe Gorski Kotar, a pojavljuje se još jedino kod jedinki grupe Dunav, a kombinacija centrLdistD također je zabilježena jedino za jedinice ove dvije grupe i to u jednakoj mjeri. Isto tako kombinacija jednolikog rasporeda na lijevom i distalnog položaja na desnom maksilipedu (ubiqLdistD) je prisutna jedino u grupi ŽBP i u manjoj mjeri u grupi Zeleni vir. Grupa u kojoj je zabilježen najveći broj jedinstvenih kombinacija (ubiqLcentrD i centrLubiQD) je ŽBP, a jedina grupa u kojoj nije zabilježena niti jedna jedinstvena kombinacija je Dunav. Ostale dvije grupe imaju po jednu jedinstvenu kombinaciju.

Osim po položaju trnova na merusu trećeg maksilipeda, populacije su se značajno razlikovale i po broju trnova na donjoj strani egzopodita antene (skafo-poda) (Tablica 20).

RASPRAVA

Pravilna identifikacija pojedine vrste ključna je i prvi korak u svakom biološkom istraživanju. Povijesno su ovakve identifikacije bile područje taksonomskih studija, a temeljile su se na objašnjavanju morfoloških karakteristika vrste (Karaman, 1961). Razvoj identifikacijskog sustava temeljenog na raznolikosti sekvenci DNA predstavlja znatan napredak, te se danas smatra da je pristup kombiniranja molekularnih i morfoloških rezultata najbolji u istraživanju taksonomije i evolucije vrsta (Wahlberg i sur., 2005). Iako su istraživanja slatkovodnih rakova sve brojnija, mnogi aspekti vrste *Austropotamobius torrentium*, njenog taksonomskog statusa i biogeografije, i dalje ostaju nejasni.

5.1. MOLEKULARNO – FILOGENETIČKE ANALIZE

Sekvence 16S rRNA mitohondrijskog gena i gen za podjedinicu I citokrom oksidaze pokazali su se iznimno korisnim prilikom proučavanja filogenetskih odnosa slatkovodnih rakova (Crandall i Fitzpatrick, 1996, Kitaura i sur., 1998, Crandall i sur., 2000).

Analiza 16S i COI mitohondrijskih gena pokazala je visoki stupanj genetičke raznolikosti populacija Parka prirode Žumberak-Samoborsko gorje. Bayesian analiza sekvenci izoliranih u ovom istraživanju te prikupljenih u drugim istraživanjima i preuzetih iz GenBank baze sekvenci grupira sekvence u pet (16S) odnosno šest (COI) haplogrupa, od čega su haplotipovi sa područja Parka prirode prisutni u četiri haplogrupe. Dvije grupe podudaraju se s grupama koje su izdvojili Trontelj i sur. (2005): Dunav (jugoistočna Alpe + Slovenija i gornji sliv Rajne prema Trontelj i sur., 2005) i Gorski Kotar (gornji sliv Kupe prema Trontelj i sur., 2005), grupa Zeleni vir sastoji se isključivo od haplotipova izoliranih na području Parka prirode, a grupa Žumberak/Plitvice/Bjelolasica također sadrži sekvence prikupljene samo na području Hrvatske. Trontelj i sur. (2005) izdvajaju i grupu južni Balkan u koju nije svrstan niti jedan haplotip s područja PP Žumberak-Samoborsko gorje.

Populacije koje pripadaju području Hrvatske, odnosno haplogrupama ŽPB, GK i LD, kao i one unutar grupe južni Balkan, posebno su zanimljive za proučavanje i zaštitu potonog raka obzirom da pokazuju najveću genetičku varijabilnost ove vrste.

Teorija populacijske genetike predviđa da male izolirane populacije s niskim stupnjem genetičkog protoka pokazuju nizak stupanj genetičke raznolikosti i visok stupanj genetičke diferencijacije između populacija. Ovaj fenomen je često odgovoran za genetičku fragmentaciju vrste u odvojene populacije koje mogu odražavati lokalne prilagodbe na okoliš. Informacije o genetičkoj varijabilnosti populacija ugroženih vrsta vrlo su bitne pri izradi strategija zaštite (Grandjean i Souty-Grosset, 2000).

Geneti ka udaljenost (p) za haplogrupe analizirane u ovom radu varira od 0,007 do 0,054 (16S) odnosno 0,033 do 0,1 (COI). Dvije grupe posebno se izdvajaju visokim p - vrijednostima izme u njih i ostalih haplogrupa: Gorski Kotar (GK) i Zeleni vir (ZV).

U nekim slu ajevima za 16S sekvencu (0,044 – 0,054 izme u GK i ZV) p - vrijednosti su ve e od vrijednosti koje su Fratini i sur. (2005) izra unali kao geneti ku udaljenost izme u vrsta *A. pallipes* i *A. italicus* (0,026-0,043), vrijednosti koje su dobili Grandjean i sur.(2000) (0,046-0,047), odnosno op enitih vrijednosti koje su Sinclair i sur.(2004) izrazili za slatkovodne rakove (Tablica 21). Vrijednosti izme u vrsta *A. torrentium* i *A. pallipes* te *A. torrentium* i *A. italicus* prema Fratini i sur. (2005) ipak su nešto više (0,076-0,081, odnosno 0,072-0,086).

Broj slu ajeva gdje je geneti ka udaljenost izme u haplogrupa (p–vrijednost) ve a od one karakteristi ne za jedinke unutar iste vrste ve i je za COI sekvencu, gdje te vrijednosti ak premašuju vrijednosti zabilježene me u razli itim vrstama prikazane u Tablici 21. Geneti ka udaljenost izme u bilo koje dvije haplogrupe analizirane u ovom radu (osim JB – Dunav), izražena kao p-vrijednost, iznosi izme u 0,064 – 0,100. Ove vrijednosti podjednake su onima zabilježenim izme u vrsta *A. pallipes* i *A. italicus* (0,069 - 0,07), a zna ajno ne odstupaju niti od vrijednosti zabilježenih izme u vrsta *A. torrentium* i *A. pallipes* te su otprilike istog raspona kao vrijednosti izme u vrsta roda *Astacus* (Trontelj i sur., 2005).

TABLICA 21. Procijenjene geneti ke udaljnosti unutar i izme u vrsta, rodova i nadporodica za pet razli itih gena (16S, 12S, COI,18S i 28S) u slatkovodnih rakova iz skupine Astacidea (Sinclair i sur., 2004)

Taxonomic Hierarchy	16S	12S	COI	18S	28S	Astacin
Within Species	0.000-0.068 (0.025)	0.003-0.006 (0.005)	0.002-0.004 (0.003)	-	-	0.0276
Among Species	0.002-0.147 (0.057)	0.03-0.16 (0.09)	0.059	-	-	0.0236
Among Genera	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)	0.027-0.140
Among Superfamilies	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)	-

Geneti ku raznolikost pojedinih populacija poto nog raka na podru ju Parka prirode Žumberak – Samoborsko gorje potvr uje i nukleotidna raznolikost (vrijednost) izra unata na 100km (Tablica 11). Ovako izražena, ona je najve a za haplogrupu GK, a izuzetno je velika i za populaciju Zeleni vir gdje je za 16S sekvencu identi na vrijednosti grupe Dunav koja pokriva višestruko ve e podru je, a za COI sekvencu je skoro jednaka vrijednosti za grupu GK koja je tako er ve e površine u odnosu na Zeleni vir.

To navodi na zaklju ak da se vrlo vjerojatno sadašnja vrsta *A. torrentium* zapravo sastoji od više podvrsta ili ak i vrsta koje se tek trebaju definirati, a PP Žumberak-

Samoborsko gorje bi mogao predstavljati jedinstveni fenomen jer sadrži čak četiri od šest takvih genetski distinktnih grupa unutar vrste *A. torrentium*. Mogući uzrok ovako velike raznolikosti na području PP Žumberak-Samoborsko gorje je krški reljef burne geološke prošlosti (Buzjak, 2002) i djelomična izolacija populacija.

Visoka genetska raznolikost na području sjevernih Dinarida zabilježena je i za bijelonog raka (*A. pallipes*) (Trontelj i sur., 2005) i za vodenbaburu (*Asellus aquaticus*) u populaciji svoju genetsku raznolikost najviše im dijelom duguju turbulentnoj povijesti mnoštva malih hidrogeografskih promjena koje su se zbivale prilikom procesa okršavanja (Verovnik i sur., 2004). Ovo sve bi moglo upućivati na postojanje više glacijalnih refugija u dinaridskom kršu zapadnog Balkana.

Genetska uniformnost populacija potonog raka na području Dunavskog sliva (središnja i jugoistočna Europa) (Grandjean i sur., 2005, Schubart i Huber, 2006) može se objasniti naglom postglacijalnom rekolonizacijom, pri čemu je došlo do efekta uskog grla (Hewitt, 1999).

Upotrebom molekularnog sata za mitohondrijski gen COI izračunato je vrijeme razdvajanja između haplotipova. Najstarije razdvajanje nastupilo je između skupine haplogrupa Dunav - južni Balkan i ostalih haplogrupa, prije između 3,5 i 5 milijuna godina. Taj period Pleistocena karakteriziran je povlačenjem Paratetisa prema jugoistoku što je moglo uzrokovati odvajanje ovih otkladno vrlo starih linija. Najkasnije razdvajanje zbilježeno se prije 1,65 do 3,1 milijuna godina i to između haplogrupa južni Balkan i Dunav. Ovo bi moglo biti povezano sa snažnim klimatskim oscilacijama tijekom proteklih 3 milijuna godina (uključujući i seriju ledenih doba) koje su mogle potaknuti specijaciju i odvajanje sadašnjih linija te utjecati na areal mnogih europskih vrsta, maskirajući i tako neke događaje iz prošlosti (Fratini i sur., 2005).

Ovakva rekonstrukcija može se nadovezati na zaključke do kojih su u svojim radovima došli drugi autori. Općenito, glavno razdvajanje unutar roda *Austropotamobius* na linije *pallipes* i *torrentium* događalo se u drugoj polovici Miocena, prije 10-12 milijuna godina (Trontelj i sur., 2005). Taj događaj se podudara s razdvajanjem još nekih slatkovodnih organizama na bitne filogeografske linije (Verovnik i sur., 2005). Daljnja tektonska zbivanja [(podjela Tetisa na Paratetis i južni Mediteran kao posljedica Alpske i Dinaridske orogeneze (Rögl, 1996), isušivanje Paratetisa i nastanak Panonskog jezera krajem mesinske krize saliniteta (Magyar i sur., 1999) te nastanak Dunavskog sliva iz Panonskog jezera (Gabris, 1994)] stvorila su niz novih staništa i uvjetovala daljnja razdvajanja genskih linija i migracije populacija. *Austropotamobius* je nakon odvajanja Tetisa vjerojatno migrirao na područje Balkana. Prije 3-6 milijuna godina došlo je do razdvajanja dviju velikih genskih linija: populacija centralnih i sjevernih Dinarida (ŽPB, GK, Z. vir) i populacija središnje i jugoistočne Europe (Dunav) i

južnog Balkana, što je vjerojatno povezano s nastankom i isušivanjem Panonskog jezera. Moguće je da su populacije dinarskog krša jedno vrijeme bile izolirane velikim brakima i jezerom na istoku (Panonsko jezero kao ostatak centralnog Paratetisa) te Alpama i Dinaridima na sjeveru i zapadu. Krajem miocena i po etkom pliocena dolazi do pojačanja tektonskih poremećaja što je pojačalo okršavanje i vjerojatno uvjetovalo daljnju alopatrijsku specijaciju. U tom periodu vjerojatno dolazi do odvajanja grupa sjevernih i centralnih Dinarida na GK, ŽPB i Z.vir.

Postoji mogućnost da upravo područje sjevernih i centralnih Dinarida i Istre predstavlja regije specijacije *torrentium* i *pallipes* linija i centar njihove radijacije. Ovakvu teoriju podržava otkriće bazalnih haplotipova vrste *A. torrentium* u populacijama haplogrupa GK, ŽPB i Z.vir i bazalnih linija vrste *A. pallipes* na području Istarskog poluotoka (Trontelj i sur., 2005) te velika nukleotidna raznolikost ovih haplotipova.

Populacije iz haplogrupe Dunav danas prekrivaju veliku većinu sliva Dunava i na taj način pokrivaju i većinu areala rasprostranjenosti ove vrste. Relativno velika genetska raznolikost između u geografski odijeljenih populacija vrste *A. torrentium*, koje naseljavaju prostore južno od Alpa, posljedica je preživljavanja ledenih doba u odvojenim refugijima. Pretpostavlja se da su refugiji mogli biti smješteni na prostoru Alpa, Dinarskog krša, Balkanskog poluotoka i Turske (Pretzmann, 1987, Hewitt, 1999, 2000). Populacije koje naseljavaju područje sjeverno od Alpa (Njemačka, Francuska, Luxemburg) su genetski puno siromašnije nego populacije južno od Alpa.

Pojašnjenje se može naći u teoriji pred-pleistocenskog širenja vrste *A. torrentium* sa sjevera na jug (Verovnik i sur., 2005), nakon čega su nastupila pleistocenska ledena doba, preživljavanje u refugijima i zatim ponovna kolonizacija središnje i jugoistočne Europe (Dunavski sliv) i to genetskim linijama južnog Balkana (i Dinarida). U prilog ovoj teoriji govori genetsko siromaštvo haplogrupe Dunav kao posljedica efekta uskog grla (Hewitt, 2000), kao i genetsko bogatstvo grupa sjevernih i centralnih Dinarida, s najviše dobro definiranih grana.

5.2. MORFOMETRIJSKE I MERISTIČKE ZNAČAJKE

Upotreba morfoloških karakteristika za identifikaciju pojedinih vrsta slatkovodnih rakova razrađena je u determinacijskim ključevima, ali poznato je da se razlike u morfologiji rakova mogu pojaviti ne samo među različitim vrstama, nego i među odvojenim populacijama i to kao adaptacija na lokalne uvjete staništa (Grandjean i Souty-Grosset, 2000, Sint i sur., 2005).

U ovom istraživanju korištena je 61 jedinka ulovljena na području PP Žumberak – Samoborsko gorje. Izmjerena su 23 morfometrijska obilježja, koja se uglavnom podudaraju s obilježjima mjerenim u ranijim radovima (Maguire i sur., 2003, Sint i sur., 2005, 2006, 2007), a

uz to je zabilježeno i pet merističkih značajki za lijevu i desnu stranu životinje, koja su također spominjana u ranijim radovima (Karaman, 1961, Maguire i sur., 2003). Prije nego smo deskriptivno opisali mjerene morfometrijske parametre i pristupili njihovoj normalizaciji i daljnjoj analizi, morali smo provjeriti razlikuju li se mužjaci (37 jedinki) i ženke (24 jedinke) u nekim od mjerenih parametara. Spolni dimorfizam poznat je među desetonožnim rakovima (Grandjean i sur., 1997, Grandjean i Souty-Grosset, 2000, Sterissl i Hödl, 2002), a Mann-Whitney U testom utvrđeno je i kod jedinki s područja PP Žumberak-Samoborsko gorje te su u daljnjim analizama podaci obrađivani odvojeno za svaki spol.

Istraživanje s ciljem prikupljanja podataka o morfologiji vrste *Austropotamobius torrentium* na području Hrvatske intenzivnije se provodi nekoliko godina (Maguire i sur., 2006), a posebno je korisno kada se rezultati morfoloških mogu usporediti s rezultatima genetičkih analiza. Upravo zbog toga jedinke su za morfološku analizu grupirane u četiri grupe (Dunav, Žumberak/Plitvice/Bjelolasica, Gorski Kotar, Zeleni vir) prema rezultatima molekularno-filogenetičkih analiza te su uspoređivane vrijednosti morfoloških obilježja među grupama.

Najviše statističkih značajnih razlika među populacijama mužjaka utvrđeno je uspoređujući i obilježja kliješta i kod nekih jedinki oblik karapaksa, a kod ženki je najviše statističkih značajnih razlika utvrđeno za oblik karapaksa. Oblik kliješta bio je najznačajniji i kod diskriminantne analize mužjaka. Ovi rezultati slažu se s rezultatima Sint i sur. (2006, 2007) gdje su također obilježja kliješta i cefalotoraksa imala najbitniju ulogu u postotku to ne klasifikacije. Oblik i veličina rostruma (i apeksa) koji su se pokazali bitnim obilježjima za diskriminaciju populacija slatkovodnih rakova (Maguire i sur., 2003, Sint i sur., 2005) i koje Trontelj i sur. (2005) isti su kao najbitniji u identifikaciji jedinki potonog raka populacije Gornje Kupe (haplogrupa Gorski Kotar), nisu imale tako veliku ulogu u diskriminaciji jedinki. Statistički značajne razlike za ove karakteristike zabilježene su samo među nekim populacijama mužjaka i između dvije uspoređivane grupe ženki. Ovo vrijedi i za kut karapaksa (α) koji je bio statistički značajno različit samo kod ženki.

Nakon diskriminantne analize, sve jedinke su dobro klasificirane, što potvrđuje rezultate molekularno-filogenetičkih analiza. Porast postotka klasifikacije povećanjem udaljenosti među populacijama koji su zamijetili Sint i sur. (2005, 2007) u ovom istraživanju nije zamijećen, obzirom da je postotak to ne klasifikacija za sve slučajeve bio 100%. Ovako dobro odvajanje i visok postotak to ne klasificiranih životinja s tako malog geografskog područja je vrlo rijedak (Sint i sur., 2005) i govori o jasnoj morfološkoj diferencijaciji pojedinih haplogrupa te o mogućnosti šire upotrebe morfoloških metoda pri proučavanju ovih populacija.

Analiza merističkih značajki također podupire rezultate genetičke analize i podržava podjelu jedinki u genetički određene haplogrupe. Od izmjerenih merističkih značajki najvažnijima se pokazao položaj trnova na merusu trećeg maksilipeda, što se slaže s

rezultatima Maguire i sur. (2003). Broj kombinacija različitih položaja trnova na merusu donekle je odražavao nukleotidnu raznolikost populacije, tako da je najveći broj kombinacija zabilježen za jedinke grupa GK i ŽPB. Najveće razlike u položaju trnova zabilježene se među haplogrupama Dunav i Zeleni vir, što se slaže s njihovom genetičkom udaljenošću i ranim vremenom razdvajanja. Karaman (1961) je kao bitnu značajku u opisu geografskih rasa isticao broj i oblik trnova, ali to se nije pokazalo bitnim, te je možda sigurnije bilježiti njihov položaj. Trnovi nisu nikad zabilježeni na dorzalnoj strani maksilipeda niti na proksimalnom dijelu ventralne strane, što se slaže s podacima zabilježenima u ranijim istraživanjima (Bott, 1950, Froglija, 1978, Maguire i sur., 2003).

Broj trnova odnosno kvržica na egzopoditu antene (skafopodu) bio je statistički značajno različit skoro među svim populacijama, što upućuje na činjenicu da u daljnjim istraživanjima taksonomskog statusa vrste *A. torrentium* i ovu karakteristiku treba uzimati u obzir. Prisutnost trnova na donjoj strani egzopodita antene Füreder i Machino (2002) isti u kao bitnu značajku za identifikaciju vrste *A. torrentium*, obzirom da kod ostalih vrsta slatkovodnih rakova zabilježenih u Europi (autohtonih i alohtonih) nije zabilježena ova karakteristika. Osim identifikacije na razini vrste, trnovi na egzopoditu mogli bi olakšati i identifikaciju različitih populacija potonog raka.

Zanimljivo je da broj statistički značajnih morfoloških razlika među populacijama raste što su grupe genetički i geografski udaljenije, što se slaže s rezultatima Sint i sur (2005, 2007). Tako je najviše razlika zabilježeno među mužjacima haplogrupe Dunav i haplogrupe Zeleni vir te haplogrupe Dunav i haplogrupe Gorski Kotar, a najmanje razlika zabilježeno je među grupama ŽPB i ZV, odnosno ZV i GK. Ovakvi rezultati slažu se i s rezultatima genetičke analize vremena razdvajanja, gdje je prvo došlo do razdvajanja grupe Dunav od grupa sjevernih Dinarida, kao i činjenice da morfološke razlike mogu biti posljedica smanjene genetičke raznolikosti uzrokovane efektom uskog grla (Saccheri i sur., 2006).

5.3. PRIJEDLOZI ZA ZAŠTITU

Genetička raznolikost prepoznata je kao sastavni dio prirodne bioraznolikosti, a za njenu zaštitu i očuvanje zalaže se nekoliko međunarodnih propisa i zakona (Soulé i Mills, 1992).

Haplogrupe centralnih i sjevernih Dinarida (GK, ŽPB, LD, ZV) predstavljaju nekoliko evolucijski odvojenih linija čiji status vrste je trenutno nedefiniran, a predloženo je da se tretiraju kao evolucijski značajne skupine (Evolutionary Significant Units, Moritz, 1994).

Kako razlike među jedinkama iz različitih populacija nisu vidljive na prvi pogled nego tek nakon multivarijantne diskriminantne analize, vrlo je vjerojatno da se ovdje radi o tzv. kriptičnim vrstama/podvrstama. Kriptične vrste su česte kod beskralježnjaka i riba, a svojim

postojanjem daju naslutiti da je „reprezentativna” jedinica bioraznolikosti kopnenih voda zapravo manja nego što se do sada smatralo (Cook i sur., 2008).

Tako velika geneti ka raznolikost i morfološka varijabilnost na jednom relativno malom podru ju nije ustanovljena za ovu vrstu nigdje drugdje u Europi. Zbog toga je u interesu i Parka prirode Žumberak – Samoborsko gorje da posebnu pažnju pridaje zaštiti vodotokova u kojima žive poto ni rakovi ovako jedinstvenog genofonda.

ZAKLJUČAK

1. Na području PP Žumberak-Samoborsko gorje su na osnovu molekularno-filogenetičkih analiza mitohondrijskih gena 16S i COI ustanovljene 4 genetički distinktivne skupine (haplogrupe): Dunav, Gorski kotar, Zeleni vir i Žumberak/Plitvice/Bjelolasica što predstavlja ogromnu genetičku raznolikost i bogatstvo na tako maloj geografskoj površini u odnosu na cjelokupni areal vrste gdje su ustanovljeno sveukupno šest haplogrupa (uz navedene još i južni Balkan te Lika i Dalmacija).
2. Dobiveni rezultati su pokazali vrlo visoke genetičke udaljenosti između ustanovljenih haplotipova odnosno geografskih grupa. Najveće udaljenosti su ustanovljene upravo između grupa prisutnih u PP Žumberak-Samoborsko gorje (Gorski kotar, Zeleni vir i Žumberak/Plitvice/Bjelolasica) i između tih i haplogrupa Dunav i južni Balkan. Ovako visoke vrijednosti navode na zaključak da se vrlo vjerojatno vrsta *A. torrentium* zapravo sastoji od više podvrsta ili čak i vrsta koje se tek trebaju definirati, a PP Žumberak-Samoborsko gorje bi mogao predstavljati jedinstveni fenomen jer sadrži čak četiri od šest takvih genetički distinktnih grupacija vrste *A. torrentium*.
3. Procjena razdvajanja navedenih haplogrupa na temelju molekulskog sata za mitohondrijski gen COI upućuje na to da je najranije razdvajanje nastupilo između skupine haplogrupa Gorski kotar-Zeleni vir-Žumberak/Plitvice/Bjelolasica i skupine haplogrupa Dunav-južni Balkan, i to prije između 3,5 i 5 milijuna godina. Do odvajanja unutar skupina grupa došlo je nešto kasnije (prije između 4,3 i 1,65 milijuna godina). Migracije populacija i odvajanje evolucijskih linija zbivalo se pod utjecajem tektonskih zbivanja.
4. Rezultati statističkih analiza morfoloških značajki potkrepljuju rezultate molekularno-filogenetičkih analiza, a pravilno odabrane morfometrijske i merističke karakteristike mogu biti velika pomoć i važno oruđe u pravilnoj identifikaciji slatkovodnih rakova.
5. Postojanje genetički i morfološki posebnih populacija potonih rakova na području Parka prirode Žumberak – Samoborsko gorje jedinstven je biološki fenomen na Europskoj razini i zahtijevati će u neposrednoj budućnosti posebnu brigu u vidu zaštite i očuvanja.

LITERATURA

- Ackefors, H.** (1998) The culture and capture crayfish fisheries in Europe. *World aquaculture*, **29** (2): 18-24, 64-67
- 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.
- Altschul, S.F., Madden T. L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller, W. & Lipman, D. J.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Avise, J.C., Arnold, J., Bsl, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Negel, J.E., Reeb, C.A. & Saunders, N.C.** (1987) Interspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu.Rev.Ecol.Syst.* **18**: 489-522.
- Baric, S., Höllrigl, A., Kerschbamer, C., Füreder, L., Petutschnig, J., Dalla Via, J.** (2005a) Update of the molecular phylogeny of the *Austropotamobius pallipes* species complex by including specimens from South Tyrol (Italy) and Carinthia (Austria). *European native crayfish in relation to land-use and habitat deterioration with a special focus on Austropotamobius torrentium*, CRAYNET, Vol. 4. (eds L. Füreder & S. Souty-Grousset) *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, **376-377**, 599-612
- Baric, S., Höllrigl, A., C., Füreder, L., Dalla Via, J.** (2005b) Mitochondrial and microsatellite DNA analyses of *Austropotamobius pallipes* in South Tyrol (Italy) and Tyrol (Austria) *European native crayfish in relation to land-use and habitat deterioration with a special focus on Austropotamobius torrentium*, CRAYNET, Vol. 4. (eds L. Füreder & S. Souty-Grousset) *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, **376-377**, 627-636
- Bohl, E.**, (1987) Comparative studies on crayfish brooks in Bavaria (*Astacus astacus* L., *Austropotamobius torrentium* Schr.). *Freshwater crayfish*, **7**, 287-294
- Bohl, E.**, (1997) An isolated population of the white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes*) in the principality of Liechtenstein. *Bull. Fr. Pêche Piscic* **347**, 701-712
- Bohl, E.**, (1999) Crayfish stock situation in Bavaria (Germany) – attributes, threats and chances, *Freshwater crayfish*, **12**, 765-777
- Bott, R.** (1950) Die Flusskrebse Europeas (Decapoda, Astacidae). *Abhandlungen der Senckenbergischen Naturforschenden Gesellschaft*
- Brown, W.M., Prager, E.M., Wang, A. & Wilson, A.C.** (1982) Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. *J.Mol.Evol.* **18**: 225-239.
- Buzjak, N.** (2002) Speleološke pojave u parku prirode «Žumberak-Samoborsko gorje». *Geoadria* vol **7/1**, 31-49
- Clary, D.O., Wolstenholme, D.R.** (1985) The mitochondrial genome of the Honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics*, **133**: 97-117.
- Cook, B.D., Page, T.J., Hughes, J.M.** (2008) Importance of cryptic species for identifying «representative» units of biodiversity for freshwater conservation. *Biological conservation* **141**: 2821-2831

- Crandall, K.A. & Fitzpatrick, J.F.** (1996) Crayfish molecular systematics: using a combination of procedures to estimate phylogeny. *Systematic Biology* **45**: 1-26.
- Crandall, K.A., Harris, D.J. & Fetzner, J.W. Jr** (2000) The monophyletic origin of freshwater crayfish estimated from nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Proceedings of the Royal Society, London*, **B 267**, 1679-86
- Creed, R.P.** (1994) Direct and indirect effects of crayfish grazing in a stream community. *Ecology* **75**, 2091-2103
- Cukerzis, J.M.** (1988) On the origin of freshwater crayfish (Astacura). *Freshwater Crayfish*, **7**, 343-349
- Feldman, R. M. & Pole, M.** (1994) A new species of *Paranephrops* White, 1842: a fossil Freshwater crayfish (Decapoda: Parastacidae)
- Franjevi, 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: implications for its taxonomy and conservation, *Heredity* (2005) **94**: 108-118
- Frogliani, C.** (1978) Decapodi (Crustacea, Decapoda). Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane 4. *Consiglio Nazionale delle Ricerche*, Verona, 41p
- Füreder, L. & Machino, Y.** (2002) A revised determination key of freshwater crayfish in Europe. *Ber. Naturwiss.-Med. Ver. Innsb.* **89**: 169-178
- Gabris, G.** (1994) Pleistocene evolution of the Danube in the Carpathian Basin. *Terra nova* **6**, 495-501
- Glaessner, M.F.** (1969) Decapoda. In: *Treatise on Invertebrate Paleontology*, pp
- Grandjean, F., Souty-Grosset, C., Raimond, R., Holdich, D.** (1997) Geographical variation of mitochondrial DNA between populations of the white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes*, *Freshwater Biology* **37**, 493-501
- Grandjean, F., Souty-Grosset, C.** (2000) Genetic and morphological variation in the endangered crayfish species, *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet) (Crustacea, Astacidae) from the Poitou-Charentes region (France). *Aquatic Sciences*, **62**, 1-19
- Grandjean, F., Frelon-Raimond, M., Souty-Grosset, C.** (2002) Compilation of molecular data for the phylogeny of the genus *Austropotamobius*: one species or several? *Knowledge-based management of European native crayfish, crayfish special Volume 4*, (eds C. Souty-Grosset & F. Grandjean). *Bull. Fr. Pêche Piscic.* **367**, 671-680
- Grandjean, F. (2006)** : Systematic and Phylogeny of freshwater crayfish, with particular reference to historical biogeography of Europe. In: *Atlas of crayfish in Europe Museum national d'Histoire naturelle* (eds Souty—grosset, Holdich, Noel, Reynolds, & Haffner), Paris, 187 p. (Patrimoines naturels, 64)
- Greenaway, P., Lawson, B.** (1982) Sodium balance in the Australian crayfish *Cherax destructor*, *Euastacus keirensis* and *E. spinifer* (Decapoda: Parastacoidea). *Australian journal of Marine and Freshwater Research*, **33**, 507-15

- 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.
- 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.
- Harhoglu, M.M., Güner, U.** (2006) Studies on the recently discovered crayfish, *Austropotamobius torrentium*, in Turkey: morphological analysis and meat yield. *Aquaculture research*, 2006, **37**, 538-542
- Hasegawa, M., H. Kishino, & T. Yano.** (1985) Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, **22**: 160-174.
- Hasiotis, S.T.** (1999) The origin and evolution of freshwater crayfish based on crayfish body and trace fossils. *Freshwater Crayfish*, **12**, 49-70
- Hewitt, GM.** (1999) Post-glacial recolonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society*, **68**: 87-112.
- Hewitt, GM.** (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Natura*, **405**: 907-913.
- Hillis, D.M. & Dixon, M.T.** (1991) Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q.Rev.Biol.* **66**: 411-453
- Hobbs, H.H. Jr** (1988) Crayfish distribution, adaptive radiation and evolution. *Freshwater Crayfish: Biology, Management and Exploitation*, (eds D.M. Holdich & R.S. Lowery), pp. 52-82. Croom Helm, London
- Holdich DM i Lowery RS** (1988) Freshwater crayfish – biology, management and exploitation. University Press, Cambridge, pp 498.
- Holdich D. M.** (1999) Negative aspects of crayfish introductions. In: *Crayfish in Europe as alien species – how to make the best of a bad situation?* (eds F. Gherardt & D.M. Holdich), *Crustacean Issues*, **11**: 31-47 (A.A. Balkema, Rotterdam)
- Holdich D. M.** (2002) Present distribution of Crayfish in Europe and some adjoining countries. *Bulletin Francais de la Pêche et de la Pisciculture* **367**, 611-650
- Holdich D. M.** (2003) Crayfish in Europe – an overview of taxonomy, legislation, distribution, and crayfish plague outbreaks, In: *Management & conservation of crayfish, Proceedings of a conference, Nottingham (November 2002)*, (eds D.M. Holdich & P.J. Sibley): 17-34 (Environment agency, Bristol)
- Holdich DM, Haffner P & Noël PY** (2006). Species Files. In: Atlas of Crayfish in Europe, Souty-Grosset C, Holdich DM, Reynolds JD and Haffner P (eds.), pp. 66-71. Publications Scientifiques, Paris, France
- Huner, J.V., Lindquist, O.V., Konunen, H.** (1995) Sexual dimorphism and yield of edible products from a stunted, by commercial standards, population of noble crayfish (*Astacus astacus* Linne) in central Finland. *Freshwater Crayfish*, **8**, 668-679
- Huxley, T.H.** (1880) The Crayfish: An Intruduction in the Study of Zoology

- Hwang, U-W. & Kim, W.** (1999) General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *Korean J. Parasitol.* **37**: 215-228.
- Kappus, B., Peissner, T., Rawer-Jost, C.** (1999) Distribution and habitat conditions of crayfish populations in the urban freshwater systems of Stuttgart (Baden-Württemberg, Germany) *Freshwater crayfish*, **12**, 778-785
- Karaman, M.S.** (1961) Slatkovodni rakovi Jugoslavije. *Publikacije Stru nog Udruženja za Unapre enje Slatkovodnog Ribarstva Jugoslavije*, **3**, 1-33
- Karaman, M.S.** (1962) Ein Beitrag zur Systematic der Astacidae (Decapoda). *Crustaceana*, **3**: 173-191.
- Kitaura, J., Wada, K. & Nishida, M.** (1998) Molecular phylogeny and evolution of unique mud-using territorial behavior in ocypodid crabs (Crustacea: Brachyura: Ocypodidae). *Molecular Biology and Evolution* **15**: 626-637
- Klobu ar, G.I.V., Franjevi , D., Faller, M., Gottsteun, S., Kalafati , M., Maguire, I.** (neobjavljeno) Mitochondrial phylogeography reveals cryptic diversity within the stone crayfish *Austropotamobius torrentium* (Decapoda, Astacidae): implications for its conservation
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M.** (2004) MEGA3: integrated software for molecular evolutionary analysis and sequence alignment. *Briefing in Bioinformatic*, **5**: 150-163.
- Laurent, P.J.** (1998) *Austropotamobius pallipes* and *A. torrentium*, with observations on their interactions with other species in Europe, In: *Freshwater crayfish* (eds D.M. Holdich, R.S. Lowery), *Freshwater Crayfish*, 342-364, University Press, Cambridge
- Li, S., Pearl, D. i Doss, H** (2000) Phylogenetic tree construction using Markov chain Monte Carlo. *Journal od the American Statistical Association* **95**: 493-508
- Linnaeus, C.** (1758) *Systmae naturae*, 10th ed, Stockholm
- Maguire, I** (2002) Porodica Astacidae u sjeverozapadnoj Hrvatskoj, Doktorska disertacija, Sveu ilište u Zagrebu, 128p
- Maguire, I., Klobu ar, G.I.V.** (2003) Appearance of *Orconectes limosus* in Croatia, *Crayfish news* **3 (25)**: 7
- Maguire, I., Klobu ar, G.I.V., Gottstein-Mato ec, S., Erben, R.** (2003) Distribution of *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet) in Croatia and notes on its morphology. *Bull Fr Pêche Piscic* **370-371**: 57-71
- Maguire, I., Gottstein-Mato ec, S.** (2004) The distribution pattern of freshwater crayfish in Croatia, *Crustaceana* **77**, 25-49
- Maguire, I., Klobu ar, G., Mar i , Z., Zanella, D.** (2008): The first record of *Pacifastacus leniusculus* in Croatia. *Crayfish news* **30 (4)**: 4
- Magyar, I., Geary, D.H., Müller, P.** (1999) Paleographic evolution of the Late Miocen Lake Pannon in Central Europe. *Paleography, Paleoclimatology, Paleoecology* **147**, 151-167

- 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.
- Margulis, L.** (1970) *Origin of Eukaryotic Cells*, Yale University Press, USA.
- Mau, B., Newton, M.A. i Larget, B.** (1997) Bayesian phylogenetic inference via Markov chain Monte Carlo methods. *Molecular Biology and Evolution* **14**: 717-724
- Mau, B., Newton, M. & Larget, B.** (1999) Bayesian phylogenetic inference via Markov chain Monte Carlo methods. *Biometrics* **55**: 1-12.
- Moore, W.S.** (1995) Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution* **49**: 718-726.
- Moritz, C.** (1994) Defining 'evolutionary significant units' for conservation. *Trends Ecol Evol* **9**: 373-375
- Narodne novine** (2005) Zakon o zaštiti prirode, 70/05
- Narodne novine** (2006) Pravilnik o proglašavanju divljih svojti zaštiti enim i strogo zaštiti enim 07/06
- Nei M., Kumar S.** (2000) *Molecular Evolution and Phylogenetics*, Oxford University Press, New York.
- Nyström, P., Brönmark, C., Granèli, W.** (1996). Patterns in benthic food webs: a role for omnivorous crayfish? *Freshwater Biol.* **36**, 631-646
- Ortmann, A.E.** (1897) Ueber "Bipolarität" in der Verbreitung mariner Tiere. *Zoologische Jahrbucher, Abteilung Systematik*, **9**, 571-95
- Palumbi, S.R. & Benize, J.** (1991) large mitochondrial DNA differences between morphologically similar Penaeid shrimp. *Mol Marine Biol Biotechnol.* **1**: 27-34.
- Park prirode Žumberak-Samoborsko gorje** (2009) – web stranica (www.pp-zumberak-samoborsko-gorje.hr)
- Patterson, C.**, ed (1987) *Molecules and morphology in Evolution: Conflict or Compromise?* Cambridge: Cambridge University Press
- Pechenik, Jan A.** (2000) *Biology of the Invertebrates*, 4th edition, McGraw-Hill Foundation, USA
- Pretzmann, G.**, (1987) A contribution to a historic analysis of Mediterranean freshwater decapoda chorology. *Invest Pesq* **51**: 7-25
- Pršir, N.** (2005) Rasprostranjenost rakova iz porodice Astacidae na području Parka prirode Žumberak-Samoborsko gorje, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu
- Radovi, J.** (2000) An overview of the state of biological and landscape diversity of Croatia : 1-158 (Ministry of Environmental Protection and Physical Planning, Zagreb)
- Rannala, B. i Yang, Z.** (1996) Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *J.Molecular Evolution* **43**: 304-311

- Renz, M., Breithaupt, T.** (2000) Habitat use of the crayfish *Austropotamobius torrentium* in small brooks and in Lake Constance, Southern Germany, *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, **356**, 139-154
- Ronquist, R.** (1997) Dispersal-vicariance analysis: A new approach to the quantification of the historical biogeography. *Syst.Biol.* **46**: 195-203.
- Rögl, F.** (1998) Paleographic consideration for Mediterranean and Paratethys seaways (Oligocene to Miocene). *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien* **99A**, 279-310
- Sacheri, I.J., Nichols, R.A. i Brakfield, P.M.** (2006) Morphological differentiation following experimental bottlenecks in the butterfly *Bicyclus anynana* (Nymphalidae). *Biol.J.Linn.Soc.* **89** 107-115
- Saraste, M.** (1990) Structural features of cytochrome oxidase. *Q Rev Biophys.* **23**: 331–366.
- Scholtz, G.** (1993) Teloblast in decapod embryos: an embryonic character reveals monophyletic origin of freshwater crayfish (Crustacea, Decapoda). *Zoologischer Anzeiger*, **230**, 45-54
- Schubart, C.D., Huber, M.G.J.** (2006) Genetic comparisons of German populations of the stone crayfish, *Austropotamobius torrentium* (Crustacea, Astacidae), *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, **380-381**, 1019-1028
- 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.
- Sint, D., Dalla Via, J., Füreder, L** (2005) Morphological variations in *Astacus astacus* L and *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet) populations. In: *European native crayfish in relation to land-use and habitat deterioration with a special focus on Austropotamobius torrentium* CRAY-NET, Vol.4, (eds L. Füreder, C. Souty-Grosset) *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, **376-377**, 637-652
- Sint, D., Dalla Via, J., Füreder, L.** (2006) The genus *Austropotamobius* in the Ausserfern region (Tyrol, Austria) with an overlap in the distribution of *A.torrentium* and *A.pallipes* populations, *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, **380-381**, 1029-1040
- Sint, D., Dalla Via, J., Füreder, L.** (2007) Phenotypical characterization of indigenous freshwater crayfish populations, *Journal of Zoology* **273**, 210-219
- Skurdal, J., Taugbøl, T.** (2002) *Astacus*. In: *Biology of freshwater crayfish*: 467-510 (ed D.M.Holdich), Oxford, Blackwell Science
- Soulé M.E., Mills, L.S.** (1992) Conservation genetics and conservation biology: a troubled marriage. In: Saundlund OT (eds K. Hindar, A.H.D. Brown) *Conservation of Biodiversity for Sustainable Development*. Scandinavian University Press: Oslo, Scandinavia, pp 55-69
- Starobogatov, Ya.I.** (1995) Taxonomy and geographical distribution of crayfish of Asia and east Europe (Crustaceae:Decapoda:Astacidae). *Arthr. sel.* **4 (3)**, 3-25

- Streissl, F. & Hödl, W.** (2002) Growth, morphometrics, size at maturity, sexual dimorphism and condition index of *Austropotamobius torrentium* Shcrank. *Hydrobiologia* **477**, 201-208
- Stucki, T.P., Romer, J.** (2001) Will *Astacus leptodactylus* displace *Astacus astacus* and *Austropotamobius torrentium* in Lake Ägeri, Switzerland? *Aquat.sci.*, **63**, 477-489
- Swain,D.P., Foote, C.J.** (1999) Stock and chameleons: the use of phenotypic variation in stock identification. *Fish.Res.* **43**, 113-128
- Taugbøl, T. & Skurdal, J.** (1999) Monitoring of crayfish populations, In: *Nordic-Baltic workshop on freshwater crayfish research and management* (ed T. Taugbøl): 109-115
- Taylor, C.A.** (2002) Taxonomy and conservation of native crayfish stocks. *Biology of Freshwater Crayfish*. 236-257, *Blackwell Science*
- 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.
- 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.
- Troschel, H.J., Dehus, P.** (1993) Distribution of of crayfish species in the federal republic of Germany, with special reference to *Austropotamobius pallipes*. *Freshwater Crayfish* **9**, 390-398
- Troschel, H.J., Schulz, U., Berg, R.** (1995) Seasonal activity of stone crayfish *Austropotamobius torrentium*, *Freshwater Crayfish* **10**, 196-199
- 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.** (2004) Phylogeography of subterranean and surface populations of water lice *Asellus aquaticus* (Crustacea, Isopoda), *Molecular Ecology* **13**, 1519-1532
- 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
- Vandamme, A-M.**, (2004) Basic concepts of molecular evolution, In: *The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny*, (eds M. Salemi & A.-M. Vandamme) Cambridge: Cambridge University Press
- 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. *Proc. R. Soc. 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.

Wolsteinholme, D.R. (1992) Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *Int.Rev.Cytol.* **141**: 173-216

Yamauchi, M.M., Masaki U.M. & Nishida M. (2002) Complete mitochondrial DNA sequence of the Japanese spiny lobster, *Panulirus japonicus* (Crustacea, Decapoda). *Gene*, **295**: 89-96.

PRILOZI

PRIOLOG I. Spearmanov koeficijent korelacija za mužjake

	DCLL	DCFL	DCPL	DCLW	DCLH	LCLL	LCFL	LCPL	LCLW	LCLH	DCEF	LCEF	ROL	APEX	ROW	HEW	CGW	CPW	HEL	ARL	ARW	CPH	CEW	ABW	ABL	ABH	TEL	TEW	TL
DCLL	1,00	0,97	-0,17	0,79	0,78	0,80	0,82	0,58	0,53	0,42	0,19	0,31	-0,26	-0,51	-0,58	-0,31	0,01	0,18	0,01	-0,01	-0,25	0,07	-0,33	-0,34	-0,52	-0,11	-0,20	-0,37	-0,45
DCFL	0,97	1,00	-0,20	0,77	0,75	0,79	0,85	0,56	0,52	0,42	0,22	0,34	-0,26	-0,56	-0,56	-0,33	0,00	0,17	-0,01	0,01	-0,27	0,06	-0,33	-0,35	-0,57	-0,07	-0,19	-0,34	-0,44
DCPL	-0,17	-0,20	1,00	-0,03	-0,06	-0,22	-0,22	0,07	0,00	-0,04	0,18	0,24	0,39	0,29	0,50	0,34	0,23	0,06	0,29	-0,29	0,14	0,22	0,19	0,33	0,19	0,36	0,25	0,30	0,40
DCLW	0,79	0,77	-0,03	1,00	0,90	0,72	0,69	0,71	0,78	0,67	0,50	0,59	-0,31	-0,33	-0,44	-0,03	0,19	0,40	-0,05	0,05	-0,24	0,22	-0,08	-0,03	-0,19	0,12	0,05	-0,02	-0,14
DCLH	0,78	0,75	-0,06	0,90	1,00	0,59	0,61	0,57	0,61	0,56	0,37	0,46	-0,14	-0,27	-0,40	-0,06	0,19	0,30	-0,09	0,09	-0,21	0,13	-0,12	-0,12	-0,24	0,12	-0,08	-0,13	-0,19
LCLL	0,80	0,79	-0,22	0,72	0,59	1,00	0,94	0,80	0,76	0,66	0,36	0,42	-0,33	-0,42	-0,46	-0,26	0,10	0,29	-0,19	0,19	-0,25	0,18	-0,16	-0,11	-0,33	0,04	0,00	-0,14	-0,26
LCFL	0,82	0,85	-0,22	0,69	0,61	0,94	1,00	0,71	0,66	0,58	0,31	0,39	-0,28	-0,49	-0,43	-0,37	-0,02	0,19	-0,08	0,08	-0,31	0,18	-0,31	-0,23	-0,46	0,01	-0,08	-0,25	-0,32
LCPL	0,58	0,56	0,07	0,71	0,57	0,80	0,71	1,00	0,90	0,86	0,45	0,55	-0,26	-0,23	-0,34	-0,11	0,21	0,31	-0,14	0,14	-0,22	0,28	-0,06	0,04	-0,07	0,15	0,03	0,06	-0,07
LCLW	0,53	0,52	0,00	0,78	0,61	0,76	0,66	0,90	1,00	0,96	0,52	0,61	-0,34	-0,33	-0,36	-0,02	0,21	0,41	-0,19	0,19	-0,29	0,32	-0,01	0,18	0,02	0,20	0,10	0,16	0,01
LCLH	0,42	0,42	-0,04	0,67	0,56	0,66	0,58	0,86	0,96	1,00	0,49	0,59	-0,22	-0,26	-0,30	0,01	0,25	0,39	-0,27	0,27	-0,27	0,36	0,03	0,18	0,07	0,24	0,05	0,17	0,05
DCEF	0,19	0,22	0,18	0,50	0,37	0,36	0,31	0,45	0,52	0,49	1,00	0,92	0,18	-0,03	0,16	0,26	0,57	0,60	-0,11	0,11	0,11	0,53	0,36	0,56	0,32	0,70	0,64	0,54	0,65
LCEF	0,31	0,34	0,24	0,59	0,46	0,42	0,39	0,55	0,61	0,59	0,92	1,00	0,08	-0,06	0,03	0,22	0,45	0,53	-0,07	0,07	0,03	0,55	0,27	0,50	0,20	0,59	0,53	0,41	0,50
ROL	-0,26	-0,26	0,39	-0,31	-0,14	-0,33	-0,28	-0,26	-0,34	-0,22	0,18	0,08	1,00	0,40	0,55	0,16	0,37	0,15	0,06	-0,06	0,21	0,28	0,28	0,28	0,13	0,54	0,27	0,14	0,45
APEX	-0,51	-0,56	0,29	-0,33	-0,27	-0,42	-0,49	-0,23	-0,33	-0,26	-0,03	-0,06	0,40	1,00	0,34	0,51	0,18	0,05	0,00	0,00	0,36	0,11	0,54	0,32	0,42	0,22	0,18	0,36	0,30
ROW	-0,58	-0,56	0,50	-0,44	-0,40	-0,46	-0,43	-0,34	-0,36	-0,30	0,16	0,03	0,55	0,34	1,00	0,29	0,32	0,01	0,26	-0,26	0,44	0,03	0,24	0,29	0,41	0,38	0,33	0,30	0,55
HEW	-0,31	-0,33	0,34	-0,03	-0,06	-0,26	-0,37	-0,11	-0,02	0,01	0,26	0,22	0,16	0,51	0,29	1,00	0,43	0,36	-0,25	0,25	0,26	0,14	0,82	0,54	0,57	0,49	0,44	0,70	0,48
CGW	0,01	0,00	0,23	0,19	0,19	0,10	-0,02	0,21	0,21	0,25	0,57	0,45	0,37	0,18	0,32	0,43	1,00	0,65	-0,02	0,02	0,44	0,07	0,39	0,45	0,37	0,56	0,47	0,30	0,57
CPW	0,18	0,17	0,06	0,40	0,30	0,29	0,19	0,31	0,41	0,39	0,60	0,53	0,15	0,05	0,01	0,36	0,65	1,00	-0,02	0,02	0,06	0,23	0,40	0,59	0,13	0,49	0,59	0,35	0,49
HEL	0,01	-0,01	0,29	-0,05	-0,09	-0,19	-0,08	-0,14	-0,19	-0,27	-0,11	-0,07	0,06	0,00	0,26	-0,25	-0,02	-0,02	1,00	-1,00	0,10	-0,35	-0,40	-0,21	-0,35	-0,32	-0,11	-0,34	-0,10
ARL	-0,01	0,01	-0,29	0,05	0,09	0,19	0,08	0,14	0,19	0,27	0,11	0,07	-0,06	0,00	-0,26	0,25	0,02	0,02	-1,00	1,00	-0,10	0,35	0,40	0,21	0,35	0,32	0,11	0,34	0,10
ARW	-0,25	-0,27	0,14	-0,24	-0,21	-0,25	-0,31	-0,22	-0,29	-0,27	0,11	0,03	0,21	0,36	0,44	0,26	0,44	0,06	0,10	-0,10	1,00	-0,08	0,27	0,13	0,46	0,18	0,27	0,17	0,41
CPH	0,07	0,06	0,22	0,22	0,13	0,18	0,18	0,28	0,32	0,36	0,53	0,55	0,28	0,11	0,03	0,14	0,07	0,23	-0,35	0,35	-0,08	1,00	0,29	0,44	0,25	0,46	0,27	0,32	0,39
CEW	-0,33	-0,33	0,19	-0,08	-0,12	-0,16	-0,31	-0,06	-0,01	0,03	0,36	0,27	0,28	0,54	0,24	0,82	0,39	0,40	-0,40	0,40	0,27	0,29	1,00	0,62	0,62	0,56	0,50	0,75	0,53
ABW	-0,34	-0,35	0,33	-0,03	-0,12	-0,11	-0,23	0,04	0,18	0,18	0,56	0,50	0,28	0,32	0,29	0,54	0,45	0,59	-0,21	0,21	0,13	0,44	0,62	1,00	0,54	0,70	0,75	0,74	0,80
ABL	-0,52	-0,57	0,19	-0,19	-0,24	-0,33	-0,46	-0,07	0,02	0,07	0,32	0,20	0,13	0,42	0,41	0,57	0,37	0,13	-0,35	0,35	0,46	0,25	0,62	0,54	1,00	0,42	0,44	0,70	0,64
ABH	-0,11	-0,07	0,36	0,12	0,12	0,04	0,01	0,15	0,20	0,24	0,70	0,59	0,54	0,22	0,38	0,49	0,56	0,49	-0,32	0,32	0,18	0,46	0,56	0,70	0,42	1,00	0,66	0,64	0,76
TEL	-0,20	-0,19	0,25	0,05	-0,08	0,00	-0,08	0,03	0,10	0,05	0,64	0,53	0,27	0,18	0,33	0,44	0,47	0,59	-0,11	0,11	0,27	0,27	0,50	0,75	0,44	0,66	1,00	0,63	0,80
TEW	-0,37	-0,34	0,30	-0,02	-0,13	-0,14	-0,25	0,06	0,16	0,17	0,54	0,41	0,14	0,36	0,30	0,70	0,30	0,35	-0,34	0,34	0,17	0,32	0,75	0,74	0,70	0,64	0,63	1,00	0,73
TL	-0,45	-0,44	0,40	-0,14	-0,19	-0,26	-0,32	-0,07	0,01	0,05	0,65	0,50	0,45	0,30	0,55	0,48	0,57	0,49	-0,10	0,10	0,41	0,39	0,53	0,80	0,64	0,76	0,80	0,73	1,00

PRILOG II. Spearmanov koeficijent korelacija za ženke.

	DCLL	DCFL	DCPL	DCLW	DCLH	LCLL	LCFL	LCPL	LCLW	LCLH	DCEF	LCEF	ROL	APEX	ROW	HEW	CGW	CPW	HEL	ARL	ARW	CPH	CEW	ABW	ABL	ABH	TEL	TEW	TL
DCLL	1,00	0,86	-0,10	0,55	0,27	0,85	0,89	0,54	0,47	0,22	0,47	0,32	0,31	0,05	0,11	0,17	0,02	0,27	0,11	-0,11	-0,08	0,10	-0,01	0,34	-0,13	0,44	-0,05	-0,11	0,21
DCFL	0,86	1,00	0,01	0,33	-0,01	0,88	0,91	0,35	0,37	0,07	0,35	0,22	0,37	0,06	0,04	0,07	-0,03	0,19	0,21	-0,21	-0,06	0,17	0,01	0,19	-0,27	0,42	-0,03	-0,19	0,11
DCPL	-0,10	0,01	1,00	0,07	0,06	0,10	-0,19	0,08	0,19	0,24	-0,03	-0,18	0,13	0,36	0,32	0,09	0,06	0,13	0,22	-0,22	-0,15	0,29	0,14	0,00	0,07	0,21	0,03	0,26	0,05
DCLW	0,55	0,33	0,07	1,00	0,74	0,46	0,28	0,79	0,86	0,76	0,67	0,49	0,13	0,43	0,39	0,26	0,30	0,59	-0,02	0,02	0,04	0,20	0,00	0,58	0,27	0,32	0,08	0,39	0,44
DCLH	0,27	-0,01	0,06	0,74	1,00	0,10	-0,04	0,50	0,57	0,74	0,42	0,37	0,14	0,48	0,51	0,45	0,29	0,53	-0,04	0,04	0,09	0,07	0,11	0,31	0,40	0,12	0,18	0,55	0,37
LCLL	0,85	0,88	0,10	0,46	0,10	1,00	0,85	0,62	0,61	0,35	0,39	0,21	0,08	0,11	0,00	0,14	0,05	0,24	0,21	-0,21	-0,04	0,06	-0,04	0,29	-0,16	0,49	-0,04	-0,17	0,12
LCFL	0,89	0,91	-0,19	0,28	-0,04	0,85	1,00	0,34	0,26	-0,03	0,30	0,16	0,26	-0,22	-0,15	-0,01	-0,07	0,01	0,21	-0,21	-0,05	0,08	-0,08	0,25	-0,36	0,39	-0,02	-0,28	0,03
LCPL	0,54	0,35	0,08	0,79	0,50	0,62	0,34	1,00	0,86	0,75	0,54	0,35	-0,14	0,37	0,12	0,22	0,26	0,49	0,04	-0,04	0,23	0,03	0,02	0,43	0,28	0,34	0,00	0,16	0,33
LCLW	0,47	0,37	0,19	0,86	0,57	0,61	0,26	0,86	1,00	0,88	0,54	0,39	-0,08	0,48	0,35	0,19	0,21	0,55	0,16	-0,16	0,05	0,09	0,03	0,44	0,25	0,38	0,01	0,24	0,34
LCLH	0,22	0,07	0,24	0,76	0,74	0,35	-0,03	0,75	0,88	1,00	0,49	0,41	-0,20	0,56	0,40	0,41	0,38	0,60	0,05	-0,05	0,17	0,11	0,16	0,33	0,43	0,29	0,16	0,44	0,38
DCEF	0,47	0,35	-0,03	0,67	0,42	0,39	0,30	0,54	0,54	0,49	1,00	0,84	0,10	0,44	0,08	0,42	0,59	0,66	-0,02	0,02	0,16	0,23	0,36	0,64	0,42	0,55	0,39	0,43	0,64
LCEF	0,32	0,22	-0,18	0,49	0,37	0,21	0,16	0,35	0,39	0,41	0,84	1,00	0,26	0,50	0,21	0,48	0,61	0,82	-0,20	0,20	0,18	0,08	0,53	0,55	0,54	0,52	0,51	0,53	0,79
ROL	0,31	0,37	0,13	0,13	0,14	0,08	0,26	-0,14	-0,08	-0,20	0,10	0,26	1,00	0,33	0,50	0,04	0,10	0,30	0,01	-0,01	0,03	0,04	0,25	0,16	0,03	0,13	0,13	0,23	0,34
APEX	0,05	0,06	0,36	0,43	0,48	0,11	-0,22	0,37	0,48	0,56	0,44	0,50	0,33	1,00	0,57	0,43	0,47	0,70	-0,12	0,12	0,32	0,02	0,48	0,15	0,47	0,26	0,13	0,49	0,41
ROW	0,11	0,04	0,32	0,39	0,51	0,00	-0,15	0,12	0,35	0,40	0,08	0,21	0,50	0,57	1,00	0,15	0,00	0,41	-0,10	0,10	-0,10	0,10	0,16	-0,15	0,31	-0,07	0,01	0,37	0,32
HEW	0,17	0,07	0,09	0,26	0,45	0,14	-0,01	0,22	0,19	0,41	0,42	0,48	0,04	0,43	0,15	1,00	0,57	0,62	0,12	-0,12	0,21	0,35	0,45	0,34	0,50	0,41	0,47	0,52	0,49
CGW	0,02	-0,03	0,06	0,30	0,29	0,05	-0,07	0,26	0,21	0,38	0,59	0,61	0,10	0,47	0,00	0,57	1,00	0,56	-0,20	0,20	0,48	0,20	0,38	0,52	0,55	0,32	0,38	0,55	0,48
CPW	0,27	0,19	0,13	0,59	0,53	0,24	0,01	0,49	0,55	0,60	0,66	0,82	0,30	0,70	0,41	0,62	0,56	1,00	-0,18	0,18	0,09	0,18	0,46	0,52	0,66	0,44	0,43	0,63	0,83
HEL	0,11	0,21	0,22	-0,02	-0,04	0,21	0,21	0,04	0,16	0,05	-0,02	-0,20	0,01	-0,12	-0,10	0,12	-0,20	-0,18	1,00	-1,00	0,08	0,27	0,13	0,14	-0,14	0,32	0,13	-0,09	-0,10
ARL	-0,11	-0,21	-0,22	0,02	0,04	-0,21	-0,21	-0,04	-0,16	-0,05	0,02	0,20	-0,01	0,12	0,10	-0,12	0,20	0,18	-1,00	1,00	-0,08	-0,27	-0,13	-0,14	0,14	-0,32	-0,13	0,09	0,10
ARW	-0,08	-0,06	-0,15	0,04	0,09	-0,04	-0,05	0,23	0,05	0,17	0,16	0,18	0,03	0,32	-0,10	0,21	0,48	0,09	0,08	-0,08	1,00	-0,13	0,32	0,08	0,35	0,15	0,26	0,21	-0,01
CPH	0,10	0,17	0,29	0,20	0,07	0,06	0,08	0,03	0,09	0,11	0,23	0,08	0,04	0,02	0,10	0,35	0,20	0,18	0,27	-0,27	-0,13	1,00	0,34	0,26	0,14	0,32	0,25	0,31	0,25
CEW	-0,01	0,01	0,14	0,00	0,11	-0,04	-0,08	0,02	0,03	0,16	0,36	0,53	0,25	0,48	0,16	0,45	0,38	0,46	0,13	-0,13	0,32	0,34	1,00	0,28	0,49	0,69	0,67	0,58	0,46
ABW	0,34	0,19	0,00	0,58	0,31	0,29	0,25	0,43	0,44	0,33	0,64	0,55	0,16	0,15	-0,15	0,34	0,52	0,52	0,14	-0,14	0,08	0,26	0,28	1,00	0,30	0,60	0,42	0,43	0,54
ABL	-0,13	-0,27	0,07	0,27	0,40	-0,16	-0,36	0,28	0,25	0,43	0,42	0,54	0,03	0,47	0,31	0,50	0,55	0,66	-0,14	0,14	0,35	0,14	0,49	0,30	1,00	0,27	0,63	0,69	0,70
ABH	0,44	0,42	0,21	0,32	0,12	0,49	0,39	0,34	0,38	0,29	0,55	0,52	0,13	0,26	-0,07	0,41	0,32	0,44	0,32	-0,32	0,15	0,32	0,69	0,60	0,27	1,00	0,62	0,48	0,41
TEL	-0,05	-0,03	0,03	0,08	0,18	-0,04	-0,02	0,00	0,01	0,16	0,39	0,51	0,13	0,13	0,01	0,47	0,38	0,43	0,13	-0,13	0,26	0,25	0,67	0,42	0,63	0,62	1,00	0,70	0,61
TEW	-0,11	-0,19	0,26	0,39	0,55	-0,17	-0,28	0,16	0,24	0,44	0,43	0,53	0,23	0,49	0,37	0,52	0,55	0,63	-0,09	0,09	0,21	0,31	0,58	0,43	0,69	0,48	0,70	1,00	0,52
TL	0,21	0,11	0,05	0,44	0,37	0,12	0,03	0,33	0,34	0,38	0,64	0,79	0,34	0,41	0,32	0,49	0,48	0,83	-0,10	0,10	-0,01	0,25	0,46	0,54	0,70	0,41	0,61	0,52	1,00

PRILOG III. Rezultati Mann-Whitey U testa za razlike izme u pojedinih grupa: Središnja i jugoisto na Europa (Dunav), Žumberak/Plitvice/Bjelolasica (ŽBP), Gorski Kotar (GK) i Zeleni vir, prikazano odvojeno za mušjake (a) i ženke (b) . Statisti ki zna ajne vrijednosti p su ozna ne crvenom bojom. (Objašnjenja kratica za izmjerena morfometrijska obilježja nalaze se u tablici 8.)

a)

variable	Rank Sum Dunav	Rank Sum ŽBP	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Dunav	Valid N ŽBP
dcll	60,0000	93,0000	24,00000	-1,15470	0,248214	-1,15470	0,248214	8	9
dcfl	56,0000	97,0000	20,00000	-1,53960	0,123659	-1,53960	0,123659	8	9
dcpl	63,0000	73,0000	28,00000	0,37048	0,711026	0,37048	0,711026	7	9
dclw	49,0000	104,0000	13,00000	-2,21318	0,026886	-2,21318	0,026886	8	9
dclh	54,0000	99,0000	18,00000	-1,73205	0,083265	-1,73205	0,083265	8	9
lcll	66,0000	87,0000	30,00000	-0,57735	0,563703	-0,57735	0,563703	8	9
lcfl	56,0000	97,0000	20,00000	-1,53960	0,123659	-1,53960	0,123659	8	9
lcpl	62,0000	91,0000	26,00000	-0,96225	0,335925	-0,96225	0,335925	8	9
lclw	49,0000	104,0000	13,00000	-2,21318	0,026886	-2,21318	0,026886	8	9
lclh	51,0000	102,0000	15,00000	-2,02073	0,043309	-2,02073	0,043309	8	9
dcef	56,0000	97,0000	20,00000	-1,53960	0,123659	-1,53960	0,123659	8	9
lcef	54,0000	99,0000	18,00000	-1,73205	0,083265	-1,73205	0,083265	8	9
rol	81,0000	72,0000	27,00000	0,86603	0,386477	0,86603	0,386477	8	9
apex	105,0000	48,0000	3,00000	3,17543	0,001496	3,17543	0,001496	8	9
row	80,0000	73,0000	28,00000	0,76980	0,441419	0,76980	0,441419	8	9
hew	93,0000	60,0000	15,00000	2,02073	0,043309	2,02073	0,043309	8	9
cgw	79,0000	74,0000	29,00000	0,67358	0,500582	0,67358	0,500582	8	9
cpw	67,0000	86,00000	31,00000	-0,48113	0,630428	-0,48113	0,630428	8	9
hel	57,0000	96,00000	21,00000	-1,44338	0,148916	-1,44338	0,148916	8	9
arl	87,0000	66,00000	21,00000	1,44338	0,148916	1,44338	0,148916	8	9
arw	86,0000	67,00000	22,00000	1,34715	0,177933	1,34715	0,177933	8	9
cph	63,0000	90,00000	27,00000	-0,86603	0,386477	-0,86603	0,386477	8	9
cew	103,0000	50,00000	5,00000	2,98298	0,002855	2,98298	0,002855	8	9
abw	77,0000	76,00000	31,00000	0,48113	0,630428	0,48113	0,630428	8	9
abl	91,0000	62,00000	17,00000	1,82828	0,067509	1,82828	0,067509	8	9
abh	73,0000	80,00000	35,00000	0,09623	0,923342	0,09623	0,923342	8	9
tel	72,0000	81,00000	36,00000	0,00000	1,000000	0,00000	1,000000	8	9
tew	82,0000	71,00000	26,00000	0,96225	0,335925	0,96225	0,335925	8	9
tl	69,0000	84,00000	33,00000	-0,28868	0,772830	-0,28868	0,772830	8	9
alfa	92,0000	61,00000	16,00000	1,92450	0,054293	1,92450	0,054293	8	9

variable	Rank Sum Dunav	Rank Sum Zeleni vir	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Dunav	Valid N Zeleni vir
dcll	42,00000	78,00000	6,00000	-2,54601	0,010897	-2,54601	0,010897	8	7
dclf	41,00000	79,00000	5,00000	-2,66173	0,007774	-2,66173	0,007774	8	7
dcpl	47,00000	58,00000	19,00000	-0,70276	0,482203	-0,70276	0,482203	7	7
dclw	48,00000	72,00000	12,00000	-1,85164	0,064078	-1,85164	0,064078	8	7
dclh	48,00000	72,00000	12,00000	-1,85164	0,064078	-1,85164	0,064078	8	7
lcll	38,00000	82,00000	2,00000	-3,00892	0,002622	-3,00892	0,002622	8	7
lclf	36,00000	84,00000	0,00000	-3,24037	0,001194	-3,24037	0,001194	8	7
lcpl	42,00000	78,00000	6,00000	-2,54601	0,010897	-2,54601	0,010897	8	7
lclw	42,00000	78,00000	6,00000	-2,54601	0,010897	-2,54601	0,010897	8	7
lclh	46,00000	74,00000	10,00000	-2,08310	0,037243	-2,08310	0,037243	8	7
dcef	52,00000	68,00000	16,00000	-1,38873	0,164916	-1,38873	0,164916	8	7
lcef	47,00000	73,00000	11,00000	-1,96737	0,049142	-1,96737	0,049142	8	7
rol	57,00000	63,00000	21,00000	-0,81009	0,417888	-0,81009	0,417888	8	7
apex	79,00000	41,00000	13,00000	1,73591	0,082580	1,73591	0,082580	8	7
row	73,00000	47,00000	19,00000	1,04155	0,297622	1,04155	0,297622	8	7
hew	82,00000	38,00000	10,00000	2,08310	0,037243	2,08310	0,037243	8	7
cgw	68,00000	52,00000	24,00000	0,46291	0,643429	0,46291	0,643429	8	7
cpw	62,00000	58,00000	26,00000	-0,23146	0,816961	-0,23146	0,816961	8	7
hel	71,00000	49,00000	21,00000	0,81009	0,417888	0,81009	0,417888	8	7
arl	57,00000	63,00000	21,00000	-0,81009	0,417888	-0,81009	0,417888	8	7
arw	84,00000	36,00000	8,00000	2,31455	0,020638	2,31455	0,020638	8	7
cph	49,00000	71,00000	13,00000	-1,73591	0,082580	-1,73591	0,082580	8	7
cew	81,00000	39,00000	11,00000	1,96737	0,049142	1,96737	0,049142	8	7
abw	65,00000	55,00000	27,00000	0,11573	0,907869	0,11573	0,907869	8	7
abl	81,00000	39,00000	11,00000	1,96737	0,049142	1,96737	0,049142	8	7
abh	58,00000	62,00000	22,00000	-0,69437	0,487454	-0,69437	0,487454	8	7
fel	71,00000	49,00000	21,00000	0,81009	0,417888	0,81009	0,417888	8	7
few	70,00000	50,00000	22,00000	0,69437	0,487454	0,69437	0,487454	8	7
tl	67,00000	53,00000	25,00000	0,34718	0,728454	0,34718	0,728454	8	7
alfa	75,00000	45,00000	17,00000	1,27300	0,203018	1,27300	0,203018	8	7

variable	Rank Sum Dunav	Rank Sum GK	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Dunav	Valid N GK
dcll	52,0000	158,0000	16,00000	-2,46885	0,013555	-2,46885	0,013555	8	12
dclf	48,0000	162,0000	12,00000	-2,77746	0,005479	-2,77746	0,005479	8	12
dcpl	72,0000	138,0000	44,00000	-0,11886	0,905383	-0,11886	0,905383	7	13
dclw	44,0000	166,0000	8,00000	-3,08607	0,002028	-3,08607	0,002028	8	12
dclh	52,0000	158,0000	16,00000	-2,46885	0,013555	-2,46885	0,013555	8	12
lcll	49,0000	182,0000	13,00000	-2,82441	0,004737	-2,82441	0,004737	8	13
lclf	49,0000	182,0000	13,00000	-2,82441	0,004737	-2,82441	0,004737	8	13
lcpl	41,0000	190,0000	5,00000	-3,40377	0,000665	-3,40377	0,000665	8	13
lclw	40,0000	191,0000	4,00000	-3,47619	0,000509	-3,47619	0,000509	8	13
lclh	42,0000	189,0000	6,00000	-3,33135	0,000864	-3,33135	0,000864	8	13
dcef	61,0000	170,0000	25,00000	-1,95536	0,050542	-1,95536	0,050542	8	13
lcef	50,0000	181,0000	14,00000	-2,75199	0,005924	-2,75199	0,005924	8	13
rol	115,0000	116,0000	25,00000	1,95536	0,050542	1,95536	0,050542	8	13
apex	126,0000	105,0000	14,00000	2,75199	0,005924	2,75199	0,005924	8	13
row	111,0000	120,0000	29,00000	1,66568	0,095779	1,66568	0,095779	8	13
hew	115,0000	116,0000	25,00000	1,95536	0,050542	1,95536	0,050542	8	13
caw	94,0000	137,0000	46,00000	0,43452	0,663908	0,43452	0,663908	8	13
cpw	80,0000	151,0000	44,00000	-0,57937	0,562343	-0,57937	0,562343	8	13
hel	92,0000	139,0000	48,00000	0,28968	0,772059	0,28968	0,772059	8	13
arl	84,0000	147,0000	48,00000	-0,28968	0,772059	-0,28968	0,772059	8	13
arw	120,0000	111,0000	20,00000	2,31746	0,020479	2,31746	0,020479	8	13
cph	70,0000	161,0000	34,00000	-1,30357	0,192380	-1,30357	0,192380	8	13
cew	117,0000	114,0000	23,00000	2,10020	0,035712	2,10020	0,035712	8	13
abw	68,0000	163,0000	32,00000	-1,44841	0,147502	-1,44841	0,147502	8	13
abl	93,0000	138,0000	47,00000	0,36210	0,717275	0,36210	0,717275	8	13
abh	88,0000	143,0000	52,00000	0,00000	1,000000	0,00000	1,000000	8	13
tel	82,0000	149,0000	46,00000	-0,43452	0,663908	-0,43452	0,663908	8	13
few	75,0000	156,0000	39,00000	-0,94147	0,346465	-0,94147	0,346465	8	13
tl	91,0000	140,0000	49,00000	0,21726	0,828004	0,21726	0,828004	8	13
alfa	107,0000	124,0000	33,00000	1,37599	0,168825	1,37599	0,168825	8	13

variable	Rank Sum ŽBP	Rank Sum Zeleni vir	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N ŽBP	Valid N Zeleni vir
dcll	77,00000	59,00000	31,00000	0,05293	0,957791	0,05293	0,957791	9	7
dclf	78,00000	58,00000	30,00000	0,15878	0,873845	0,15878	0,873845	9	7
dcpl	68,00000	68,00000	23,00000	-0,89974	0,368262	-0,89974	0,368262	9	7
dclw	78,00000	58,00000	30,00000	0,15878	0,873845	0,15878	0,873845	9	7
dclh	73,00000	63,00000	28,00000	-0,37048	0,711026	-0,37048	0,711026	9	7
icll	69,00000	67,00000	24,00000	-0,79388	0,427263	-0,79388	0,427263	9	7
icfl	70,00000	66,00000	25,00000	-0,68803	0,491433	-0,68803	0,491433	9	7
icpl	65,00000	71,00000	20,00000	-1,21729	0,223495	-1,21729	0,223495	9	7
iclw	73,00000	63,00000	28,00000	-0,37048	0,711026	-0,37048	0,711026	9	7
iclh	70,00000	66,00000	25,00000	-0,68803	0,491433	-0,68803	0,491433	9	7
dcef	78,00000	58,00000	30,00000	0,15878	0,873845	0,15878	0,873845	9	7
lcef	74,00000	62,00000	29,00000	-0,26463	0,791296	-0,26463	0,791296	9	7
rol	57,00000	79,00000	12,00000	-2,06410	0,039009	-2,06410	0,039009	9	7
apex	58,00000	78,00000	13,00000	-1,95825	0,050202	-1,95825	0,050202	9	7
row	83,00000	53,00000	25,00000	0,68803	0,491433	0,68803	0,491433	9	7
hew	74,00000	62,00000	29,00000	-0,26463	0,791296	-0,26463	0,791296	9	7
cgw	79,00000	57,00000	29,00000	0,26463	0,791296	0,26463	0,791296	9	7
cpw	80,00000	56,00000	28,00000	0,37048	0,711026	0,37048	0,711026	9	7
hel	95,00000	41,00000	13,00000	1,95825	0,050202	1,95825	0,050202	9	7
arl	58,00000	78,00000	13,00000	-1,95825	0,050202	-1,95825	0,050202	9	7
arw	89,00000	47,00000	19,00000	1,32314	0,185790	1,32314	0,185790	9	7
cph	71,00000	65,00000	26,00000	-0,58218	0,560445	-0,58218	0,560445	9	7
cew	63,00000	73,00000	18,00000	-1,42899	0,153008	-1,42899	0,153008	9	7
abw	71,00000	65,00000	26,00000	-0,58218	0,560445	-0,58218	0,560445	9	7
abl	82,00000	54,00000	26,00000	0,58218	0,560445	0,58218	0,560445	9	7
abh	68,00000	68,00000	23,00000	-0,89974	0,368262	-0,89974	0,368262	9	7
tel	80,00000	56,00000	28,00000	0,37048	0,711026	0,37048	0,711026	9	7
tew	71,00000	65,00000	26,00000	-0,58218	0,560445	-0,58218	0,560445	9	7
tl	83,00000	53,00000	25,00000	0,68803	0,491433	0,68803	0,491433	9	7
alfa	61,00000	75,00000	16,00000	-1,64069	0,100862	-1,64069	0,100862	9	7

variable	Rank Sum ŽBP	Rank Sum GK	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N ŽBP	Valid N GK
dcll	104,0000	127,0000	49,00000	0,35533	0,722339	0,35533	0,722339	9	12
dclf	106,0000	125,0000	47,00000	0,49747	0,618859	0,49747	0,618859	9	12
dcpl	94,0000	159,0000	49,00000	-0,63439	0,525826	-0,63439	0,525826	9	13
dclw	85,0000	146,0000	40,00000	-0,99494	0,319768	-0,99494	0,319768	9	12
dclh	96,0000	135,0000	51,00000	-0,21320	0,831171	-0,21320	0,831171	9	12
lcll	93,0000	160,0000	48,00000	-0,70117	0,483198	-0,70117	0,483198	9	13
lclf	106,0000	147,0000	56,00000	0,16695	0,867413	0,16695	0,867413	9	13
lcpl	71,0000	182,0000	26,00000	-2,17029	0,029986	-2,17029	0,029986	9	13
lclw	70,0000	183,0000	25,00000	-2,23706	0,025283	-2,23706	0,025283	9	13
lclh	69,0000	184,0000	24,00000	-2,30384	0,021232	-2,30384	0,021232	9	13
dcef	99,0000	154,0000	54,00000	-0,30050	0,763795	-0,30050	0,763795	9	13
lcef	89,0000	164,0000	44,00000	-0,96828	0,332904	-0,96828	0,332904	9	13
rol	128,0000	125,0000	34,00000	1,63606	0,101828	1,63606	0,101828	9	13
apex	61,0000	192,0000	16,00000	-2,83807	0,004539	-2,83807	0,004539	9	13
row	127,0000	126,0000	35,00000	1,56928	0,116583	1,56928	0,116583	9	13
hew	67,0000	186,0000	22,00000	-2,43740	0,014794	-2,43740	0,014794	9	13
cgw	96,0000	157,0000	51,00000	-0,50084	0,616487	-0,50084	0,616487	9	13
cpw	97,0000	156,0000	52,00000	-0,43406	0,664247	-0,43406	0,664247	9	13
hel	130,0000	123,0000	32,00000	1,76962	0,076792	1,76962	0,076792	9	13
arl	77,0000	176,0000	32,00000	-1,76962	0,076792	-1,76962	0,076792	9	13
arw	115,0000	138,0000	47,00000	0,76795	0,442519	0,76795	0,442519	9	13
cph	106,0000	147,0000	56,00000	0,16695	0,867413	0,16695	0,867413	9	13
cew	68,0000	185,0000	23,00000	-2,37062	0,017759	-2,37062	0,017759	9	13
abw	85,0000	168,0000	40,00000	-1,23539	0,216685	-1,23539	0,216685	9	13
abl	72,0000	181,0000	27,00000	-2,10351	0,035422	-2,10351	0,035422	9	13
abh	106,0000	147,0000	56,00000	0,16695	0,867413	0,16695	0,867413	9	13
tel	101,0000	152,0000	56,00000	-0,16695	0,867413	-0,16695	0,867413	9	13
tew	68,0000	185,0000	23,00000	-2,37062	0,017759	-2,37062	0,017759	9	13
tl	107,0000	146,0000	55,00000	0,23372	0,815200	0,23372	0,815200	9	13
alfa	101,0000	152,0000	56,00000	-0,16695	0,867413	-0,16695	0,867413	9	13

variable	Rank Sum Zeleni vir	Rank Sum GK	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Zeleni vir	Valid N GK
dcll	83,0000	107,0000	29,00000	1,09870	0,271900	1,09870	0,271900	7	12
dclf	90,0000	100,0000	22,00000	1,69031	0,090970	1,69031	0,090970	7	12
dcpl	76,0000	134,0000	43,00000	0,19811	0,842961	0,19811	0,842961	7	13
dclw	57,0000	133,0000	29,00000	-1,09870	0,271900	-1,09870	0,271900	7	12
dclh	76,0000	114,0000	36,00000	0,50709	0,612090	0,50709	0,612090	7	12
lcll	77,0000	133,0000	42,00000	0,27735	0,781511	0,27735	0,781511	7	13
lclf	97,0000	113,0000	22,00000	1,86221	0,062575	1,86221	0,062575	7	13
lcpl	60,0000	150,0000	32,00000	-1,06978	0,284720	-1,06978	0,284720	7	13
lclw	50,0000	160,0000	22,00000	-1,86221	0,062575	-1,86221	0,062575	7	13
lclh	63,0000	147,0000	35,00000	-0,83205	0,405381	-0,83205	0,405381	7	13
dcef	59,0000	151,0000	31,00000	-1,14902	0,250548	-1,14902	0,250548	7	13
lcef	63,0000	147,0000	35,00000	-0,83205	0,405381	-0,83205	0,405381	7	13
rol	117,0000	93,0000	2,00000	3,44707	0,000567	3,44707	0,000567	7	13
apex	75,0000	135,0000	44,00000	0,11886	0,905383	0,11886	0,905383	7	13
row	78,0000	132,0000	41,00000	0,35659	0,721397	0,35659	0,721397	7	13
hew	52,0000	158,0000	24,00000	-1,70372	0,088434	-1,70372	0,088434	7	13
cgw	66,0000	144,0000	38,00000	-0,59432	0,552297	-0,59432	0,552297	7	13
cpw	64,00000	146,0000	36,00000	-0,75281	0,451566	-0,75281	0,451566	7	13
hel	63,00000	147,0000	35,00000	-0,83205	0,405381	-0,83205	0,405381	7	13
arl	84,00000	126,0000	35,00000	0,83205	0,405381	0,83205	0,405381	7	13
arw	62,00000	148,0000	34,00000	-0,91129	0,362142	-0,91129	0,362142	7	13
cph	87,00000	123,0000	32,00000	1,06978	0,284720	1,06978	0,284720	7	13
cew	58,00000	152,0000	30,00000	-1,22826	0,219349	-1,22826	0,219349	7	13
abw	60,00000	150,0000	32,00000	-1,06978	0,284720	-1,06978	0,284720	7	13
abl	41,00000	169,0000	13,00000	-2,57539	0,010013	-2,57539	0,010013	7	13
abh	89,00000	121,0000	30,00000	1,22826	0,219349	1,22826	0,219349	7	13
tel	65,00000	145,0000	37,00000	-0,67356	0,500589	-0,67356	0,500589	7	13
tew	49,00000	161,0000	21,00000	-1,94145	0,052205	-1,94145	0,052205	7	13
tl	64,00000	146,0000	36,00000	-0,75281	0,451566	-0,75281	0,451566	7	13
alfa	84,00000	126,0000	35,00000	0,83205	0,405381	0,83205	0,405381	7	13

b)

variable	Rank Sum ŽBP	Rank Sum GK	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N ŽBP	Valid N GK
dcll	114,0000	117,0000	51,00000	0,28167	0,778196	0,28167	0,778196	10	11
dclf	121,0000	110,0000	44,00000	0,77460	0,438579	0,77460	0,438579	10	11
dcpl	106,0000	102,0000	47,00000	0,22678	0,820596	0,22678	0,820596	10	10
dclw	93,0000	138,0000	38,00000	-1,19710	0,231267	-1,19710	0,231267	10	11
dclh	97,0000	134,0000	42,00000	-0,91543	0,359965	-0,91543	0,359965	10	11
lcll	110,0000	121,0000	55,00000	0,00000	1,000000	0,00000	1,000000	10	11
lclf	125,0000	106,0000	40,00000	1,05627	0,290847	1,05627	0,290847	10	11
lcpl	81,0000	150,0000	26,00000	-2,04212	0,041141	-2,04212	0,041141	10	11
lclw	88,0000	143,0000	33,00000	-1,54919	0,121336	-1,54919	0,121336	10	11
lclh	84,0000	147,0000	29,00000	-1,83086	0,067122	-1,83086	0,067122	10	11
dcef	75,0000	156,0000	20,00000	-2,46463	0,013716	-2,46463	0,013716	10	11
lcef	72,0000	159,0000	17,00000	-2,67588	0,007454	-2,67588	0,007454	10	11
rol	125,0000	106,0000	40,00000	1,05627	0,290847	1,05627	0,290847	10	11
apex	75,0000	156,0000	20,00000	-2,46463	0,013716	-2,46463	0,013716	10	11
row	125,0000	106,0000	40,00000	1,05627	0,290847	1,05627	0,290847	10	11
hew	92,0000	139,0000	37,00000	-1,26752	0,204970	-1,26752	0,204970	10	11
cgw	79,0000	152,0000	24,00000	-2,18295	0,029040	-2,18295	0,029040	10	11
cpw	75,0000	156,0000	20,00000	-2,46463	0,013716	-2,46463	0,013716	10	11
hel	134,0000	97,0000	31,00000	1,69003	0,091023	1,69003	0,091023	10	11
arl	86,0000	145,0000	31,00000	-1,69003	0,091023	-1,69003	0,091023	10	11
arw	92,0000	139,0000	37,00000	-1,26752	0,204970	-1,26752	0,204970	10	11
cph	122,0000	109,0000	43,00000	0,84501	0,398103	0,84501	0,398103	10	11
cew	90,0000	141,0000	35,00000	-1,40836	0,159026	-1,40836	0,159026	10	11
abw	89,0000	142,0000	34,00000	-1,47878	0,139201	-1,47878	0,139201	10	11
abl	83,0000	148,0000	28,00000	-1,90128	0,057266	-1,90128	0,057266	10	11
abh	88,0000	143,0000	33,00000	-1,54919	0,121336	-1,54919	0,121336	10	11
tel	97,0000	134,0000	42,00000	-0,91543	0,359965	-0,91543	0,359965	10	11
tew	85,0000	146,0000	30,00000	-1,76045	0,078333	-1,76045	0,078333	10	11
tl	87,0000	144,0000	32,00000	-1,61961	0,105317	-1,61961	0,105317	10	11
alfa	139,0000	92,0000	26,00000	2,04212	0,041141	2,04212	0,041141	10	11

PRILOG IV. Spearmanov koeficijent korelacije za merističke značajke. Crveno označene vrijednosti su statistički značajne ($p < 0,05$). (Značenje kratica za opis položaja trnova na trećem maksilipedu dan je u tablici 9.)

	telztrnciL	telztrnciD	scafDtrn	ScafDkvrgr	scafLtrn	scafLkvrgr	MLVD	MLVC	MLVU	MDVD	MDVC	MDVU
telztrnciL	1,000000	0,605407	0,458831	-0,361420	0,398732	0,035015	-0,280945	-0,55328	-0,478301	-0,07476	0,50191	-0,264920
telztrnciD	0,605407	1,000000	0,361950	-0,210290	0,299927	0,028651	-0,444797	-0,55328	-0,452915	0,02613	0,35754	-0,358046
scafDtrn	0,458831	0,361950	1,000000		0,925677	0,000000	0,029507	-0,18787	-0,460159	-0,12360	0,51143	-0,429356
ScafDkvrgr	-0,361420	-0,210290		1,000000	0,590909	0,562937	-0,074078	0,00000	-0,866025	-0,15132		-0,500000
scafLtrn	0,398732	0,299927	0,925677	0,590909	1,000000		0,128506	-0,89222	-0,514013	-0,03682	0,72826	-0,581418
scafLkvrgr	0,035015	0,028651	0,000000	0,562937		1,000000	-0,056541	0,57735	-0,632456	0,03976	0,61237	-0,461538
MLVD	-0,280945	-0,444797	0,029507	-0,074078	0,128506	-0,056541	1,000000			0,72586	0,12910	
MLVC	-0,553283	-0,553283	-0,187867	0,000000	-0,892218	0,577350		1,00000		-1,00000	-1,00000	
MLVU	-0,478301	-0,452915	-0,460159	-0,866025	-0,514013	-0,632456			1,000000	1,00000		0,884582
MDVD	-0,074756	0,026132	-0,123600	-0,151319	-0,036821	0,039757	0,725863	-1,00000	1,000000	1,00000		
MDVC	0,501910	0,357540	0,511428		0,728261	0,612372	0,129099	-1,00000			1,00000	
MDVU	-0,264920	-0,358046	-0,429356	-0,500000	-0,581418	-0,461538			0,884582			1,000000

* MLVP i MDVP isključeni su iz analize obzirom da je zabilježen samo jedan slučaj kod jedne ženke (MLVP) i jedan kod jednog mužjaka (MDVP)