

Analiza kariotipa slatkovodnih rakova *Astacus astacus*, *A. leptodactylus* i *Austropotamobius torrentium* (Decapoda, Astacidae)

Mužić, Margerita

Master's thesis / Diplomski rad

2013

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:217:607063>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-24**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Margerita Mužić

**Analiza kariotipa slatkovodnih rakova *Astacus astacus*,
A. leptodactylus i *Austropotamobius torrentium*
(*Decapoda, Astacidae*)**

Diplomski rad

Zagreb, 2013.

*Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za molekularnu biologiju
Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
pod voditeljstvom red. prof. dr.sc. Mirjane Pavlica i
pomoćnim voditeljstvom dr.sc. Jelene Mlinarec Novosel,
radi stjecanja zvanja profesor biologije i kemije.*

ZAHVALA

Najveću zahvalu upućujem pomoćnoj mentorici dr.sc. Jeleni Mlinarec Novosel i mentorici prof. dr. sc. Mirjani Pavlica na stručnom vodstvu, savjetima, pomoći i velikom razumijevanju tijekom izrade diplomskog rada.

Također na pomoći i stručnim savjetima zahvaljujem i prof. dr. sc. Ivani Maguire, te dr.sc. Maji Šrut.

Nadalje, nema dovoljno riječi kojima bih mogla zahvaliti svojoj obitelji. Pružili su mi nemjerljivu pomoć, podršku, strpljenje, razumijevanje i prije svega ljubav. Mama, tata, Kiki – hvala vam!

Velika hvala Jasmini na nesebičnoj pomoći koju mi je pružila tijekom pisanja diplomskog rada. Njeni savjeti i podrška bili su mi od neizmjernog značaja.

Toni, hvala ti na ljubavi i razumijevanju!

Također, hvala Sanji, Ivi, Lidiji, Mariji, i Valnei na savjetima tijekom izrade i pisanja diplomskog rada, ali prije svega na njihovom prijateljstvu.

Gordanu zahvaljujem na pomoći s tehničkim pitanjima i teti Zarji na strpljenju i podršci.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Analiza kariotipa slatkovodnih rakova *Astacus astacus*, *A. leptodactylus* i *Austropotamobius torrentium* (Decapoda, Astacidae)

Margerita Mužić

Horvatovac 102a, Zagreb

Ovaj rad donosi nove informacije o kariološkim značajkama autohtonih europskih vrsta slatkovodnih rakova iz rodova *Astacus* i *Austropotamobius* (Decapoda, Astacidae). Vrsta *Astacus astacus* ima diploidan broj kromosoma $2n=176$, vrsta *A. leptodactylus* ima $2n=180$, a vrsta *Austropotamobius torrentium* ima $2n=164$. Formula kariotipa za vrstu *A. astacus* je $n=88$, $52m+35sm+1a$, a za vrstu *A. torrentium* formula kariotipa je $n=87$, $78m+8sm+1t$. Fluorescencijsko pruganje bojom 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) pokazalo je da vrste roda *Astacus* posjeduju velike heterokromatinske blokove smještene centromerno na svim kromosomima, dok vrsta *A. torrentium* samo na nekim kromosomima. Interkalarni heterokromatinski blokovi nađeni su na nekim kromosomima u sve tri vrste. U vrstama *A. astacus* i *A. leptodactylus* sparivanje kromosoma u mejozi je pravilno, a većina bivalenata su kružnog i zvonolikog oblika. Fluorescencijska hibridizacija *in situ* (FISH) otkrila je da vrste *A. astacus* i *A. leptodactylus* imaju po dva lokusa za 45S rRNA. U vrsti *A. leptodactylus* uočen je dodatni 45S rDNA signal.

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici PMF-a, Marulićev trg 20/2, Zagreb

Rad sadrži: 54 stranice, 18 slika, 2 tablice, 93 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: *Astacus*, *Austropotamobius*, Decapoda, Astacidae, FISH, kariotip, DAPI

Mentor: Dr. sc. Mirjana Pavlica, red. prof.

Pomoćni mentor: Dr. sc. Jelena Mlinarec Novosel, zn. sur.

Ocjenjivači: Dr.sc. Dubravka Matković-Čalogović, red. prof.

Dr. sc. Ines Radanović, izv. prof.

Zamjena: Dr. sc. Biserka Prugovečki, izv. prof.

Rad prihvaćen: rujan, 2013.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Karyological analysis of freshwater crayfish *Astacus astacus*, *A. leptodactylus* and *Austropotamobius torrentium* (Decapoda, Astacidae)

Margerita Mužić

Horvatovac 102a, Zagreb

This study gives karyological information on native European species *Astacus astacus*, *A. leptodactylus* and *Austropotamobius torrentium* (Decapoda, Astacidae). *Astacus astacus* has a diploid chromosome number $2n=176$, species *A. leptodactylus* has $2n=180$ and species *Austropotamobius torrentium* has $2n=174$ chromosomes. Karyotype formula of *A. astacus* is $n=88, 52m+35sm+1a$, while for *A. torrentium* the formula is $n=87, 78m+8sm+1t$. Fluorescence banding with 4,6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) has shown long heterochromatic blocks in centromeric regions of all chromosomes in *Astacus* species, and on some chromosomes in species *A. torrentium*. Interstitial blocks are found in some chromosomes of all three species. Meiotic pairing of chromosomes is regular in *A. astacus* i *A. leptodactylus*, and most of bivalents are in ring and dumbbell form. Furthermore, fluorescence *in situ* hybridization (FISH) reveals two 45S rDNA loci in both *A. astacus* and *A. leptodactylus*. An additional 45S rDNA signal was found in *A. leptodactylus*.

Thesis is deposited in the Central Biological Library

Thesis includes: 54 pages, 18 figures, 2 tables, 93 references, original in: Croatian

Key Words: *Astacus*, *Austropotamobius*, *Decapoda*, *Astacidae*, FISH, karyotype, DAPI

Supervisor: Dr. Mirjana Pavlica, Prof.

Assistant supervisor: Dr. Jelena Mlinarec Novosel, research fellow

Reviewers: Dr. Dubravka Matković-Čalogović, Prof.

Dr. Ines Radanović, Prof.

Substitution: Dr. Biserka Prugovečki, Prof.

Thesis accepted: September, 2013.

POPIS KRATICA:

DAPI – fluorescencijska boja 4,6-diamidino-2-fenilindol

dUTP – deoksiuridin trifosfat

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

FISH – fluorescencijska hibridizacija *in situ*

FITC – fluorescein izotiocijanat

RNA – ribonukleinska kiselina

SDS – natrijev dodecilsulfat (eng. sodium dodecyl sulphate)

SSC – smjesa 15 mM natrijeva citrata i 150 mM natrijeva klorida (eng. saline sodium citrate)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Taksonomska klasifikacija i srodstveni odnosi istraživanih vrsta	1
1.2. Geografska rasprostranjenost istraživanih vrsta.....	5
1.3. Ugroženost i zaštita istraživanih vrsti	8
1.4. Ekološke i morfološke značajke istraživanih vrsta	9
1.5. Značajke eukariotskih kromosoma.....	17
1.6. Dosadašnje spoznaje o kromosomima istraživanih vrsta.....	23
2. CILJEVI.....	24
3. MATERIJAL I METODE	25
3.1. Materijal	25
3.2. Metode.....	26
3.2.1. Preparacija tkiva	26
3.2.2. Izrada preparata	27
3.2.3. Bojenje.....	27
3.2.4. Fluorescencijska hibridizacija <i>in situ</i> (FISH)	27
3.2.5. Vizualna obrada preparata i analiza podataka	27
3.2.6. Izrada kariograma	28
4. REZULTATI.....	29
4.1. Broj kromosoma i struktura kariotipa	29
4.2. Ponašanje kromosoma u mejozi.....	35
4.3. Položaj heterokromatinskih pruga na kromosomima vrsta <i>Astacus astacus</i> , <i>A. leptodactylus</i> i <i>Austropotamobius torrentium</i>	35
4.4. Broj i položaj lokusa za 45S rRNA na kromosomima vrsta <i>Astacus astacus</i> , <i>A. leptodactylus</i> i <i>Austropotamobius torrentium</i>	38
5. RASPRAVA	41
6. ZAKLJUČAK.....	45
7. LITERATURA	46

1. UVOD

1.1. Taksonomska klasifikacija i srodstveni odnosi istraživanih vrsta

Broj opisanih vrsta rakova (*Crustacea*) procjenjuje se na oko 52 000 (Land, 1996 i Monod i Laubier, 1996 prema Martin i Davis, 2001). Navedena činjenica smješta *Crustaceae* Brünnich, 1772. uz kukce, mekušce i kliještare u sam vrh po brojnosti vrsta u životinjskom svijetu (Martin i Davis, 2001). Navedenoj skupini većim dijelom pripadaju morske vrste. Među slatkovodne skupine ubraja se i oko 650 vrsta infrareda *Astacidea* Latreille, 1802. (De Grave i sur., 2009). Tri vrste slatkovodnih rakova *Astacus astacus* (Linnaeus, 1758), *A. leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) i *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803), predmet su ovog istraživanja. Predmetne vrste pripadaju porodici *Astacidae* Latreille, 1802. infrareda *Astacidea*.

Unutar znanstvene zajednice najšire prihvaćenu klasifikaciju rakova dali su Martin i Davis (2001). Rad Martina i Davisa izumrlim taksonima su dopunili De Grave i sur. (2009). U nastavku se prikazuje dio klasifikacije koji je vezan za istraživane vrste prema De Grave i sur. (2009). Izumrle skupine i vrste označene su znakom ††, plavom bojom rodovi obrađeni u ovom radu, a zelenom rodovi kojima pripadaju vrste unesene na europska staništa.

Domena: *Eukaryota* Whittaker & Margulis, 1978.

Carstvo: *Animalia* Linnaeus, 1758.

Podcarstvo: *Eumetazoa* Butschli, 1910.

Koljeno: *Arthropoda* Latreille, 1829.

Potkoljeno: *Crustacea* Brünnich, 1772.

Razred: *Malacostraca* Latreille, 1802.

Podrazred: *Eumalacostraca* Grobben, 1892.

Nadred: *Eucarida* Calman, 1904.

Red: *Decapoda* Latreille, 1802.

Podred: *Pleocyemata* Burkenroad, 1963.

Infrared: *Astacidea* Latreille, 1802.

Natporodica: *Astacoidea* Latreille, 1802.

Porodica: *Astacidae* Latreille, 1802.

Rod: *Astacus* Fabricius, 1775.

Austropotamobius Skorikov, 1907.

Pacifastacus Bott, 1950.

Porodica: *Cambaridae* Hobbs, 1942.

Rod: *Barbicambarus* Hobbs, 1969.

Bouchardina Hobbs, 1977.

Cambarellus Ortmann, 1905.

Cambaroides Faxon, 1884.

Cambarus Erichson, 1846.

Distocambarus Hobbs, 1981.

Fallicambarus Hobbs, 1969.

Faxonella Creaser, 1933.

Hobbseus Fitzpatrick i Payne, 1968.

Orconectes Cope, 1872.

Palaeocambarus †† Taylor, Schram i Shen, 1999.

Procambarus Ortmann, 1905.

Troglocambarus Hobbs, 1942.

Porodica: *Cricoidoscelosidae* †† Taylor, Schram i Shen, 1999.

Rod: *Cricoidoscelosus* †† Taylor, Schram i Shen, 1999.

Natporodica: *Parastacoidea* Huxley, 1979.

Porodica: *Parastacidae* Huxley, 1979.

Rod: *Astacopsis* Huxley, 1879.

Astacoides Guérin-Méneville, 1839.

Cherax Erichson, 1846.

Engaeus Erichson, 1846.

Engaewa Riek, 1967.

Euastacus E. M. Clark, 1936.

Geocharax E. M. Clark, 1936.
Gramastacus Riek, 1972.
Lammuastacus †† Aguirre-Urreta, 1992.
Omrastacoides Hansen i Richardson, 2006.
Palaeoechinastacus †† A. J. Martin, Rich, Poore, Schultz, Austin,
Kool i Vickers-Rich, 2008.
Paranephrops White, 1842.
Parastacus Huxley, 1879.
Samastacus Riek, 1971.
Spinastacoides Hansen i Richardson, 2006.
Tenuibranchiurus Riek, 1951.
Virilastacus Hobbs, 1991.

Prema prikazanoj sistematskoj podjeli u infrared *Astacidea* ubrajaju se dvije nadporodice *Astacoidea* i *Parastacoidea* Huxley, 1979. Također, vidljivo je da su istraživane vrste smještene u porodicu *Astacidea* natporodice *Astacoidea*.

Težnja znanstvenika je da taksonomska klasifikacija odražava evolucijski razvoj i filogenetske odnose među organizmima. Međutim, točne filogenetske odnose najčešće je vrlo teško sa sigurnošću utvrditi. Morfološke analize koje su još uvijek glavno uporište sistematičkih studija često mogu navesti na pogrešne zaključke zbog plastičnosti i konvergentnosti morfoloških osobina (Fetzner i Crandall, 2002). Razvoj različitih metoda molekularne biologije u prošlom stoljeću omogućio je znanstvenicima nove mogućnosti za rješavanje često vrlo zamršenih pitanja s područja evolucije i srodstvenih odnosa među različitim skupinama i vrstama.

U nastavku se razmatraju filogenetski odnosi unutar infrareda *Astacidea* uz poseban osvrt na one taksone koje su predmet istraživanja. Prema dostupnim podacima proizlazi da većina autora infrared *Astacidea* sagledava kao monofiletsku skupinu (Crandall i sur., 2000; De Grave i sur., 2009; Martin i Davis, 2001; Scholtz, 2002; Sinclair i sur., 2004). Prema tome pristupu slatkovodne natporodice *Astacoidea* i *Parastacoidea* monofiletskog su podrijetla i sestrinske su morskoj natporodici *Nephropoidea*. U natporodicu *Astacoidea* ubrajaju se porodice *Astacidae* i *Cambaridae* Hobbs, 1942. koje se također općenito smatra monofiletskim (Martin i Davis, 2001;

De Grave i sur., 2009). Ipak, Sinclair i sur. (2004) napominju kako nema dovoljno podataka da bi se to sa sigurnošću moglo utvrditi, a Crandall i sur. (2000) iznose rezultate koji bi mogli ukazivati na parafiletičnost obje skupine. Naime, prema spomenutom istraživanju upitan je položaj roda *Cambaroides* Faxon, 1884. Oko klasifikacije i filogenetskih odnosa na razini rodova pak ne postoji tako širok konsenzus kao na višim razinama. Više je studija objavljeno na temu odnosa unutar porodice *Astacidae*. U tablici 1. navedene su najzapaženije studije te klasifikacijska rješenja koja predlažu.

Tablica 1. Neke taksonomske studije na europskim članovima unutar porodice *Astacidae* (Izvor: Šmietana i sur. 2006)

Autori	Rod	Podrod	Broj vrsta	Kriteriji
Bott (1950, 1972)	<i>Astacus</i>	<i>Astacus</i>	2	Filogenija, morfologija, zoogeografija
	<i>Austropotamobius</i>	<i>Pontastacus</i>	4	
		<i>Austropotamobius</i>	1	
		<i>Atlantoastacus</i>	2	
Karaman (1963) Karaman (1962)	<i>Astacus</i>	<i>Astacus</i>	1	Filogenija, morfologija, zoogeografija
	<i>Austropotamobius</i>	<i>Pontastacus</i>	3	
			3	
Albrecht i Hagen (1981), Albrecht (1982, 1983)	<i>Astacus</i>		5	Filogenija, morfologija, zoogeografija, biokemija
Brodsky (1983)	<i>Astacus</i>	<i>Astacus</i>	2	Filogenija, morfologija, zoogeografija
	<i>Pontastacus</i>	<i>Atlantastacus</i>	6	
	<i>Austropotamobius</i>		1	
Starobogatov (1995)	<i>Astacus</i>		3	Filogenija, morfologija, zoogeografija
	<i>Caspiastacus</i>		2	
	<i>Pontastacus</i>		9	
	<i>Austropotamobius</i>		1	
	<i>Atlantoastacus</i>		4	
Taylor (2002)	<i>Astacus</i>		3	Analiza literature
	<i>Austropotamobius</i>		2	
Šmietana i sur. (2006)	<i>Astacus</i> <i>Pontastacus</i> <i>Austropotamobius</i>		Bez detalja	Morfologija, zoogeografija, analiza literature

Iz prikazane tablice može se uočiti kako je ponuđen veliki broj različitih rješenja vezan uz sistematiku porodice *Astacidae*. Martin i Davis (2001) su se u svojoj klasifikaciji priklonili

mišljenju da u porodicu *Astacidae* valja ubrojiti tri roda: *Astacus*, *Austropotamobius* i *Pacifastacus*. U rod *Astacus* ubrajaju tri vrste: *A. astacus*, *A. leptodactylus* i *A. pachypus* (Rathke, 1873), a u rod *Austropotamobius* dvije vrste: *A. torrentium* i *A. pallipes* (Lereboullet, 1858). Kao ni broj rodova, niti broj vrsta ove porodice nije usuglašen. Čini se da je najsigurniji status vrste *A. astacus*. Naime, u dostupnoj literaturi (Crandall i sur., 2000; De Grave i sur., 2009; Martin i Davis, 2001; Scholtz, 2002; Sinclair i sur., 2004; Šmietana i sur., 2006) nisu pronađeni podaci o mogućim razmimoilaženjima u stajalištima vezanim za filogenetsko podrijetlo vrste *A. astacus*. Najviše se pitanja javlja o vrsti *A. leptodactylus* pa je ovaj takson za sad preporučljivo smatrati kompleksom. Primjerice Šmietana i sur. (2006) smatraju kako bi vrstu *A. leptodactylus* trebalo smjestiti u zaseban rod *Pontastacus* (Tablica 1) što temelje na iscrpnoj analizi literaturnih podataka. *A. leptodactylus* je naime vrlo plastična vrsta s morfološkog, ekološkog i fiziološkog stajališta pa određene valjane argumente imaju i autori koji se zalažu za izdvajanje roda *Pontastacus* (Brodsky 1983, Karaman 1962, Karaman 1963, Starobogatov 1995 prema Šmietana i sur., 2006) kao i autori koji nisu skloni takvom rješenju (Holdich, 2002; Martin i Davis, 2001; Scholtz, 2002) dok se ne provedu dodatna istraživanja. Kod vrste *A. torrentium* nema značajnih neslaganja među filogenetičarima. Međutim, Trontelj i sur. (2004) utvrdili su značajnu haplotipsku različitost, kako morfolološku tako i genetičku, jedinki spomenute vrste s područja gornjeg toka Kupe. Rezultati njihovog istraživanja navode na zaključak kako bi se ta skupina mogla čak smatrati zasebnom vrstom. No, ipak naglašavaju nužnost dodatnih istraživanja koja bi potvrdila ili opovrgnula njihove rezultate.

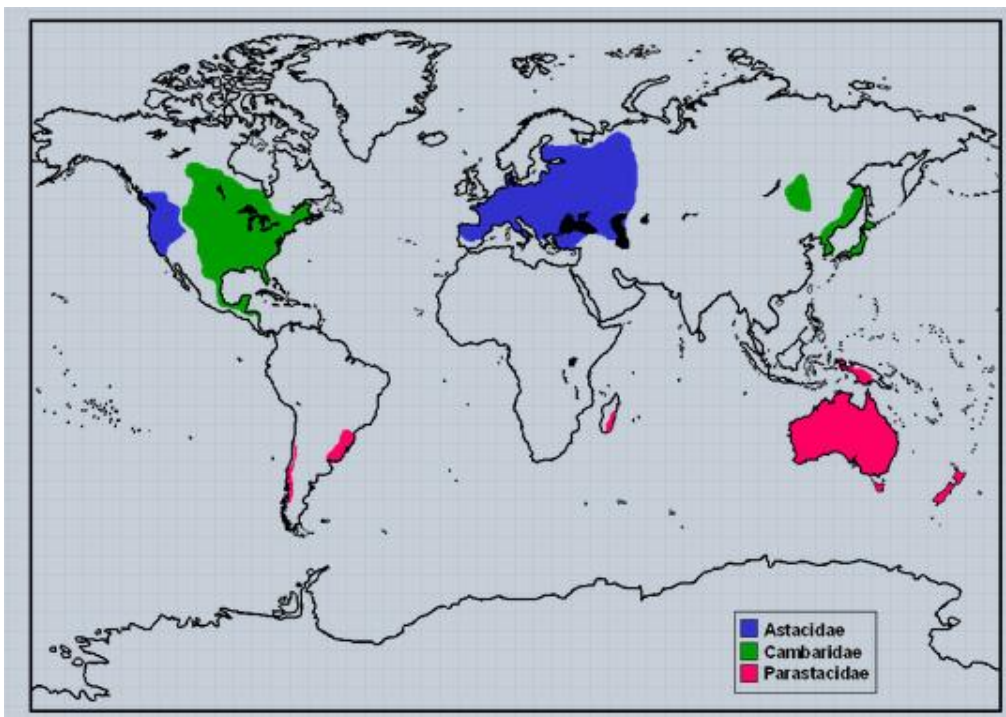
Filogenetski odnosi među razmatranim taksonima kompleksno su područje. Iz prethodne razrade jasno je kako postoje još mnoge otvorene teme te su potrebna dodatna istraživanja koja će pridonijeti boljem poznavanju filogenetskih odnosa među obrađenim taksonima.

1.2. Geografska rasprostranjenost istraživanih vrsta

Predstavnici infrareda *Astacidea* su dosad nađeni gotovo na svim kontinentima. Nisu zabilježeni na Antarktiku te što je još zanimljivije niti u Africi (izuzev Madagaskara) (Taylor, 2002). Centri rasprostranjenosti ovog infrareda su u jugoistočnom djelu Sjeverne Amerike te u australskoj državi Victoriji (Crandall i Buhay, 2008). Zanimljiva je geografska rasprostranjenost nadporodica ovoga infrareda. Naime, *Parastacoidea* su rasprostranjene samo na južnoj polutki

(Madagaskar, Južna Amerika i Australija), dok *Astacoidea* obitavaju na sjevernoj polutki (Hobbs, 1988, prema Crandall i sur., 2000; Taylor, 2002). Ovakva se rasprostranjenost može objasniti ukoliko razvoj ove skupine dovedemo u kontekst geološkog razvoja Zemlje.

Crustacea su vrlo stara skupina organizama. Najstariji fosilni nalazi rakova su još iz doba kambrija (Martin i Davis, 2001) iako se u većem broju pojavljuju tek u karbonu. Osim *Eucarida*, sve se ostale velike skupine rakova pojavljuju do karbona. Prvi *Eucarida* se pojavljuju u devonu, no tek u juri vidimo značajan razvoj novih vrsta ove skupine, osobito reda *Decapoda*. Što se pak tiče *Astacidea*, dokazi upućuju na hipotezu da je posljednji zajednički predak svih današnjih *Astacidea* nastanjivao slatkovodna staništa. Ukoliko je to točno, možemo zaključiti da je taj zajednički predak postojao barem već u trijasu, prije jurskog razdvajanja prakontinenta Pangeje na južni kontinent Gondwanu i sjeverni kontinent Lavraziju. Mnogi paleontološki dokazi u skladu su s ovom hipotezom (Scholtz, 2002). Kao posljedica navedenoga evolucijski razvoj tada geografski odvojenih skupina kreće u različitim smjerovima, što može objasniti današnju rasprostranjenost dviju nadporodica *Parastacoidea* i *Astacoidea*. Najvjerojatnije objašnjenje zbog čega na afričkom kontinentu nisu pronađeni predstavnici infrareda *Astacidea* također se oslanja na spoznaje o geološkoj prošlosti Zemlje. Iako postoje i druge teorije, najviše dokaza upućuje na zaključak kako se *Astacidea* uopće nisu proširili afričkim kontinentom prije njena odvajanja od zajedničkog južnog kontinenta Gondwane (Scholtz, 2002). Također se u literaturi može pronaći čitav niz objašnjenja za današnju geografsku rasprostranjenost porodica *Astacidae* i *Cambaridae*. Najvjerojatnija hipoteza uključuje razdvajanje Lavrazije na kontinente i kasnija ledena doba kao ključne čimbenike (Scholtz, 2002). Sve vrste koje danas prirodno nastanjuju Europu ubrajaju se u porodicu *Astacidae*, dok porodica *Cambaridae* prirodno nastanjuje Sjevernu Ameriku i istok Azije (slika 1) (Crandall i sur., 2000; Taylor, 2002).



Slika 1. Geografska rasprostranjenost porodica *Astacidae*, *Cambaridae* i *Parastacidae* (Fetzner, 2010).

Za sad se smatra da prirodno europska slatkovodna staništa nastanjuju vrste *A. astacus*, *A. leptodactylus*, *A. pahypus*, *A. torrentium* i *A. pallipes* (Holdich i sur., 2009; Maguire i Gottstein-Matočec, 2004). Broj europskih autohtonih vrsta *Astacidae* je još uvijek predmet rasprave među stručnjacima zbog nerazriješenih filogenetskih odnosa unutar nekih taksona, točnije *A. leptodactylus* (Šmietana i sur., 2006) i *A. pallipes* (Trontelj i sur. 2004; Gottstein i sur., 1999). Osim autohtonih vrsta slatkovodnih rakova na području Europe danas obitava i nekoliko alohtonih vrsta. U najvećoj mjeri su to tri sjevernoameričke vrste *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) iz porodice *Astacidae*, *Oronectes limosus* (Rafinesque, 1817), *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) iz porodice *Cambaridae*, te neke vrste roda *Cerax* koji autohtono pripada australskim staništima (Füreder i Machino, 2002; Maguire i Gottstein-Matočec, 2004). O problematici vezanoj za prisutnost alohtonih vrsta *Astacidea* u Europi govori se u odjeljku o ugroženosti i zaštiti domicilnih rakova. U Republici Hrvatskoj je dosadašnjim istraživanjima utvrđena prisutnost četiri od pet ranije navedenih autohtonih rakova (nije pronađen *A. pahypus*)

(Maguire i Gottstein Matočec, 2004), te dva alohtona: *P. leniusculus* i *O. limosus* (Hudina i sur., 2009).

1.3. Ugroženost i zaštita istraživanih vrsti

Antropogeni utjecaj na prirodu, kako je poznato, u današnje je vrijeme značajan. Unošenje raznih štetnih tvari u okoliš (posredstvom industrije, poljoprivrede, prometa i sl.), građevinske intervencije u okolišu koje dovode do smanjenja ili fragmentacije staništa, prekomjerni izlov pojedinih vrsta u konzumne svrhe, sve to za posljedicu ima smanjenje populacija mnogih vrsta, a osobito onih uske ekološke niše (Taylor, 2002). Sva novija istraživanja na području Europe pokazuju značajan pad u broju i veličini populacija autohtonih slatkovodnih rakova. Prema Maguire i sur. (2011) populacija *A. astacus* u Republici Hrvatskoj pokazuje smanjenje za čak 36% u odnosu na ranije podatke. Populacija *A. leptodactylus* se prema istom istraživanju prirodno širi prema zapadu i jugu Hrvatske, ali ju s istočnih staništa polako istiskuje alohtona vrsta *O. limosus*. Time dolazimo do zapravo najveće opasnosti za opstanak autohtonih europskih rakova, a to je prisutnost alohtonih vrsta. Strane slatkovodne vrste rakova u europske vodotokove unesene su početkom 19. st. u svrhu iskorištavanja u akvakulturi (Maguire i Gottstein-Matočec, 2004; Taylor, 2002). Međutim, kako to često biva, unos novih vrsta donio je više štete nego koristi. Upravo one značajke koja novo unesene vrste čini pogodnima za uzgoj, njihova prilagodljivost različitim staništima i veliki fekunditet, u ekološkom smislu predstavljaju problem. Naime, vrlo se brzo šire i razmnožavaju te je nemoguće držati rast njihovih populacija pod kontrolom. Osim toga, agresivnije su od domaćih vrsta pa u kompeticiji za hranu i prostor domaće vrste „izvlače deblji kraj“ (Maguire i Gottstein-Matočec, 2004)

Ipak, najveća poteškoća je vjerojatno pojava bolesti račje kuge koja uz neke već ranije prisutne bolesti desetkuje populacije autohtonih rakova diljem Europe. Uzrokuje ju gljivica *Aphanomyces astaci* Schikora, 1906. i za autohtone vrste rakova je smrtonosna. Unesene vrste su na tu bolest otporne, ali su, kako se pokazalo, prenosnici pa se zajedno sa alohtonim rakovima unijela i nova bolest (Maguire i Gottstein-Matočec, 2004; Taylor, 2002).

Ovakvi negativni pokazatelji uputili su na potrebu institucionalne zaštite nekih autohtonih vrsta. U Crvenoj knjizi ugroženih svojiti ugroženost vrsta *A. astacus*, *A. leptodactylus* i *A. torrentium* procijenjena je sa: osjetljiva vrsta (VU) za *A. astacus*, najmanja zabrinutost (LC) za

A. leptodactylus i nedovoljno podataka (DD) za *A. torrentium*. *A. astacus* i *A. torrentium* nalaze se u Dodatku III Konvencije o zaštiti europskih divljih vrsta i prirodnih staništa (Bernska konvencija, 2002). Europska direktiva o zaštiti prirodnih staništa i divlje faune i flore (2007) Dodatkom II štiti *A. torrentium*, a Dodatkom V i *A. astacus* i *A. torrentium*. U Republici Hrvatskoj Zakonom o zaštiti prirode (NN 80/13, 2013) Pravilnikom o proglašavanju divljih svojiti zaštićenim i strogo zaštićenim (NN 99/09, 2009) zaštićene su vrste: *A. astacus* i *A. torrentium*.

1.4. Ekološke i morfološke značajke istraživanih vrsta

Vrste porodice *Astacidae* zauzimaju različita staništa. Može ih se naći i u stajaćicama i u brzacima, neke podnose više neke manje eutrofne uvjete, neke nalazimo čak i u bočatim vodama. Temperature koje različite vrste podnose također se razlikuju. Jedini zajednički uvjet svim vrstama je mogućnost da pronađu ili sami sebi iskopaju povoljan zaklon (Maguire i Gottstein-Matočec, 2004; Taylor, 2002). Rakovi su uglavnom noćne životinje iako je kod ponekih vrsta uočena veća dnevna aktivnost u vrijeme parenja (Skurdal i Taugbol, 2002).

Astacidae su važan dio prehrambenog lanca i kao konzumenti, ali i kao plijen (nekim ribama, vidrama, kunama, čapljama, galebovima i sl.). Hrane se vodenom vegetacijom, manjim životinjama i detritusom (Nyström, 2002).

Reprodukcijski ciklus ove porodice rakova uvelike ovisi o uvjetima staništa i klimatskim uvjetima, osobito o temperaturi vode (Reynolds, 2002). Sezona parenja počinje padom temperatura u jesen i obično traje dva do tri tjedna. Oplodnja i izlijeganje jajašaca uslijede od nekoliko sati do čak šest tjedana nakon parenja. Ženka oplodena jajašca nosi među peleopodima do slijedećeg ljeta. Primijećeno je da broj jajašaca ovisi o veličini ženke. Razvoj jajašaca i vrijeme izlijeganja rakova također ovise o temperaturi vode. Nakon izlijeganja, juvenilni rakovi dva do tri dana vise o dršku, a zatim se klijestima pridržavaju za jajnu opnu. Hrane se žumanjkom iz jaja i nekoliko dana ostaju na majci. Nakon prvog presvlačenja počnu se kretati u blizini majke te se postupno osamostaljuju. Životni ciklus se nastavlja kroz periodička presvlačenja. Naime, rakovi imaju tvrd egzoskelet i ne rastu kontinuirano, nego samo u kratkom periodu kada odbace stari skelet, a novi još nisu izgradili. Broj presvlačenja ovisi o okolišnim uvjetima (temperaturi i dostupnosti hrane), u povoljnijim razdobljima se presvlače češće (Rakovi, 2013; Reynolds, 2002).

Iako su rakovi morfološki vrlo raznolika skupina neke osnovne anatomske značajke jednake su za sve skupine pa tako i za porodicu *Astacidae*. Tagmatizacijom tjelesnih kolutića došlo je do specijaliziranja u dvije funkcionalne cjeline: glavopršnjak (cefalopereon ili cefalotoraks) i zadak (pleon). Glavopršnjak je prekriven kožnim naborom ili korom (karapaks) te je kolutićavost prednjeg dijele tijela vidljiva samo prema rasporedu tjelesnih privjesaka redom: oči, antenula, antena, čeljusti, čeljusne nožice (maksilipediji) i noge hodalice (pereopodiji). Zadak nosi plivaće nožice (pleopodiji) te na zadnjem kolutiću (telzon) uropode koji čine repnu peraju. Svi unutrašnji organi, osim trbušne živčane vrpce, leđne arterije i crijeva koji prolaze i kroz zadak, nalaze se u glavopršnjaku. Škrge se nalaze uz bazu tjelesnih privjesaka, a točan raspored varira od vrste do vrste. Raspored škrge u odnosu na tjelesne privjeske naziva se branhijalna formula (Felgenhauer, 1992).

Determinacija vrsta uvelike se oslanja na morfologiju promatrane životinje. Tablica 2 donosi najznačajnije morfološke kriterije za određivanje vrsta proučavanih u ovom radu.

Tablica 2. Morfološke značajke koje se koriste kao kriteriji pri određivanju vrsta infrareda *Astacidea* s posebnim osvrtom na proučavane vrste, *Astacus astacus*, *A. leptodactylus* i *Austropotamobius torrentium* (Prilagođeno prema Fureder i Machino, 2002).

Kriterij \ Vrsta	<i>Astacus astacus</i>	<i>Astacus leptodactylus</i>	<i>Austropotamobius torrentium</i>
vrh rostruma	izražen i dug	dug i vrlo izražen	izrazito kratak
rostralna rebra	paralelno ili trapezoidno položena; glatka	vrlo izražena, paralelno ili trapezoidno položena; nazubljena ili nenazubljena	niska, trokutasto položena i glatka
rostralni trnovi	izraženi	izrazito veliki i šiljati	vrlo mali
rostralna kresta	trnovita	bez trnova	prisutna, ali ponekad jedva primjetna
postorbitalni grebeni	dva para, drugi par ponekad manje vidljiv	dva para, vrlo izražena	jedan par
hepatički trnovi	nema	nekad prisutni, a nekad ne	nema
trnovi iza cervikalne brazde	red sitnih izbočenja, najčešće samo jedan izraženiji trn	izražena trnovitost	nema
talon na 2. pleopodu kod ♂	nema	prisutan	ponekad prisutan, a ponekad ne
izgled abdominalnih pleura	zaobljenih rubova i bez trnova	na vrhovima imaju trn	
izgled kliješta	velika, široka, granulaste površine	uska i dugih prstiju, osobito kod mužjaka	vrlo velika i široka, površina sa vrlo velikim i grubim granulama
udubljenje na unutrašnjem rubu nepokretnog prsta kliješta	postoji i omeđeno je sa dva zuba, kod regeneriranih kliješta izostaje	nema	vrlo izraženo, kod regeneriranih kliješta manje izraženo

Kako je vidljivo iz tablice 2. u morfološkom smislu svaka od proučavanih vrsta ima posebnosti koje ih razlikuju od drugih. Sličan je slučaj i s ekološkim potrebama pojedine vrste te vezano s time njenim oblicima ponašanja. U nastavku se detaljnije razrađuju specifičnosti pojedine istraživane vrste.

Astacus astacus (riječni ili plemeniti rak) rijetko dužinom tijela prijeđe 15 cm iako postoje zabilješke i o nešto dužim jedinkama. Boja tijela je s leđne strane najčešće tamnosmeđa, ali varijacije mogu biti od maslinastozelene, ponekad plavičaste ili crvenkaste do crne (slika 2). Trbušna strana tijela je zeleno-smeđe boje. Karapaks ove vrste je gladak, bez trnova, s malim bradavičastim izbočenjima sa strane (Skurdal i Taugbøl, 2002).



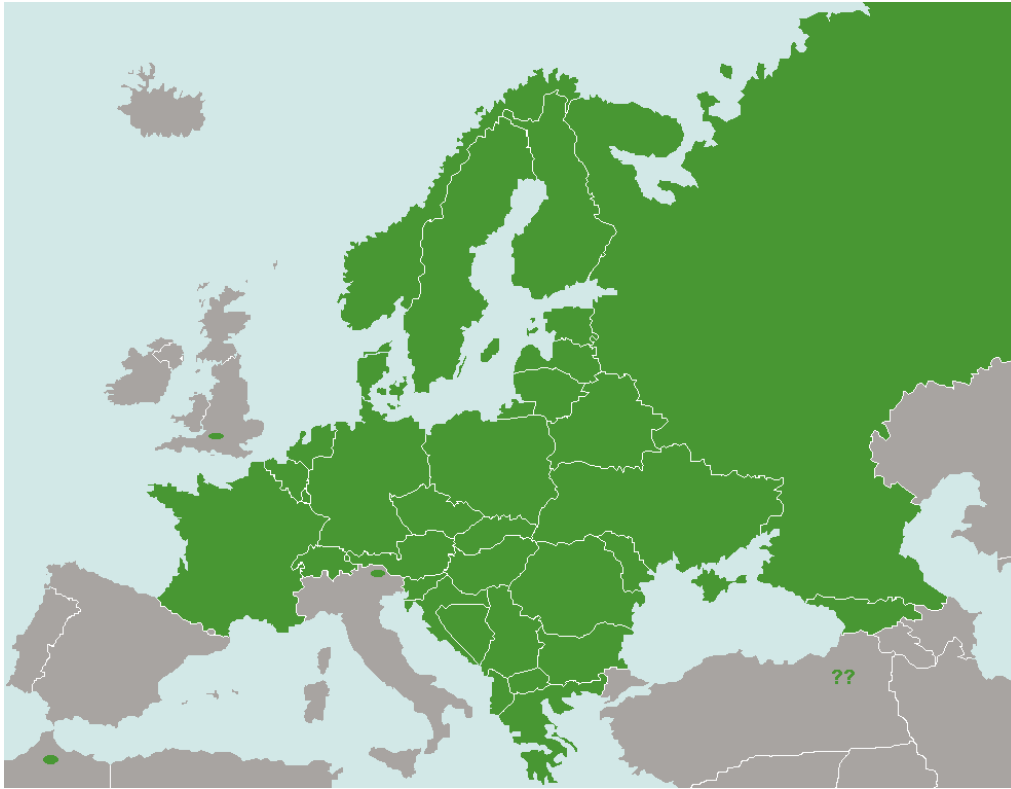
Slika 2. *Astacus astacus* (Rakovi, 2013)

Spolnu zrelost ova vrsta rakova dostigne između treće i pete godine života, odnosno kad im dužina tijela dosegne 6 cm do 8,5 cm. Parenje se odvija u rujnu i listopadu. Juvenilni rakovi su dužine od 8,5 mm do 9 mm. Nakon drugog presvlačenja mladi rakovi započinju samostalan život (Rakovi, 2013). Mužjaci se pare svake godine dok ženke imaju razdoblja reproduktivne neaktivnosti.

A. astacus je noćna životinja. U dobrim uvjetima nisu teritorijalni, određenu agresivnost pokazuju samo kad je prostor ograničavajući čimbenik. Staništa na kojima ih nalazimo su obalna područja čistih rijeka i jezera ilovastog i šljunkovitog dna gdje iskapa jednostavna skloništa. Biraju staništa s puno mogućih zaklona među vodenom vegetacijom, kamenjem i sl. (Skurdal i Taugbøl, 2002). Temperaturni optimum za ovu vrstu je u rasponu od 16 °C do 24 °C. Niski udio

kisika ne podnose, no za razliku od većine drugih vrsta toleriraju nešto niži udio kalcija. *A. astacus* su iznimno osjetljivi na visok udio nitrita u svome okolišu (Edsman i sur., 2013)

Vrsta *A. astacus* se smatra najraširenijom europskom autohtonom vrstom. Nalazimo ga u cijeloj Europi izuzev Iberskog poluotoka (slika 3) (Rakovi, 2013).



Slika 3. Rasprostranjenost *Astacus astacus* u Europi (Holdich, 2002).

Astacus leptodactylus (**uskoškari, turski ili barski rak**) može narasti i do 30 cm, međutim najčešće je dužine do 15 cm. Boja tijela s leđne strane je raznolika, od žutosmeđe do maslinastozelene, a s trbušne strane su svijetle gotovo bijele boje (slika 4). Zamjetna je trnovitost u izgledu *A. leptodactylus* (Skurdal i Taugbøl, 2002).

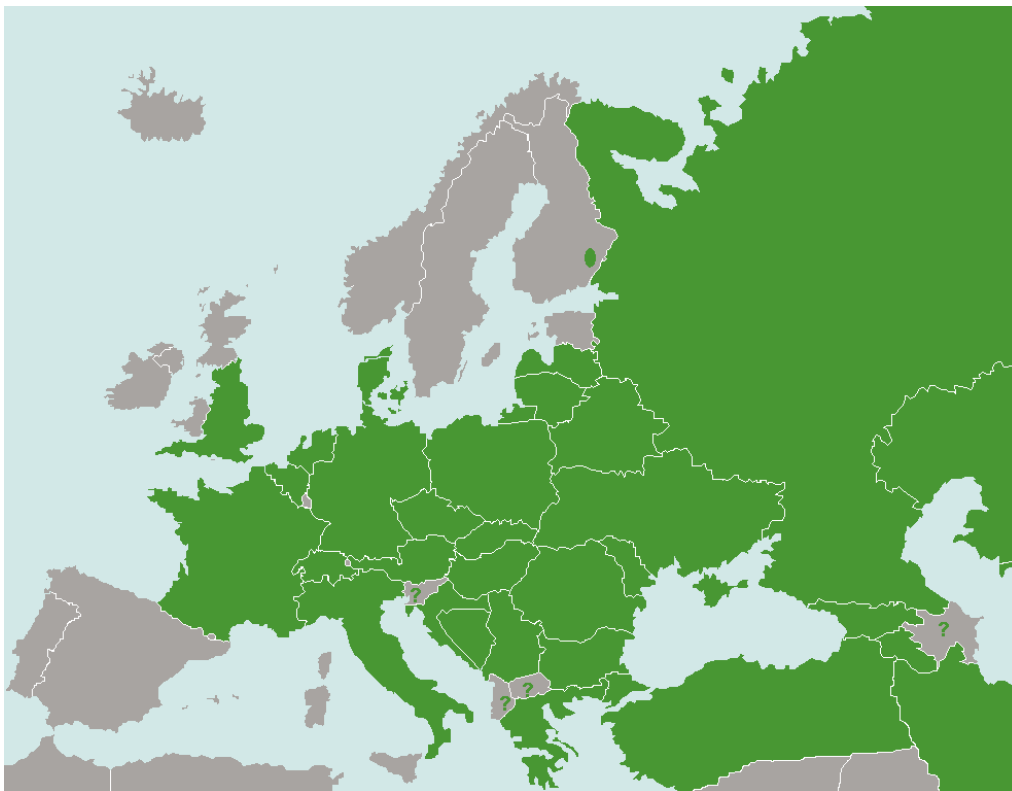


Slika 4. *Astacus leptodactylus* (Fetzner, 2010).

Spolnu zrelost dostižu u trećoj godini (dužine od 7,5 cm do 8,5 cm). Pare se u listopadu i studenom. Juvenilni rakovi nakon izlijeganja ostaju uz ženku do 25 dana. Nakon prvog presvlačenja se osamostale.

A. leptodactylus nastanjuje slatkovodna, ali i bočata staništa, primjerice estuarije i lagune (Skurdal i Taugbøl, 2002). U Europi ih se najčešće nalazi u jezerima, kanalima, močvarama i nizinskim rijekama. Uskoškari rakovi relativno dobro podnose eutrofne uvjete u svom staništu kao što su nizak udio kisika i smanjena prozirnost vode. Također dobro podnose promjene u temperaturi kao i promjene saliniteta (Gherardi i Souty-Grosset, 2013). Zanimljivo je što je kod njih zapažena i veća dnevna aktivnost, a ne isključivo noćna kao kod drugih europskih vrsta porodice *Astacidae* pa je i njihov rast brži u odnosu na druge rakove iz iste porodice. Inače su svejedi, no istraživanja pokazuju da zoobentos gotovo u potpunosti čini njihovu prehranu (Gherardi i Souty-Grosset, 2013).

Vrsta je vrlo širokog rasprostranjenja. Areal *A. leptodactylus* se na istoku prostire do istočne Rusije i Bliskog istoka, a na zapadu duž čitave Europe izuzev Iberskog i Baltičkog poluotoka (Holdich, 2002) (slika 5)



Slika 5. Rasprostranjenost *Astacus leptodactylus* u Europi (Holdich, 2002).

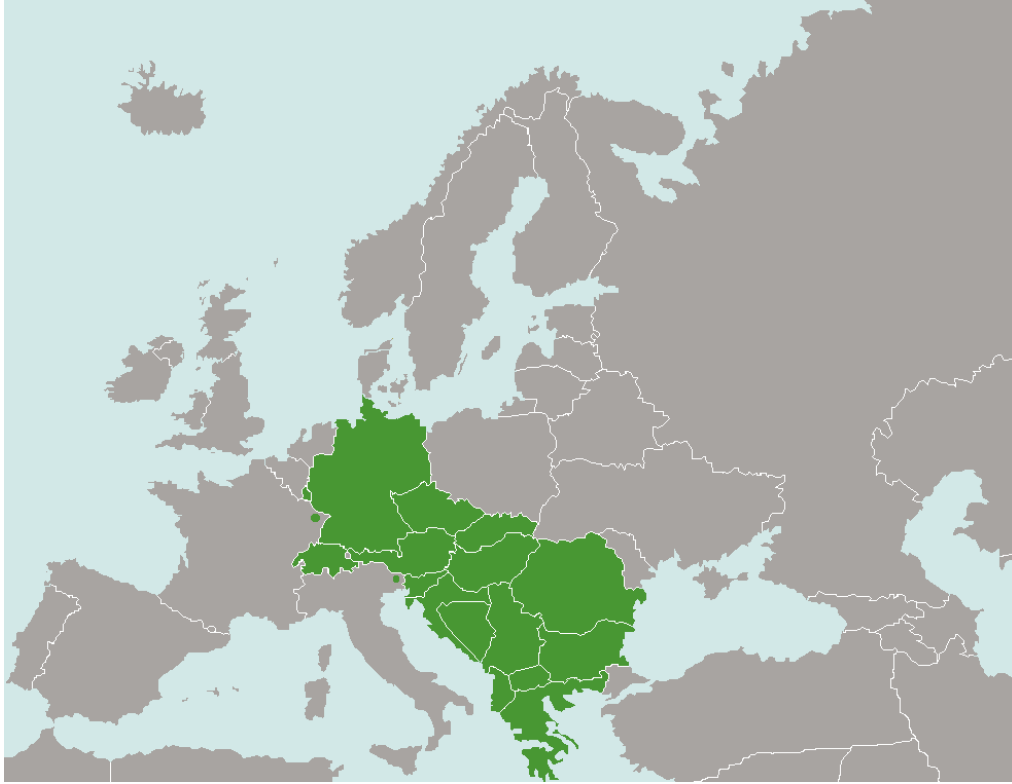
Austropotamobius torrentium (**rak kamenjar ili potočni rak**) je veličinom najmanja vrsta porodice Astacidea (slika 6). Zabilježene veličine ovih rakova su 6-9 cm kod ženki i 8-10,5 kod mužjaka. Boja tijela je raznolika. Najčešće je tamnosmeđa do maslinastozelena, ali ima i nekih svijetlih ili čak plavičastih primjeraka.



Slika 6. *Austropotamobius torrentium* (EOL, 2013).

Ženke spolnu zrelost dostižu pri dužini 4-6 cm. Sezona parenja je u studenom, a juvenilni rakovi se izliježu sredinom lipnja.

Aktivni su noću iako je u vrijeme parenja uočena i dnevna aktivnost. Potočni rakovi žive na izvorišnim i gornjim dijelovima potoka na višim nadmorskim visinama. Vole kamenita dna i gustu obalnu vodenu vegetaciju kako bi se mogli skloniti pod kamenje ili među vodeno bilje (Füreder i sur., 2013) Vrsta se može naći u staništima središnjeg djela Europe (slika 7). U Hrvatskoj su ovi rakovi najviše prisutni u vodama savskog sliva, ali pronađeni su i u pritocima Zrmanje i Krke (jadranski slijev) (Maguire i Gottstein-Matočec, 2004).



Slika 7. Rasprostranjenost *Austropotamobius torrentium* u Europi (Holdich, 2002).

1.5. Značajke eukariotskih kromosoma

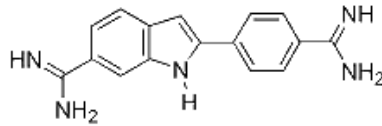
Nasljeđivanje roditeljskih osobina još od davnih dana zaokuplja znanstvenike, no tajna ovog procesa se počela razotkrivati tek u drugoj polovici 19. st. Gregor Mendel je svojim radom 60-ih godina 19. st položio temelje nove grane biologije koju danas nazivamo genetika. Danas se zna kako se nasljedna informacija prenosi kao kod deoksiribonukleinske kiseline u obliku nasljednih jedinica koje nazivamo genima (Guttman, 1999).

Organizirane strukture proteina i dvolančane molekule DNA koja nosi nasljednu uputu zovu se kromosomi. Skup svih kromosoma u jednoj stanici čini njezin kariotip. Istraživanje kariotipa zanimljivo je iz više razloga. Prije svega u medicinskoj dijagnostici i istraživanju mogućnosti liječenja bolesti uzrokovanih genetskim poremećajima (Lewis, 1999). Osim toga, kariološka i citogenetička istraživanja vrlo su značajna u rasvjetljavanju evolucijskih procesa, a u vezi s time i otkrivanju srodstvenih odnosa među vrstama (Fratini i sur., 2005; Mlinarec i sur., 2012a, Mlinarec i sur., 2012b; Sinclair i sur., 2004). Analiza genoma može biti vrlo vrijedan alat u filogenetici (de Queiroz i Gauthier, 1992).

Kromosom eukariotske stanice je građen od kromatina, jedne dvolančane molekule deoksiribonukleinske kiseline i određenih proteina. Od samih početaka proučavanja kromatina primjećeno je da njegova struktura nije jednaka cijelom dužinom kromosoma. Najočiglednija razlika je između dva strukturna oblika, slabije kondenzirani eukromatin i heterokromatin koji čak u interfazi ostaje vrlo gusto pakiran (Mason i sur., 2009). Dosadašnja istraživanja pokazuju da je eukromatin oblik koji je genski aktivan, dok heterokromatin, čini se, ne sudjeluje u transkripciji gena. Pretpostavka je ipak da heterokromatin ima regulatornu ulogu u funkciji gena, te je kao takav vrlo bitan za održavanje stabilnosti genoma.

Također je uočeno da osim jedinstvene, neponavljajuće DNA, značajan dio genoma čine ponavljajuće sekvence nazvane satelitska DNA. Veći dio tih sekvenci je transkripcijski neaktivan, i čini se da ima strukturnu funkciju, primjerice satelitska DNA u blizini centromera i telomera. Drugi dio su transkripcijski aktivne ponavljajuće sekvence koje sadrže velik broj istih gena, primjerice globinske gene, gene za histone ili pak gene za rRNA koji se nalaze u regijama nukleolarnih organizatora (Plohl, 2010). Geni za rRNA su vrlo često korišteni u filogenetskim israživanjima. Jedan razlog je upravo taj što se najčešće u stanicama nalaze u iznimno velikom broju kopija. Drugi razlog je što su neke sekvence unutar ovih gena vrlo konzervirane te su jednake za veliki broj vrsta što značajno olakšava istraživanja. Najčešće se rade istraživanja gena za 18S rRNA i 28S rRNA (Fetzner i Crandall, 2002).

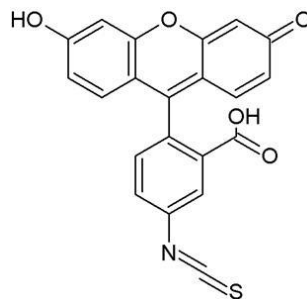
U citogenetičkim i kariološkim istraživanjima koristi se nekoliko tehnika pomoću kojih je moguće razlikovati različite regije kromosoma. Zbog razlike u strukturi kromatina neke boje nejednoliko oboje kromosome pa se različite strukturne regije pod mikroskopom vide kao pruge na kromosomu. Tako ovisno o načinu pripreme preparata i upotrijebljene boje dobije se nekoliko vrsta pruga, a postupak se naziva pruganje kromosoma (Pavlica, 2012). Uzorci koje se vizualiziraju ovakvim tehnikama specifične su za određene kromosome neke vrste pa možemo reći da su metode pruganja od neprocjenjive važnosti u analizi genoma. Bilo bi gotovo nemoguće identificirati pojedine kromosome u genomu, ili pak točno dijagnosticirati različite aberacije kromosoma bez upotrebe pruganja (Lewis, 1999; Sheng i sur., 2013). Danas postoji čitav niz boja koje se u pruganju koriste ovisno o tome što se želi postići. Među najčešće korištenima svakako je Giemsa boja. U ovom istraživanju korištena je fluorescencijska boja, 4,6-diamidino-2-fenilindol ili DAPI (slika 8).



Slika 8. Struktura molekule DAPI (Thermo, 2013).

DAPI se interkalira u AT bogate heterokromatinske regije DNA (veže se i za RNA, ali znatno slabije) pa su te regije DNA intenzivnije obojene. Kad je DAPI vezan za DNA njegov ekcitacijski maksimum je kod valne duljine 360 nm (u ultraljubičastom području spektra), a emisijski maksimum je kod valne duljine 456 – 460 nm (u plavom području) (Thermo, 2013).

Još jedan oblik označavanja specifičnih regija u genomu je fluorescencijska *in situ* hibridizacija (FISH). Ovaj se postupak razlikuje od pruganja kromosoma. Smisao FISH-a je pronaći u genomu mjesta točno određenih sekvenci DNA. Probe (fragmenti RNA ili DNA komplementarnih sekvenci koji tražimo) označene fluorokromima vežu se procesom hibridizacije na komplementarna mjesta u istraživanom uzorku. Rezultati se analiziraju fluorescencijskim mikroskopom (Lewis, 1999; Sheng i sur., 2013). 45S rDNA je gen koji kodira za 45S rRNA, prekursor je za 28S, 18S i 5,8S rRNA koje u eukariotskih organizama izgrađuju veliku podjedinicu citoplazmatskih ribosoma. Proba je označena fluorescencijskom bojom fluorescein izotiocijanat (FITC) (slika 9) ekcitacijskog maksimuma $\lambda=494$ nm, emisijskog maksimuma $\lambda=520$ nm (u zelenom području spektra) (Biosciences, 2013).



Slika 9. Struktura molekule FITC (Biosciences, 2013).

Promatrati kromosome najjednostavnije je neposredno prije, za vrijeme i tek kratko nakon stanične diobe. Naime, kromosomi su tad najviše kondenzirani i jasno vidljivi mikroskopom. Kariotip nekog organizma se može prikazati na dva načina. Idiogram je shematski prikaz svih kromosoma nekog kariotipa. Ukoliko se na sličan način u skupine prema položaju centromera i veličini slože fotografirani kromosomi takav prikaz se naziva kariogram. Neke značajke koje je uobičajeno analizirati su broj kromosoma, veličina kromosoma, položaj centromera, sekundarna suženja, prisutnost spolnih kromosoma i sustav spolnog određivanja, položaj određenih gena ili regija u genomu.

Broj kromosoma je u pravilu jednak za sve jedinke neke vrste pa ga možemo smatrati svojstvom vrste. Uobičajeno je da svaka somatska stanica nekog organizma ima dva seta kromosoma (diploidna stanica), a gameta jedan (haploidna stanica). Odstupanja od takvog sustava može biti euploidija (zahvaća sve kromosome u setu) i aneuploidija (zahvaća samo pojedine kromosome u setu) (Guttman, 1999). Euploidne promjene se odnose uglavnom na veći broj setova kromosoma u stanici odnosno poliploidije. Pronađene su kod mnogih biljaka, beskralježnjaka pa čak i nižih kralježnjaka (Rousseau-Gueutin i sur., 2009). Za životinjske organizme su takve promjene najčešće štetne, čak i letalne, jer osim poteškoća u stvaranju vijabilnih gameta, dolazi i do poremećaja u fiziologiji zbog viška ili manjka nekih gena (Sellars i sur., 2010). Među biljkama je pak pojava poliploidije iznimno česta i u evolucijskom smislu pozitivna strategija. Poliploidne biljke su obično otpornije i prilagodljivije od onih koje to nisu (Rousseau-Gueutin i sur., 2009). Neosporno je također da poliploidija djeluje kao vrlo snažan evolucijski čimbenik (Soltis i Soltis, 1999). U stanicama više od 2000 eukariotskih vrsta uz „normalne“ ili A kromosome u komplementu, uočen je različit broj dodatnih kromosoma nazvanih B kromosomi (Camacho, 2000; Kour i sur. 2012). B kromosomi su zanimljivi iz više razloga. Prema dosadašnjim istraživanjima osim kod vrste *Crepis capillaris* (L.) Wallr. nije pronađena transkripcijska aktivnost kod B kromosoma (Marschner i sur., 2007). Također, normalna funkcija organizma ne ovisi o prisutnosti ili odsutnosti B kromosoma, ne sudjeluju u rekombinaciji i ne slijede Mendelove zakone naslijeđivanja pa ih tako u nekoj populaciji neke jedinke uopće nemaju, a one koje imaju razlikuju se po broju B kromosoma (Camacho, 2000; Jones i Houben, 2003). Nejasno je još uvijek i podrijetlo B kromosoma. Prema dosada dostupnim informacijama čini se moguće da su B kromosomi nastali različitim mehanizmima kod različitih organizama. Tako dokazi upućuju da su primjerice kod vrste *C. capillaris* ili

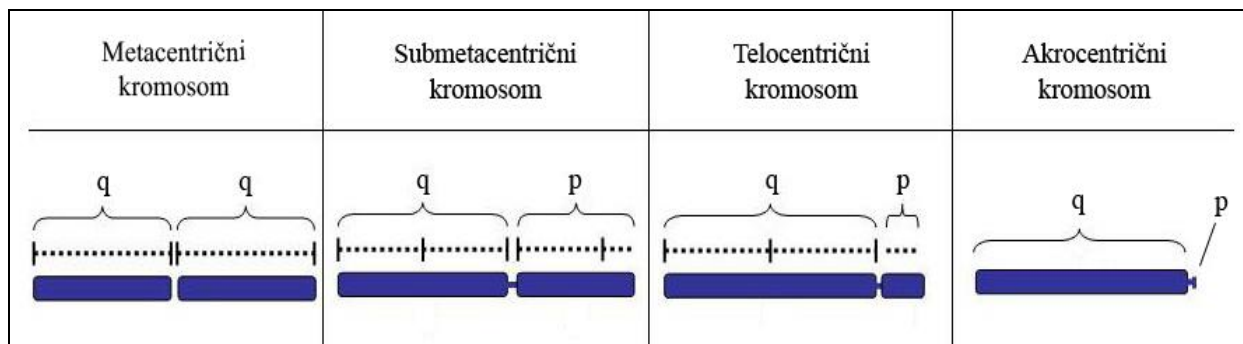
Plantago lagopus L. nastali od A kromosoma iste vrste ili od spolnih kromosoma kod *Leiopelma hochstetteri* Fitzinger, 1861 (Kour i sur., 2012), dok se u nekim drugim primjerima vjerojatniji čini mogućnost da podrijetlo genetičkog materijala B kromosoma dolazi od neke druge obično srodne vrste primjerice među vrstama *Coix aquatica* Roxb. ili kod vrste *Poecilia formosa* Girard, 1860 (Camacho, 2000).

Mehanizmi određivanja spola najčešće uključuju niz razvojnih promjena pod utjecajem hormona. Te promjene pak mogu biti kromosomski ili okolišno uvjetovane (Tamarin, 1999). Okolišno uvjetovano određivanje spola uočeno je primjerice kod nekih riba (Bezault i sur., 2007; Devlin i Nagahama, 2002) i kod gmazova (Ciofi i Swingland, 1997). Ipak kod većine vrsta određenje spola je pod utjecajem genetičkih čimbenika. Takve vrste u stanicama uz autosome imaju i spolne kromosome (Ciofi i Swingland, 1997). Tijekom analize kariotipa je zato zanimljivo ustanoviti ima li promatrana vrsta spolne kromosome te na kakav spolno determinirajući mehanizam te informacije upućuju. Takva informacija može značajno doprinijeti objašnjenju ponašanja određene vrste, a time i pomoći primjerice u donošenju ispravnih odluka vezanih uz zaštitu ugroženih vrsta.

Centromera je specijalizirana regija eukariotskog kromosoma čija je funkcija ključna za pravilnu segregaciju kromosoma ili sestrinskih kromatida u dvije stanice kćeri tijekom mejoze i/ili mitoze stanice. Mikrotubuli diobenog vretena vežu se za kinetohor, proteinsku strukturu koja se nalazi upravo u području centromera (Vagnarelli i sur., 2008). Područje kromosoma koje zauzima centromera može biti vrlo različite dužine. Tako primjerice *Saccharomyces cerevisiae* (Mayen ex E. C. Hansen, 1883) ima točkaste centromere duge samo ~125 pb, dok neki *Nematoda* imaju holocentrične kromosome kod kojih su centromerne determinante raspoređene duž čitavog kromosoma (Malik i Hanikoff, 2002). Najveći broj organizama ima regionalne centromere kod kojih su centromerne regije dužine od 40 kb do nekoliko Mb (Clarke, 1998). Centromerne regije sačinjavaju ponavljajuće sekvence satelitske DNA sa vezanim funkcionalnim proteinima (Hall i sur., 2004; Pidoux i Allshire, 2000).

Budući da je funkcija centromera kod svih vrsta jednaka, iznenađujuća je raznolikost u slijedu nukleotida koji čine centromerne regije različitih vrsta (Hall i sur., 2004). To upućuje na zaključak kako je evolucija centromernih regija vrlo brza te bi usporedba ovih sekvenci mogla pridonijeti odgonetavanju filogenetskih odnosa među bliskim vrstama. Centromera se na metafaznim kromosomima vidi kao utanjenje pa se sukladno tome opisuje kao primarno

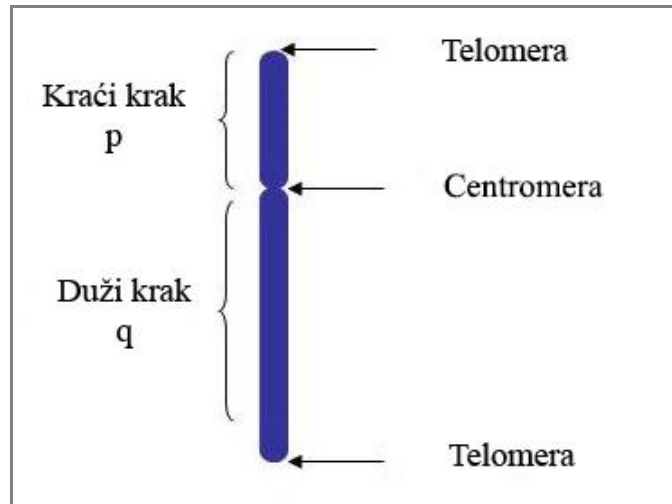
utanjenje kromosoma. Prema Leven i sur. (1964) s obzirom na položaj centromera kromosome dijelimo na metacentrične ($r=1-1,7$), submetacentrične ($r=1,7-3$), telocentrične ($r=3-7$) i akrocentrične ($r>7$), gdje je r omjer duljine krakova kromatida (slika 10.). Dogovorno je označavanje kraćeg kraka slovom p , a dužeg kraka slovom q .



Slika 10. Razredi kromosoma prema položaju centromera (prilagođeno prema GeneticsSuite, 2013).

Osim centromera neki kromosomi imaju i dodatna, sekundarna suženja. Sekundarna suženja nemaju nikakvu ulogu pri diobenoj segregaciji.

Sredinom 20. st. u odvojenim istraživanjima su Hermann Muller i Barbara McClintock primjetili kako se krajevi kromatida ne sljepljuju sa izrezanim fragmentima DNA. To ih je navelo na zaključak kako na krajevima kromosoma mora postojati nekakva zaštitna struktura koja to sprečava. Muller je te strukture nazvao telomere (slika 11) (Murnane, 2012). Danas je poznato da su telomere kompleksne strukture sačinjene od brojnih ponavljanja iste sekvence DNA i različitih proteina koje tvore oblik petlje (Londoño-Vallejo, 2004; Murnane, 2012). Upravo ovakva struktura omogućava telomerama da obavljaju svoju funkciju zaštite i stabilizacije kromosoma. Telomere sprečavaju sljepljivanje krajeva kromosoma, razgradnju kromosoma egzozukleazama te omogućuju pravilnu replikaciju krajeva kromosoma (Stewart i sur., 2012). U većini normalnih stanica replikacijom kromosoma dolazi do skraćivanja telomera. Kad duljina telomera dođe do određene kritične granice kod koje više ne može obavljati svoju funkciju, stanica zaustavlja stanični ciklus i ostari. To je razlog zbog kojeg se većina stanica podijeli samo određeni broj puta, dok ne dosegne tzv. Hayflickovu granicu (Gomes i sur., 2010). Iznimka su stanice koje sadrže enzim telomerazu, koji produžuje krajeve kromosoma (Murnane, 2012).



Slika 11. Morfologija eukariotskog kromosoma (prilagođeno prema GeneticsSuite 2013).

1.6. Dosadašnje spoznaje o kromosomima istraživanih vrsta

Rakovi su godinama smatrani nepovoljnim materijalom za kariološka i citogenetička istraživanja te je većina vrsta na kromosomskoj razini vrlo slabo ili pak nikako istražena. Razlog tome je što većina vrsta ima relativno velik broj veličinom malih kromosoma. Primjerice vrsta *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) ima najveći diploidni broj kromosoma unutar *Metazoa*, $2n=376$ (Niiyama, 1962). Unatoč vrlo malom broju istraživanja na tom području (manje od 2% vrsta je istraženo), rezultati pokazuju neočekivano veliku varijabilnost među vrstama (Mlinarec i sur., 2011). Najveću raznolikost u broju kromosoma prema dostupnim podacima pokazuju upravo slatkovodni rakovi infrareda *Astacidea* od $2n=102$ kod *Procambarus digueti* (Bouvier, 1897) (Diupotex Chong i sur., 1997) do $2n=376$ kod već spomenutog *P. leniusculus* (Niiyama, 1962). Informaciju o broju kromosoma kod vrste *A. astacus* nalazimo samo u jednoj studiji Prowazeka (1902 citirano prema Fetzner i Crandall, 2002) s početka 20. st. Rezultat njegova istraživanja je $2n=116$ za *A. astacus*. Silver i Cukerzis (1964) te Cukerzis (1988) izvještavaju o diploidnom broju kromosoma $2n=368$ za vrstu *A. leptodactylus*.

2. CILJEVI

Ugroženost autohtonih europskih rakova iz skupine *Astacidea* i potreba da se provedu mjere koje će omogućiti njihov opstanak predmet je mnogih istraživanja. Međutim, teško je donijeti pravilne odluke o zaštiti vrsta čiju biologiju dovoljno ne poznajemo. Također, pitanje srodstvenih odnosa unutar ove skupine u značajnoj je mjeri nerazriješeno, a molekularno-genetička istraživanja koja bi mogla pomoći u rješavanju tih problema relativno su rijetka.

Cilj ovog rada je provesti kariološko-citogenetička istraživanja vrsta *Astacus astacus*, *A. leptodactylus* i *Austropotamobius torrentium* u svrhu određivanja: i) broja i morfologije kromosoma, ii) položaja AT-bogatog heterokromatina i ribosomskih lokusa za 45S rRNA iii) ponašanja kromosoma u mejozi za pojedine vrste.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Materijal

Tijekom istraživanja sam koristila sljedeći materijal i kemikalije:

- Dva odrasla mužjaka vrste *A. astacus* mase 34,2 g i 34,5 g uzorkovanih iz potoka Trećak u Slavoniji.
- Dva odrasla mužjaka vrste *A. leptodactylus* mase 63,1g i 87,7 g uzorkovanih iz rijeke Mrežnice (u blizini Duge Rese).
- Dva odrasla mužjaka vrste *A. torrentium* mase 15,3 g i 26,0 g uzorkovanih iz Kraljevečkog potoka na Medvednici.
- Kolhicin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Njemačka)
- Vodena otopina kalijeva klorida, KCl(aq), 0,1 M (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska).
- Carnoy fiksativ: smjesa metanola CH₃OH (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska) i ledene octene kiseline, CH₃COOH (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedelja, Hrvatska); korištena su dva volumna omjera sastavnih tekućina V (metanol) : V (ledena octena kiselina) = 3:1 i V (metanol): V (ledena octena kiselina) = 1:1.
- Octena kiselina, CH₃COOH (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedelja, Hrvatska), w_≥95,5% i w=50%.
- Ugljikov(IV) oksid, CO₂(s) (Messer Croatia Plin d.o.o., Zagreb, Hrvatska).
- McIlvaine pufer, smjesa vodene otopine limunske kiseline (C₆H₈O₇) (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska) i vodene otopine natrijeva hidrogenfosfata dodekahidrata (Na₂HPO₄×12H₂O) (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska), pH=7.
- 4,6-diamino-2-fenilindol DAPI (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Njemačka), γ=2 μg/ml.
- Otopina za uklapanje koja usporava izbjeljivanje uzrokovano svjetlošću (Dako, Glostrup, Njemačka).
- Ribonukleaza, RNaza (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Njemačka).
- Paraformaldehid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Njemačka).
- Hibridizacijska smjesa: 50% (V/V) formamida (CHONH₂) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Njemačka), 10% (m/V) dekstranova sulfata (Sigma-Aldrich Chemie

GmbH, Taufkirchen, Njemačka), 0,6% (m/V) natrijeva dodecilsulfata (SDS) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Njemačka), 2XSSC, 2 ng/μl označene probe.

- Proba: 2,4 kb fragment 18S rDNA izrezan HindIII restrikcijom nukleazom, kloniran u vektorski plazmid pUC19 (Torres-Ruiz i Hemleben, 1994). Proba je označena fluorescencijskom bojom FITC-dUTP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka) kompletom za obilježavanje probe DNA metodom pomaka ureza (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka) prema uputama proizvođača.
- SSC (engl. salina sodium citrate), smjesa 150 mM natrijeva klorida (NaCl) (Lach-Ner s.r.o., Brno, Češka) i 15 mM natrijeva citrata ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedelja, Hrvatska) namješteno na pH=7.
- Tween20 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka)
- Vectashield, otopina za uklapanje (Vector Laboratories, Peterborough, Velika Britanija); usporava izbjeljivanje uzrokovano svjetlošću i sadrži DAPI (2 μg/ml).
- Fluorescencijski mikroskop Olympus BX51, opremljen digitalnom kamerom visoke osjetljivosti Olympus DP70.
- Kompjuterski programi: Adobe Photoshop CS5, CorelDRAWGrafic i Microsoft Office Excel 2007.

3.2. Metode

3.2.1. Preparacija tkiva

Kako bih preparirala tkivo za analizu, najprije sam citostatik kolhicin kod baze prvog para peleopoda odraslog mužjaka raka polako injicirala u području peritonealne šupljine. Injicirala sam 2 μg kolhicina po gramu tjelesne mase jedinke. Nakon 4-5 sati predtretmana u akvariju, iz žrtvovanih životinja sam izolirala testise. Potom sam tkivo izrezala na manje komadiće i inkubirala 45 min u hipotoničnoj vodenoj otopini KCl pri temperaturi od 25 °C. Komadiće testisa sam iz KCl premjestila u Carnoy fiksativ (3:1 V/V) na 40 min, a potom u svježju otopinu fiksativa na dodatnih 60 min. Tkivo sam čuvala u Carnoy fiksativu (1:1 V/V) na temperaturi 4 °C.

3.2.2. Izrada preparata

Preparirano tkivo životinja sam upotrijebila za izradu preparata sljedećim postupkom. Prvo sam komadić tkiva testisa na jedan sat inkubirala u 50% octenoj kiselini. Potom sam tkivo macerirala u Carnoy fiksativu (1:1 V/V). Macerirano tkivo sam pokrila pokrovnicom i komadićem filter papira te pritisnula palcem („squash“). Nakon smrzavanja preparata pomoću CO₂ (Sharma i Sharma, 1972) pokrovnicu sam odstranila skalpelom. Preparat sam sušila 24 sata na zraku pri sobnoj temperaturi.

3.2.3. Bojenje

U svrhu vizualizacije heterokromatinskih AT pruga, kromosome sam bojala fluorescencijskom bojom DAPI. Kromosomske preparate sam najprije 20 min inkubirala u McIlvaine puferu na sobnoj temperaturi. Potom sam na predmetnicu nakapala otopinu DAPI i pokrila preparat narančastom pokrovnicom. Preparat sam inkubirala u otopini DAPI 20 min pri sobnoj temperaturi. Nakon bojenja preparate sam isprala u McIlvaine puferu i uklopila u otopinu protiv blijedenja (Dako, Glostrup, Njemačka).

3.2.4. Fluorescencijska hibridizacija *in situ* (FISH)

Položaj gena za 45S rRNA na kromosomima vrsta *A. astacus* i *A. leptodactylus*, utvrdila sam metodom fluorescencijske hibridizacije *in situ* (FISH). Postupak sam provela prema Mlinarec i sur. (2006) s manjim izmjenama. Kromosomske preparate sam prvo tretirala RNazom (100 µg/ml). Slijedila je fiksacija s 4% paraformaldehidom. Hibridizacijsku smjesu (40 µl) sam potom denaturirala 15 min na temperaturi 76 °C. Nakon dodavanja hibridizacijske smjese, preparirane kromosome sam denaturirala 5 min na 73 °C. Hibridizacija se odvijala preko noći pri 37 °C. Poslije hibridizacijska ispiranja sam provela pri temperaturi 42 °C po 5 min razrijeđenjima pufera 20xSSC redom: 2 X SSC, 0,1 X SSC, 2 X SSC, 4 X SSC/Tween20. Preparate sam uklopila u otopinu za uklapanje Vectashield. Preparate sam čuvala pri temperaturi 4 °C.

3.2.5. Vizualna obrada preparata i analiza podataka

Za vizualizaciju signala i fotografiranje preparata koristila sam fluorescencijski mikroskop Olympus BX51, opremljen digitalnom kamerom visoke osjetljivosti (Olympus DP70). Preparate sam promatrala i fotografirala kod povećanja 600 x. Fotografije sam obradila

programima Adobe Photoshop CS5 i CorelDRAWGrafic. Rezultate sam obradila i prikazala pomoću programa Microsoft Office Excel 2007. Analizirala sam u prosjeku 35 metafaza po vrsti.

3.2.6. Izrada kariograma

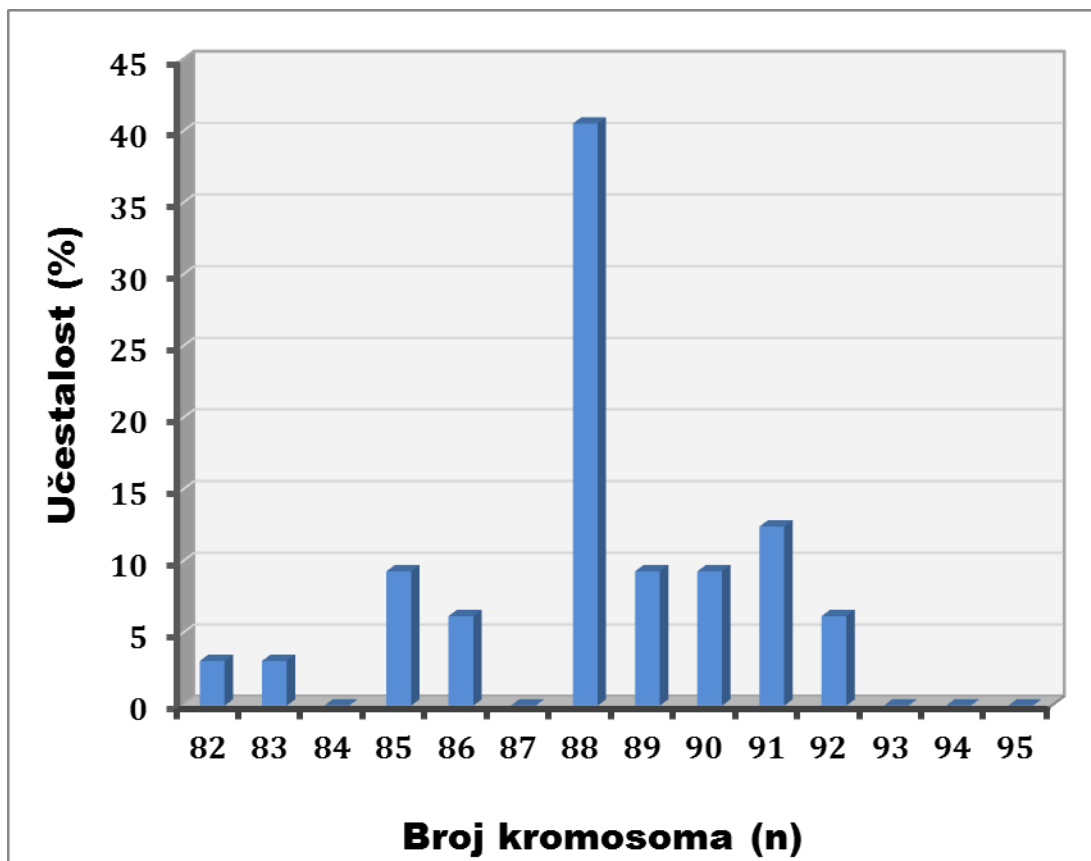
U svrhu izrade kariograma analizirane su tri najkvalitetnije metafazne ploče pojedinog raka. Kromosomi su mjereni pomoću opcije „measurement tool“ programa Adobe Photoshop CS3 pri povećanju 600 x. Klasifikacija kromosoma je provedena prema Levan i sur. (1964) na slijedeće razrede: m=metacentrični kromosom ($r=1-1,7$), sm=submetacentrični kromosom ($r=1,7-3$), t=telocentrični kromosom ($r=3-7$) i a=akrocentrični kromosom ($r>7$) Kromosomi su najprije raspoređeni u razrede ovisno o položaju centromere, potom su homologni kromosomi spareni i konačno parovi unutar pojedinog razreda složeni prema veličini (od najvećeg prema najmanjem). Heteromorfni par kromosoma *A. astacus* prikazan je izdvojeno iz svih razreda.

4. REZULTATI

4.1. Broj kromosoma i struktura kariotipa

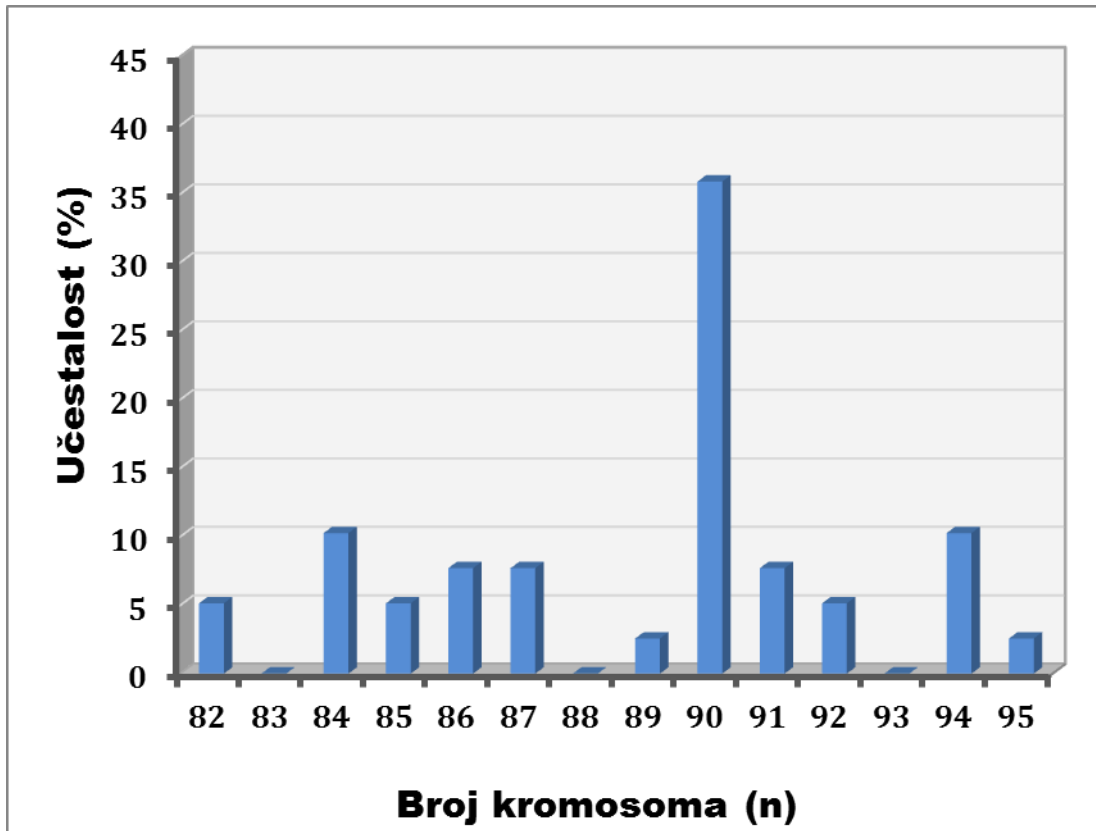
Kako bih utvrdila broj i morfologiju kromosoma vrsta *Astacus astacus*, *A. leptodactylus* i *Austropotamobius torrentium*, analizirala sam po 35 kvalitetnih metafaza svake istraživane vrste. Preparacijom tkiva *A. astacus* dobila sam kvalitetne spermatogonijske metafaze i metafaze I mejoze. Kod vrste *A. leptodactylus* analizirala sam metafaze I mejoze, a kod vrste *A. torrentium* su sve metafaze prikladne za analizu bile spermatogonijske.

Haploidan broj kromosoma izbrojen kod vrste *A. astacus* varira od $n=82$ do $n=92$. U najvećem broju metafaza (40%) izbrojila sam $n=88$ kromosoma (slika 12)



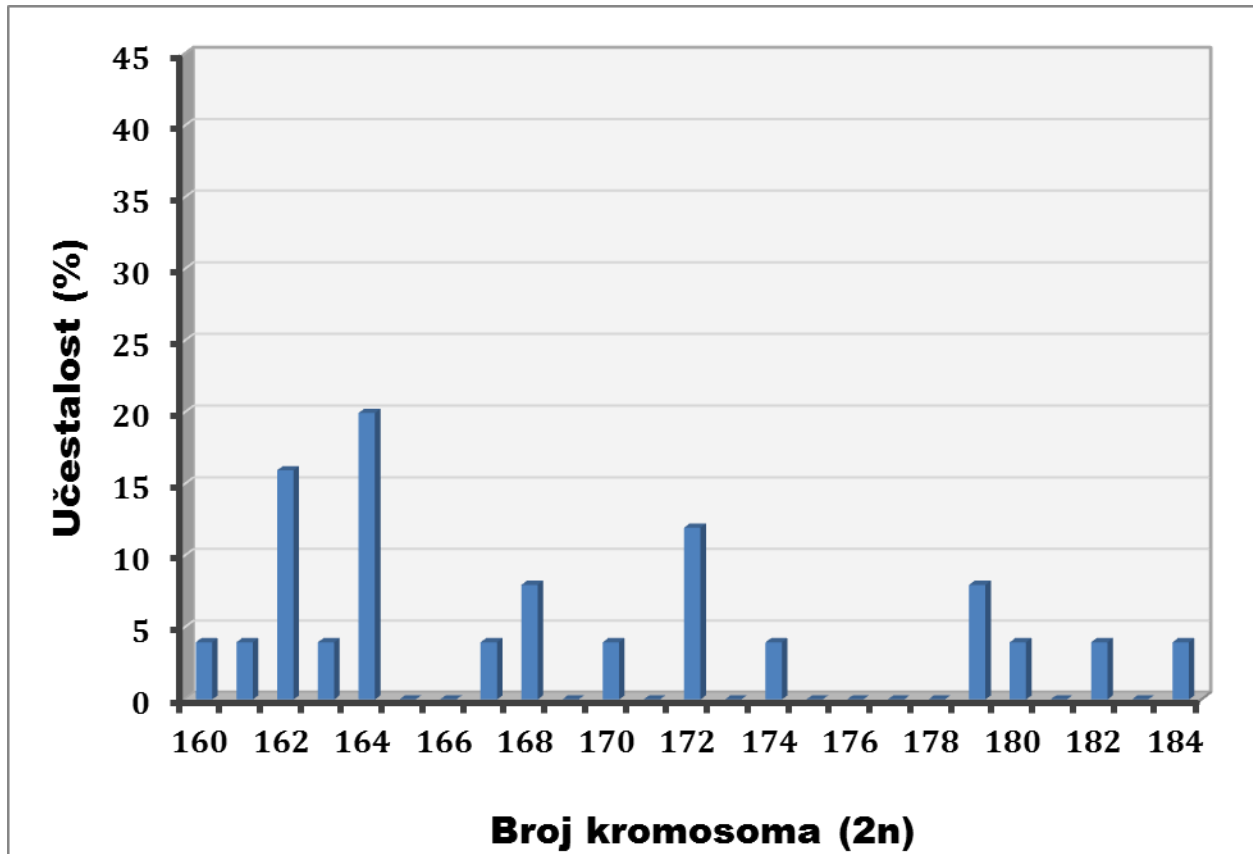
Slika 12. Pojavnost pojedinog broja kromosoma zabilježenog u analiziranim metafazama vrste *Astacus astacus*.

Kod vrste *A. leptodactylus* je haploidan broj kromosoma u rasponu od $n=82$ do $n=94$ s najvećom učestalošću kod $n=90$ (35%) (slika 13).



Slika 13. Pojavnost pojedinog broja kromosoma zabilježenog u analiziranim metafazama vrste *Astacus. leptodactylus*.

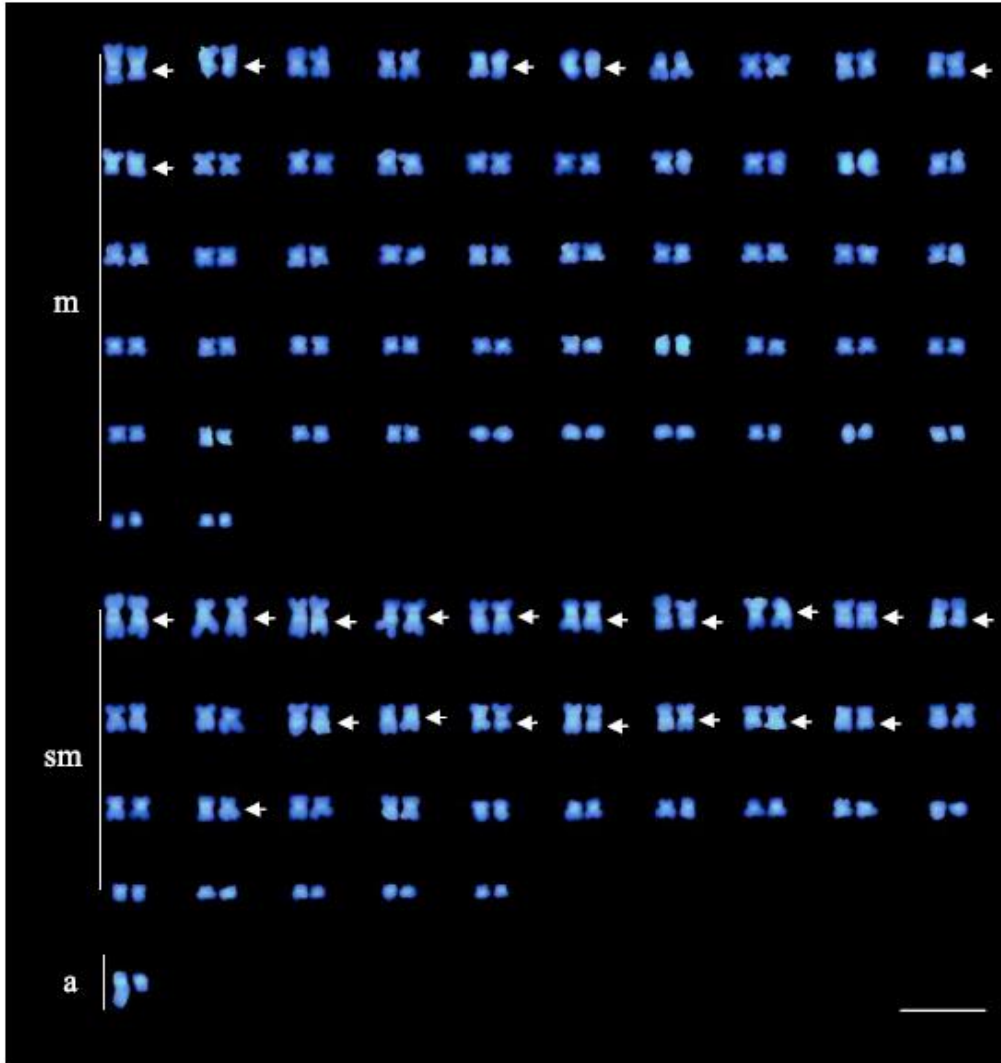
Broj kromosoma vrste *Austropotamobius torrentium* varira u rasponu od $2n=160$ do $2n=184$. Najveća je zastupljenost rezultata je kod $2n=164$ (20%) (slika 13)



Slika 14. Pojavnost pojedinog broja kromosoma zabilježenog u analiziranim metafazama vrste *Austropotamobius torrentium*.

U svrhu izrade kariograma analizirala sam po tri najkvalitetnije spermatogonijske metafaze vrsta *Astacus astacus* i *Austropotamobius torrentium*.

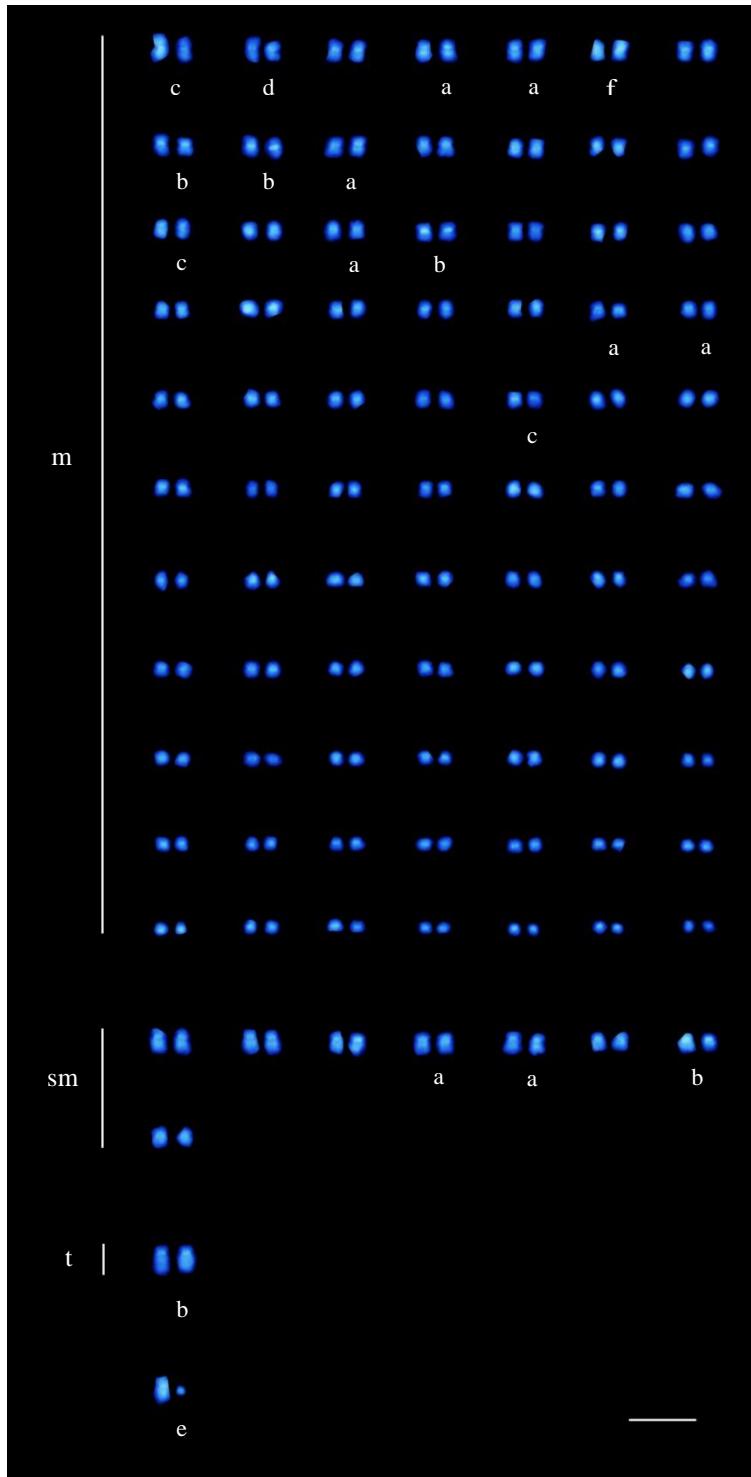
Detaljnijom analizom kromosoma utvrdila sam da se haploidni set vrste *A. astacus* ($n=88$) sastoji od: 52 metacentrična, 35 submetacentrična i jednog akrocentričnog kromosoma. Dakle predložena formula kariotipa za vrstu *A. astacus* je $n=88, 52m+35sm+1a$. U kariotipu *A. astacus* uočila sam jedan izrazito heteromorfan par s obzirom na veličinu kromosoma. Jedan od kromosoma u paru je među najdužim kromosomima kariotipa, dok je drugi pak tri puta kraći od svog homologa i jedan od najmanjih kromosoma komplementa. Duljina analiziranih kromosoma je od 1,7 – 6,2 μm (slika 15).



Slika 15. Kariotip vrste *A. astacus*. m, metacentrični kromosomi; sm, submetacentrični kromosomi; a, akrocentrični kromosomi; strelice ističu parove s intersticijskim heterokromatinskim prugama. Skala=10 μ m.

Detaljna analiza metafaza mitoze *A. torrentium* pokazala je različite rezultate za broj kromosoma ove vrste. Prikladnu fotografiju metafaze mitoze na kojoj su heterokromatinske pruge bile jasno vidljive te se kromosomi nisu preklapali izabrala sam za izradu kariograma. Detaljnom analizom kromosoma utvrdila sam da je haploidni broj kromosoma za vrstu *A. torrentium* $n=87$ od kojih je 78 metacentričnih, 8 submetacentričnih te jedan telocentrični par. Predložena formula kariotipa za vrstu *A. torrentium* je $n=87, 78m+8sm+1t$. Jedan metacentrični par izrazito je heteromorfna, jedan kromosom u paru je najmanji kromosom, dok je drugi među

najvećim kromosomima komplementa (gotovo 4 puta je veći od svog homologa) (slika 16. e). U čitavom komplementu, najveći kromosomi su upravo telocentrični (slika 16.). Kod jednog homolognog para kromosoma uočila sam sekundarno suženje na dužem kraku (slika 16. d). Duljina kromosoma varira od 1,3 – 4,8 μm .



Slika 16. Kariotip *A. torrentium*. a, kromosomi koji imaju isključivo intersticijske AT bogate heterokromatinske pruge; b, kromosomi s vrlo izraženim heterokromatinskim centromernim prugama; c, kromosomski parovi kod kojih je uočljiva razlika u intenzitetu DAPI signala među homolozima; d, kromosomski par sa sekundarnim suženjem; e, heteromorfan par kromosoma; m,

metacentrični kromosomi; sm, submetacentrični kromosomi; t, telocentrični kromosomi. Skala=10 µm.

4.2. Ponašanje kromosoma u mejozi

Kako bih utvrdila ponašanje kromosoma *A. astacus* i *A. leptodactylus* u mejozi, analizirala sam kvalitetne metafaze I mejoze obje vrste. Fotografije metafaze I pokazuju kako obje vrste roda *Astacus* tvore različite oblike bivalenata: zvonolike, prstenaste, križne te V oblike. Najveći je broj bivalenata ipak prstenastog i zvonolikog oblika, dok su V i križni oblici znatno manje zastupljeni. Detaljnijom analizom utvrdila sam da od 88 bivalenata vrste *A. astacus* 41 ima oblika zvona, 38 je prstenastog, sedam V oblika i dva križnog oblika (slika 17 b). Kod vrste *A. leptodactylus* od 90 bivalenata 55 je oblika zvona, 30 prstenastih, tri oblika V i dva križna oblika (slika 17 c).

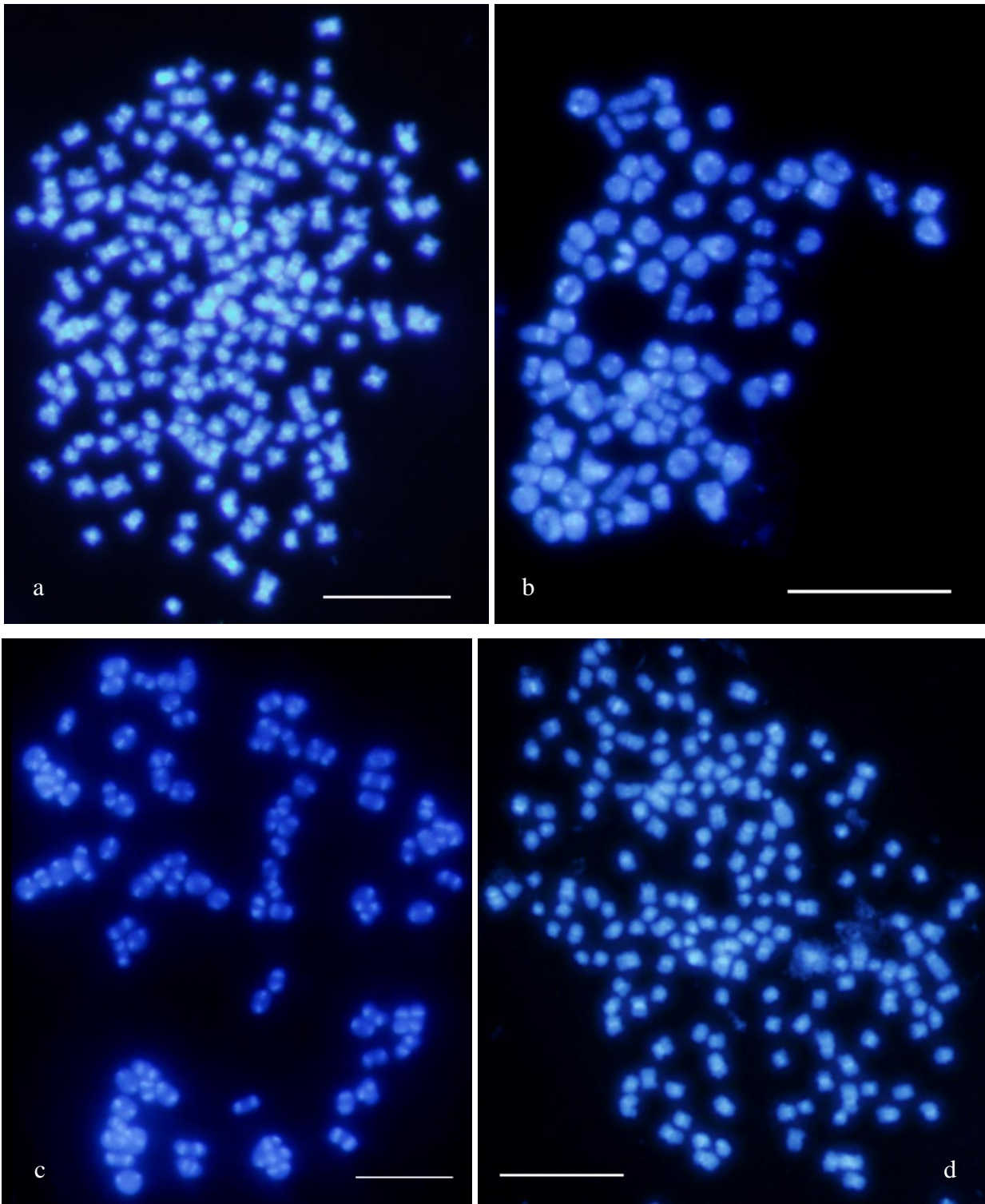
4.3. Položaj heterokromatinskih pruga na kromosomima vrsta *Astacus astacus*, *A. leptodactylus* i *Austropotamobius torrentium*

U svrhu utvrđivanja položaja heterokromatinskih pruga bogatih AT parovima baza na kromosomima istraživanih vrsta koristila sam metodu pruganja fluorescencijskom bojom 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Detaljna citogenetička analiza vrsta *A. astacus*, *A. leptodactylus* i *A. torrentium* pokazala je da sve tri vrste posjeduju jasno izražene heterokromatinske blokove smještene u centromernom/pericentromernom području te interkalarno na kromosomima. Centromerne AT bogate pruge nalaze se na svim kromosomima kod vrsta iz roda *Astacus* (*A. astacus* i *A. leptodactylus*), dok je kod vrste *A. torrentium* uočeno nekoliko kromosoma koji ne posjeduju centromerne/pericentromerne pruge. Intersticijske AT pruge nalaze se samo na nekim kromosomima, uglavnom većima, kod svih istraženih vrsta. Najviše intersticijskih pruga ima vrsta *A. torrentium*, a najmanje vrsta *A. leptodactylus*. Telomerne heterokromatinske pruge nisam uočila niti kod jedne istraživane vrste. Signali pruga bogatih AT parovima baza su različitih veličina i intenziteta što omogućuje razlikovanje kromosoma unutar komplementa.

U vrsti *A. astacus* intersticijski našla sam AT bogate blokove na šest od 52 metacentrična kromosomska para te na dužim krakovima kod 18 od ukupno 35 submetacentričnih parova. Uočila sam i jedan par homolognih kromosoma kod vrste *A. astacus* koji je gotovo u potpunosti

heterokromatičan (slika 15. a). Heteromorfan par je lako uočljiv u mejozi gdje tvori bivalent oblika zvona. Pravilna segregacija heterokromatičnog homolognog para ukazuje da par pripada kromosomskoj grupi A (slika 17 b)

Kod vrste *A. torrentium*, većina kromosoma posjeduje centromerne/pericentromerne AT bogate DAPI pozitivane heterokromatinske pruge. Centromerne/pericentromerne heterokromatinske pruge su različitog intenziteta (slike 16 i 17 b). Tri metacentrična kromosomska para, jedan submetacentrični par, te telocentrični par, imaju centromerne/pericentromerne AT bogate pruge izraženije nego ostali kromosomi u komplementu (slika 16 b). Šest metacentričnih i dva submetacentrična para imaju isključivo intersticijske AT bogate heterokromatinske pruge (slika 16 a). Jedan metacentrični kromosomski par je gotovo u potpunosti heterokromatičan (slika 16 f). Kod nekih kromosomskih parova također se može primjetiti razlika u jačini DAPI signala među homolozima (slika 16 c).



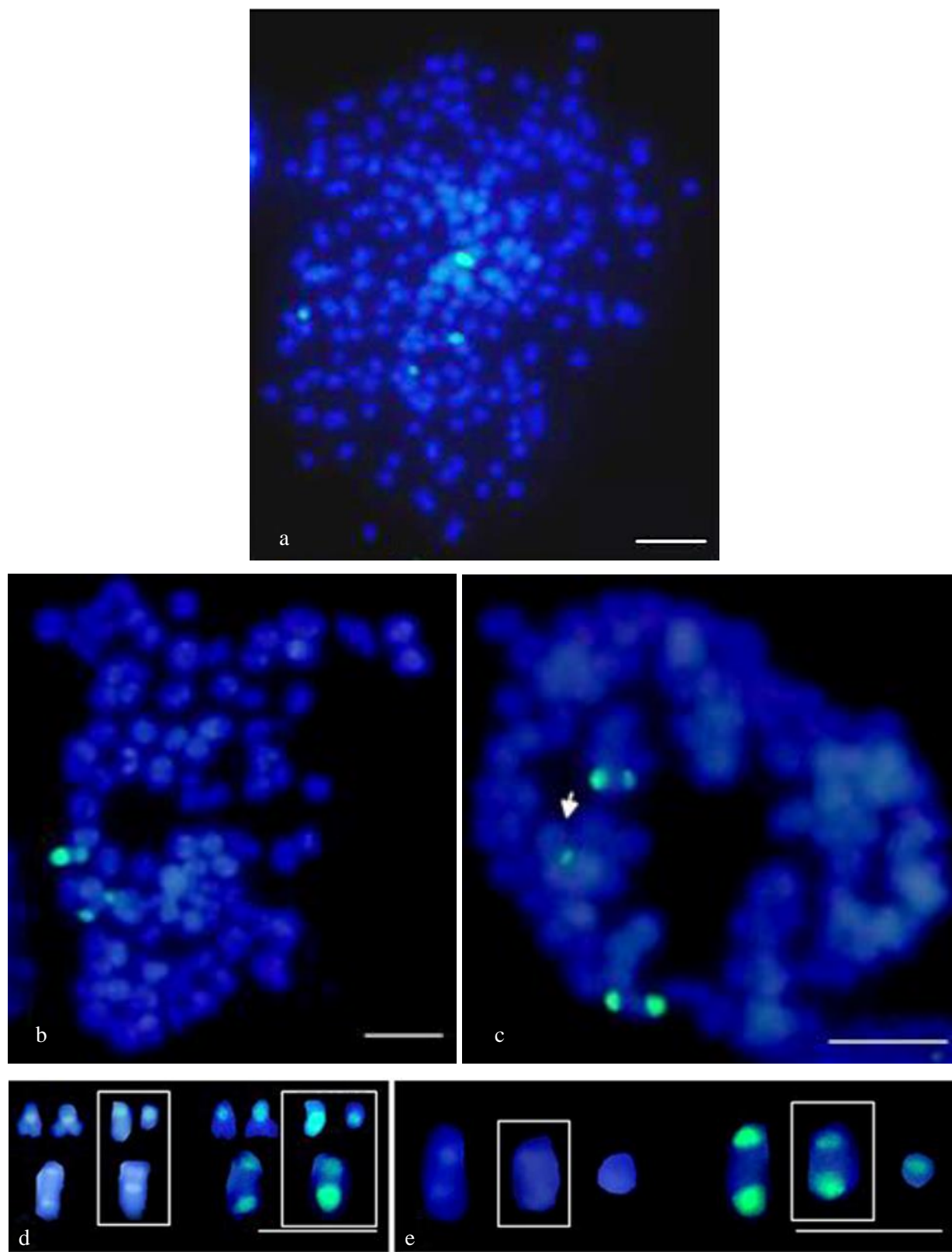
Slika 17. a, metafaza mitoze i b, metafaza I mejoze vrste *A. astacus*; c, metafaza I mejoze vrste *A. leptodactylus*; d, metafaza mitoze *A. torrentium*.

4.4. Broj i položaj lokusa za 45S rRNA na kromosomima vrsta *Astacus astacus*, *A. leptodactylus* i *Austropotamobius torrentium*

U svrhu određivanja položaja gena za 45S rRNA na kromosomima primijenila sam metodu fluorescencijske hibridizacije *in situ* (FISH). Utvrđeno je postojanje dva lokusa za 45S rRNA u vrsta *A. astacus* i *A. leptodactylus*. Nadalje, kod vrste *A. leptodactylus*, uočen je dodatni (peti) 45S rDNA signal slabog intenziteta (slika 18 c i e).

U vrsti *A. astacus*, jedan od dva homologna para koji nose 45S rDNA lokus je izrazito heteromorfan. Heteromorfnost se odnosi na veličinu, morfologiju i intenzitet 45S rDNA-signala: jedan kromosom iz para je među najvećim kromosomima u čitavom komplementu, dok je drugi među najmanjim kromosomima čitavog komplementa. Duži krak oba homologa je u potpunosti prekriven signalom 45S rDNA pa je shodno tome i signal na dužem akrocentričnom kromosomu tri puta intenzivniji i veći od onog na kraćem. Drugi 45S rDNA signal nalazi se na jednom metacentričnom paru kromosoma. Kao i kod heteromorfog para i kod ovog je para čitav jedan krak (na oba homologa) prekriven signalom 45S rDNA (slika 18 a, b i d). Metoda FISH je primjenjena na metafazama mejoze I kao i na metafazama mitoze. Podaci dobiveni na oba načina u potpunosti se podudaraju. Četiri FITC zelena signala koji odgovaraju 45S rDNA mjestima nalaze se na suprotnim krajevima dvaju bivalenata. Oba bivalenta su u formi zvona. Signal na jednom kraju bivalenta heteromorfog para je tri puta jačeg intenziteta i veličine nego na drugom kraju. Takav uzorak je uočen kod svih 35 spermatogonijskih mitozama i mejotičkih metafaza I kod dvije jedinke *A. astacus* (slika 18 b i d).

Kod vrste *A. leptodactylus* FISH pokusi s 45S rDNA kao probom na mejotskim metafazama I vrste otkrili su četiri jača zelena FITC signala koji odgovaraju postojanju dva lokusa za 45S rRNA. Uz četiri jaka signala uočen je jedan dodatni 45S rDNA signal značajno manje veličine i intenziteta. Četiri jača signala smještene su na suprotnim krajevima dvaju bivalenata zvonolikog oblika, a peti slabiji signal nalazi se na kraju trećeg bivalenta. Jedan bivalent pokazuje heteromorfnost s obzirom na veličinu i intenzitet FITC signala, međutim ne tako izrazito kao kod *A. astacus* (slika 18 c i e).



Slika 18. Lokalizacija 45S rDNA (zeleni FITC signali) metodom FISH na: a metafazi mitoze vrste *A. astacus*, b metafazi I mejoze vrste *A. astacus* i c metafazi I mejoze vrste *A.*

leptodactylus; d homologni kromosomski parovi i bivalenti koji nose 45S rDNA kod *A. astacus* nakon bojanja sa DAPI (lijevo) i nakon FISH-a (desno); e bivalenti koji nose 45S rDNA kod *A. leptodactylus* nakon bojanja sa DAPI (lijevo) i nakon FISH- a (desno).

5. RASPRAVA

Diploidni brojevi kromosoma utvrđeni ovim istraživanjem, $2n=176$ za vrstu *Astacus astacus* i $2n=180$ za vrstu *A. leptodactylus*, ne slažu se s prethodno objavljenim istraživanjima za navedene vrste. Broj kromosoma vrste *A. astacus* je gotovo za polovicu veći nego broj kromosoma kojeg je utvrdio Prowazek (1902) (citirano prema Fetzner i Crandall, 2002). Kod vrste *A. leptodactylus* broj kromosoma koji je utvrđen u ovom radu više je nego dvostruko manji od broja kromosoma kojeg su utvrdili Silver i Cukerzis (1964). Nekoliko je hipoteza koje bi mogle objasniti takva odstupanja. Mikroskopija se tijekom prošlog stoljeća značajno razvila pa se danas kromosomi mogu lakše brojati i rezultati su točniji. Nadalje, tkivo gonada se sastoji od stanica različite ploidijske pa razlika u broju kromosoma može biti rezultat zamjene diploidnih stanica s poliploidnim. Kako bi se ova hipoteza dodatno potvrdila potrebna su daljnja istraživanja s većim brojem jedinki. Prema dostupnim podacima do sada nisu rađena istraživanja koja su se bavila brojem kromosoma vrste *Austropotamobius torrentium*. U ovom istraživanju su po prvi puta dobiveni podaci o broju i morfologiji kromosoma za vrstu *A. torrentium*. Utvrđeni broj kromosoma kod vrsta *A. astacus*, *A. leptodactylus* i *A. torrentium* sličan je broju kromosoma kod vrsta drugih dviju porodica *Astacidea* (*Cambaridae* i *Parastacidae*). Primjerice, kod vrste *Orconestes virilis* (Hagen 1870) $2n=200$ (Fasten, 1914), kod vrste *O. immunis* (Hagen 1980) $2n=208$ (Fasten, 1914), kod *Cambaroides japonicus* (De Haan 1841) $2n=196$ (Niiyama, 1934), *Porcambarus clarkii* (Girard 1852) $2n=188$ (Murofushi i sur., 1984), *P. digueti* (Bouvier 1897) $2n=102$ (Diupotex Chong i sur., 1997), *Cerax quadricarinatus* (von Martens 1868) $2n=200$ (Tan i sur., 2004) i *Cerax destructor* (Clark 1936) $2n=188$ (Scalici i sur., 2010)

Varijacije u broju kromosoma upućuju na to da su promjene kariotipa, kao što su promjene broja kromosoma igrale važnu ulogu u evoluciji i specijaciji predaka slatkovodnih rakova infrareda *Astacidea*. Takve varijacije u broju kromosoma i široka geografska rasprostranjenost *Astacidea* ukazuju na mogućnost da se dogodilo više evolucijskih događaja u divergenciji ovog infrareda. Zanimljivo je da je diploidni broj kromosoma ($2n=376$, Niiyama, 1962) kod vrste *P. leniusculus* (Dana 1852), koja pripada rodu *Pacifastacus* porodice *Astacidae*, gotovo dvostruko veći nego diploidni broj kromosoma utvrđen za sestrinske rodove *Astacus* i *Austropotamobius*. Imajući to na umu možemo pretpostaviti mogućnost da je poliploidija djelovala kao evolucijski faktor kao što su već naglasili Lecher i sur. (1995).

Analiza broja i morfologije kromosoma vrste *A. torrentium* također donosi neke zanimljivosti. Na prvi pogled je uočljivo kako su rezultati brojanja kromosoma znatno raspršeniji dok vrste roda *Astacus* pokazuju rezultat uglavnom koncentriran oko određenog broja kromosoma. Također je zanimljivo što je kod vrste *A. torrentium* uočeno dosta spermatogonijskih metafaza s neparnim brojem kromosoma. Ovakvi rezultati mogu se naravno tumačiti eksperimentalnim pogreškama. Moguće je da su pri izradi preparata neki kromosomi „pobjegli“ i nisu fotografirani pa dakle nisu niti pobrojani. Takvu mogućnost donekle pobijaju rezultati za druge dvije istraživane vrste kod kojih su rezultati puno određeniji uz jednake uvjete provođenja eksperimenta. Drugo objašnjenje je postojanje B kromosoma kod vrste *A. torrentium*. Naime, u mnogih *Decapoda*, primjerice vrsta *Nephrops norvegicus* (Linnaeus, 1758), *Homarus americanus* H. Milne Edwards 1837, *Palinurus elephas* (Fabricius, 1787) i *P. mauritanicus* Gruvel 1911, zabilježeni su B kromosomi (Leitão i sur. 2008). Međutim, budući da nije bila moguća analiza metafaza I mejoze, takvo objašnjenje ostaje samo mogućnost. Morfološke razlike kariotipa *A. torrentium* u odnosu na *A. astacus* također su značajne. Kod obje vrste u kariotipu prevladavaju metacentrični kromosomi, međutim kod vrste *A. torrentium* prevaga na stranu metacentričnih kromosoma je puno izraženija. Također je kod obje vrste uočen heteromorfan par. Ipak, kod *A. astacus* taj je par akrocentričan dok je kod *A. torrentium* metacentričan. Osim toga razlika u morfologiji homologa heteromorfog para znatno je izraženija kod vrste *A. torrentium*. Uzevši u obzir značajne razlike u kariotipovima ovih triju vrsta može se zaključiti kako bi daljnja istraživanja koja uključuju metode molekularne citogenetike kod velikog broja vrsta mogla značajno pridonijeti procijeni smjerova i mehanizama evolucije kariotipa infrarede *Astacidea*.

Uspoređujući istraživane vrste na citogenetičkoj razini također su vidljive razlike u položaju AT bogatog heterokromatina među trima vrstama. Osobito je izražena razlika u broju, veličini i položaju heterokromatinskih pruga kromosoma vrste *Austropotamobius torrentium* u odnosu na vrste roda *Astacus*. Razlika je vidljiva u jačini DAPI signala koji je kod većine kromosoma vrste *A. torrentium* slabiji nego kod vrsta roda *Astacus*. Također, neki kromosomi vrste *A. torrentium* nemaju centromernih, već samo interkalarnu AT prugu. Vrsta roda *Astacus* na svim kromosomima imaju vrlo izražene centromerne pruge. Takva kariološka i citogenetička varijabilnost pokazuje da je njihova evolucija obilježena značajnom divergencijom kariotipa. Pokusi križanja kojeg su proveli Furrer i sur. (1998) pokazali su da hibridni potomci mužjaka

vrste *A. astacus* i ženke vrste *A. leptodactylus* uginu dva mjeseca nakon što se izlegu, dakle nikada ne dostignu reproduktivni stadij, dok ženke *A. astacus* odbace jaja nakon oplodnje s mužjakom *A. leptodactylus*. Što se tiče prirodne hibridizacije između vrsta *A. astacus* i *A. leptodactylus* koliko je poznato nema važećeg dokaza da takve hibridne populacije postoje. Smanjena vijabilnost je najvjerojatnije povezana s pogrešnim sparivanjem kromosoma u mejozi zbog kromosomskih razlika koje je pokazalo ovo istraživanje. Brojnost AT bogatih blokova kod vrsta *A. astacus* i *A. leptodactylus* pokazuje da su njihovi genomi sastavljeni od velike količine ponavljajuće DNA kao što je satelitska DNA. Satelitska DNA je važan faktor koji utječe na evoluciju genoma viših biljaka i životinja pa se smatra važnim izvorom genetičke divergencije među vrstama (Lim i sur. 2000.; Mravinac i Plohl 2010.; Sarri i sur. 2011.). Uzevši u obzir spomenutu ulogu satelitske DNA bilo bi korisno izolirati i opisati ponavljajuće sekvence genoma vrsta *A. astacus* i *A. leptodactylus* te ih upotrijebiti za evolucijska istraživanja kod *Astacidae*.

Kod vrste *A. astacus* jedan od dva kromosomska para koji nosi 45S rDNA je izrazito heteromorfan ako se uzme u obzir duljina kromosoma kao i veličina i intenzitet 45S rDNA signala dobivenih fluorescencijskom hibridizacijom *in situ*. Jedan od kromosoma u paru je trostruko veći od drugog, a signal na duljem kromosomu je tri puta veći i intenzivniji nego signal na njegovom homologu. Varijacija u veličini 45S rDNA mjesta na homolognim kromosomima kakva se pojavljuje kod vrste *A. astacus* vjerojatno je rezultat nejednakog krosingovera koji može biti odgovoran za povećanje u duljini većeg 45S rDNA mjesta. Prilikom analize vrste *A. leptodactylus* također je uočena razlika 45S rDNA signala na jednom bivalentu, međutim znatno manja nego kod vrste *A. astacus*. Stoga možemo zaključiti da je i razlika u veličini heteromorfnih homologa kod ove vrste manja nego kod vrste *A. astacus*. Nije uočeno da polimorfizam ima utjecaj na sparivanje i segregaciju kromosoma u mejozi. Polimorfizam u veličini 45S rDNA lokusa uočen je kod mnogih vrsta: vodozemaca (Schmidt 1982), nekih riba (Reed i Philips 1997), sisavaca (Hirai i sur. 1998) i morskih mačaka (Sczepanski i sur. 2010). Foresti i suradnici (1981) uočili su šesterostruku razliku u veličini 45S rDNA mjesta homolognih kromosoma kod nekih vrsta *Eigenmannia sp.* Međutim, ovdje je prvi put primijećen polimorfizam u 45S rDNA lokusu kod *Decapoda*.

Uzevši u obzir značajnu varijabilnost u kariotipovima triju istraživanih vrsta rakova može se zaključiti kako bi daljnja istraživanja koja uključuju metode molekularne citogenetike kod

velikog broja drugih vrsta mogla značajno pridonijeti procijeni smjerova i mehanizama evolucije kariotipa infrareda *Astacidea*.

6. ZAKLJUČAK

Vrste *Astacus astacus*, *A. leptodactylus* i *Austropotamobius torrentium* imaju haploidan broj kromosoma: $n=88$, $n=90$ i $n=82$. Formula kariotipa za vrstu *A. astacus* je $n=88$, $52m+35sm+1a$, a za *A. torrentium* $n=87$, $78m+8sm+1t$. Sve tri istraživane vrste imaju jedan kromosomski par koji je heteromorfnan. Stupanj heteromorfности je različit za sve tri vrste, a najveći je kod vrste *A. astacus* gdje je otkrivena čak četverostruka razlika u veličini kromosma. Sve istraživane vrste imaju centromerne/pericentromerne i interkalarne AT bogate DAPI pozitivne heterokromatinske pruge. Rod *Astacus* karakteriza postojanje centromernih heterokromatinskih pruga na svim kromosomima, dok je za vrstu *A. torrentium* karakterističan izostanak centromernih blokova na nekim kromosomima. U sve tri vrste uočene su intersticijske AT pruge na nekim, obično dužim kromosomima u komplementu.

Fluorescencijskom hibridizacijom *in situ* (FISH) utvrđeno je postojanje dva lokusa za 45S rRNA kod *A. astacus* i *A. leptodactylus*, te jedan dodatni, peti signal kod *A. leptodactylus*. U obje vrste, jedan 45S lokus nalazi se na heteromorfnom kromosomskom paru, a drugi se nalazi na jednom metacentričnom paru kromosoma. Kod vrste *A. astacus* pokazana je čak trostruka razlika u intenzitetu 45S rDNA signala na homolognim kromosomima. Takva razlika u jačini 45S rDNA signala je značajno manje izražena u vrsti *A. leptodactylus*.

Obje vrsta roda *Astacus* tvore različite oblike bivalenata, zvonolike, prstenaste, V oblika i križnog oblika.

Rezultati ovog istraživanja pokazuju kako bi slična istraživanja na većem broju jedinki i vrsta mogla pomoći u rasvjetljavanju evolucijskih puteva i filogenetskih odnosa unutar ove skupine rakova.

7. LITERATURA

1. Bernska konvencija 2002. Europska direktiva o zaštiti prirodnih staništa i divlje faune i flore. Online: <<http://conventions.coe.int/treaty/FR/Treaties/Html/104-3.htm>>.
2. Bezault, E., Clota, F., Derivaz, M., Chevassus, B., Baroiller, J.-F. 2007. Sex determination and temperature-induced sex differentiation in three natural populations of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) adapted to extreme temperature conditions. *Aquaculture*, **272S1**, S3–S16, doi:10.1016/j.aquaculture.2007.07.227.
3. Biosciences 2013. HOOK™ dye labeling kit (FITC). U: G-Biosciences. Online: <<http://www.gbiosciences.com/HOOKDyeLabelingFITC-desc.aspx>>.
4. Camacho, J. P. M., Sharbel, T. F., Beukeboom, L. W. 2000. B-chromosome evolution. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, **355**, 163-178.
5. Ciofi, C., Swingland, I. R. 1997. Environmental sex determination in reptiles. *Applied animal behaviour science*, **51**, 251-265.
6. Clarke, L. 1998. Centromeres: proteins, protein complexes, and repeated domains at centromeres of simple eukaryotes. *Current opinion in genetics & development*, **8**, 212-218.
7. Crandall, K. A., Buhay, J. E. 2008. Global diversity of crayfish (*Astacidae*, *Cambaridae*, and *Parastacidae* – *Decapoda*) in freshwater. *Hydrobiologia*, **595**, 295-301, doi:10.1007/s10750-007-9120-3.
8. Crandall, K. A., Harris, D. J., Fetzner Jr, J. W. 2000. The monophyletic origin of freshwater crayfish estimated from nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, **267**, 1679-1686, doi:10.1098/rspb.2000.1195.
9. Cukerzis, J. M., 1988. *Astacus astacus* in Europe. U: Holdich, D. M., Lowery, R. S. (ur.) *Freshwater crayfish: biology, management and exploitation*. Cambridge University Press, Cambridge, 309-340.
10. De Grave, S., Pentcheff, N. D., Ahyong, S. T., Chan, T.-Y., Crandall, K. A., Dworschak, P. C., Felder, D. L., Feldmann, R. M., Fransen, C. H. J. M., Goulding, L. Y. D., Lemaitre, R., Low, M. E. Y., Martin, J. W., Ng, P. K. L., Schweitzer, C. E., Tan, S. H., Tshudy,

- D., Wetzer, R. 2009. A classification of living and fossil genera of decapod crustaceans. Raffles bulletin of zoology, Supplement, **21**, 1–109.
11. de Quieroz, K., Gauthier, J. 1992. Phylogenetic taxonomy. Annual review of ecology and systematics, **23**, 449-480.
 12. Devlin, R. H., Nagahama, Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. Aquaculture, **208**, 191-364.
 13. Diupotex Chong, M. E., Foster, N. R., Zarate, C. A. 1997. A cytogenetic study of the crayfish *Procambarus digueti* (Bouvier, 1897) (*Decapoda*, *Cambaridae*) from lake Camecuaro, Michoacan, Mexico. Crustaceana, **70**, 875-885.
 14. Edsman, L., Füreder, L., Gherardi, F., Souty-Grosset, C. 2010. *Astacus astacus*. U: IUCN 2013. IUCN crvena lista ugroženih vrsta. Verzija 2013.1. <www.iucnredlist.org>. Online: <<http://www.iucnredlist.org/details/2191/0>>.
 15. EOL, 2013. Encyclopedia of life. Online: <http://eol.org/data_objects/5912298>.
 16. Europska direktiva o zaštiti prirodnih staništa i divlje faune i flore 2007. Online <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1992:206:0007:0050:EN:PDF>>.
 17. Faller, M., Maguire, I., Klobučar, G. 2006. Annual *activity of the noble crayfish (Astacus Astacus)* in the Orłjava river (Croatia). BFPP: Bulletin francais de la peche et de la pisciculture, **383**, 23-40.
 18. Fasten, N., 1914. Spermatogenesis of the American crayfish, *Cambarus virilis* and *C. immunis* (?), with special reference to synapsis and the chromatoid bodies. Journal of morphology, **25**, 587-694.
 19. Felgenhauer, B. E. 1992. Internal anatomy of the Decapoda: An overview. U: Harrison, F. W., Humes, A. G. (ur.) Microscopic anatomy of invertebrates, volume 10: Decapod *Crustacea*. Wiley-Liss, New York, 44-75.
 20. Fetzner 2010. The crayfish and lobster taxonomy browser. Online: <<http://iz.carnegiemnh.org/crayfish/NewAstacidea/infraorder.asp?io=Astacidea>>..
 21. Fetzner 2010. The crayfish and lobster taxonomy browser. Online: <<http://iz.carnegiemnh.org/crayfish/NewAstacidea/species.asp?g=Astacus&s=leptodactylus&ssp=>>>.

22. Fetzner, J. W., Crandall, K. A. 2002. Genetic variation. U: Holdich, D. M. (ur.) Biology of freshwater crayfish. Blackwell Science, Oxford, 291-326.
23. Foresti, F., Almeida Toledo, L. F., Toledo, S. A. F. 1981. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. Cytogenetics and cell genetics, **31**, 137-144.
24. Fratini, S., Zaccara, S., Barbaresi, S., Grandjean, F., Souty-Grosse, C., Crosa, G., Gherardi, F. 2005. Phylogeography of the threatened crayfish (genus *Austropotamobius*) in Italy: implications for its taxonomy and conservation. Heredity, **94**, 108–118.
25. Füreder, L., Gherardi, F., Souty-Grosset, C. 2010. *Austropotamobius torrentium*. U: IUCN 2013. IUCN crvena lista ugroženih vrsta. Verzija 2013.1. <www.iucnredlist.org>. Online: <<http://www.iucnredlist.org/details/2431/0>>.
26. Füreder, L., Machino, Y. 2002. A revised determination key of freshwater crayfish in Europe. Berichte des naturwissenschaftlich-medizinischen vereins in Innsbruck, **89**, 169 – 178.
27. Furrer, S. C., Cantieni, M., Duvoisin, N. 1998. Freshly hatched hybrids between *Astacus astacus* and *Astacus leptodactylus* differ in chela shape from purebred offspring. Freshwater crayfish, **12**, 90-97.
28. GeneticsSuite, 2013. Online: <geneticssuite.net/node/16>
29. Gherardi, F., Souty-Grosset, C. 2010. *Astacus leptodactylus*. U: IUCN 2013. IUCN crvena lista ugroženih vrsta. Verzija 2013.1. <www.iucnredlist.org>. Online: <<http://www.iucnredlist.org/details/153745/0>>.
30. Gomes, N. M. V., Shay, J. W., Wright, W. E. 2010. Telomere biology in *Metazoa*. FEBS letters, 584, 3741–3751, doi:10.1016/j.febslet.2010.07.031.
31. Gottstein, S., Kerovec M., Maguire, I., Bukvić, I. 1999. Ecological notes on *Autropotamobius pallipes italicus* (Faxon, 1914) (*Decapoda*, *Astacidae*) in a karstic spring of Neretva delta (Croatia). Freshwater crayfish, **12**, 620-627.
32. Guttman, B. S. 1999. Biology. WCB/McGraw-Hill, Boston.
33. Hall, A. E., Keith, K. C., Hall, S. E., Copenhaver, G. P., Preuss, D. 2004. The rapidly evolving field of plant centromeres. Current opinion in plant biology, **7**, 108–114, doi:10.1016/j.pbi.2004.01.008.

34. Hirai, H., Hasegawa, Y., Kawamoto Y., Tokita, E. 1998. Tandem duplication of nucleolus organizer region (NOR) in the Japanese macaque, *Macaca fuscata fuscata*. Chromosome research, **6**, 191-197.
35. Hobbs Jr, H. H. 1974. Synopsis of the families and genera of crayfishes (*Crustacea: Decapoda*). Smithsonian contributions to zoology, **164**, 1-32.
36. Holdich, D.M. 2002. Distribution of crayfish in Europe and some adjoining countries. Bulletin francais de la peche et de la pisciculture, **367**, 611-650.
37. Holdich, D.M., Reynolds, J.D., Souty-Grosset, C., Sibley, P. J. 2009. A review of the ever increasing threat to European crayfish from non-indigenous crayfish species. Knowledge and management of aquatic ecosystems, **11**, 394-395.
38. Hudina, S., Faller, M., Lucić, A., Klobučar, G., Maguire, I. 2009. Distribution and dispersal of two invasive crayfish species in the Drava river basin, Croatia. Knowledge and management of aquatic ecosystems, **9**, 394-395.
39. Jones, N., Houben, A. 2003. B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome? Trends in plant science, **8**(9), 417-423, doi:10.1016/S1360-1385(03)00187-0.
40. Kour, G., Kour, B., Koul, S., Dhar, M. K. 2012. Analysis of the morphological effects of B chromosomes in a population of *Plantago lagopus*. Journal of microbiology and biotechnology research, **2**(4), 598-602.
41. Lécher, P., Defaye, D., Noel, P. 1992. Chromosomes and nuclear DNA of Crustacea. Paper presented at the First European Crustacean Conference, Paris, August 31 - September 5, 1-42.
42. Leitão, A., Chaves, R., Joaquim, S., Matias, D., Ruano, F., Guedes-Pinto, H. 2008. Supernumerary chromosomes on Southern European populations of the cockle *Cerastoderma edule*: Consequence of environmental pollution?. Estuarine, coastal and shelf science, **79**, 152–156, doi:10.1016/j.ecss.2008.03.015.
43. Levan, A., Fredga, K., Sandberg, A. 1964. Nomenclature for centromeric position of chromosomes. Hereditas, **52**, 201-220.
44. Lewis, R. 1999. Human genetics: concepts and applications, 3. Izdanje, WCB/McGraw-Hill, Boston.

45. Lim, K. Y., Matyášek, R., Lichtenstein C. P., Leitch, A. R. 2000. Molecular cytogenetic analyses and phylogenetic studies in the *Nicotiana* section *Tomentosae*. *Chromosoma*, **109**, 245-258.
46. Londoño-Vallejo, J. A. 2004. Telomere length heterogeneity and chromosome instability. *Cancer letters*, **212**, 135–144, doi:10.1016/j.canlet.2004.05.008.
47. Maguire, I., Gottstein Matočec, S. 2004. The distribution pattern of freshwater crayfish in Croatia. *Crustaceana*, **77**(1), 25-49.
48. Maguire, I., Jelić, M., Klobučar, G. 2011. Update on the distribution of freshwater crayfish in Croatia. *Knowledge and management of aquatic ecosystems*, **401**, 31-41.
49. Malik, H. S., Henikoff, S. 2002. Conflict begets complexity: the evolution of centromeres. *Current opinion in genetics & development*, **12**, 711–718.
50. Marschner, S., Meister, A., Blattner, F. R., Houben, A. 2007. Evolution and function of B chromosome 45SrDNA sequences in *Brachycome dichromosomatica*. *Genome*, **50**, 638–644, doi:10.1139/G07-048.
51. Martin, J. W., Davis, G. E. 2001. An updated classification of the recent *Crustacea*. Natural History Museum of Los Angeles county, Science series 39, Los Angeles.
52. Mason, C. E., State, M. W., Moldin, S. O. 2009. Genome, transcriptome, and proteome. Charting a new course to understanding the molecular neurobiology of mental disorders. U: Sadock, B. J. , Sadock, V. A., Ruiz, P. (ur.) Kaplan and Sadock's comprehensive textbook of psychiatry, 9th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 147–161.
53. Mlinarec, J., Mužić, M., Pavlica, M., Šrut, M., Klobučar, G., Maguire, I. 2011. Comparative karyotype investigations in the European crayfish *Astacus astacus* and *A. leptodactylus* (*Decapoda*, *Astacidae*). *Crustaceana*, **84**(12-13), 1497-1510, doi:10.1163/156854011x607015
54. Mlinarec, J., Papeš, D, Besendorfer, V. 2006. Ribosomal, telomeric and heterochromatin sequences localization in the karyotype of *Anemone hortensis*. *Botanical journal of the Linnean Society*, **150**, 177-186.
55. Mlinarec, J., Šatović, Z., Malenica, N., Ivančić-Baće, I., Besendorfer, V. 2012. Evolution of the tetraploid *Anemone multifida* (2n= 32) and hexaploid *A. baldensis* (2n= 48) (*Ranunculaceae*) was accompanied by rDNA loci loss and intergenomic translocation:

- evidence for their common genome origin. *Annals of Botany* 110: 703–712, doi:10.1093/aob/mcs128.
56. Mlinarec, J., Šatović, Z., Mihelj, D., Malenica, N. Besendorfer, V. 2012. Cytogenetic and phylogenetic studies of diploid and polyploidy members of tribe *Anemoninae* (*Ranunculaceae*). *Plant Biology*, **14**, 525–536, doi:10.1111/j.1438-8677.2011.00519.x.
 57. Mravinac, B., Plohl, M. 2010. Parallelism in evolution of highly repetitive DNAs in sibling species. *Molecular biology and evolution*, **27**(8), 1857-1867.
 58. Murnane, J. P. 2012. Telomere dysfunction and chromosome instability. *Mutation research/Fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*, **730**, 28– 36, doi:10.1016/j.mrfmmm.2011.04.008.
 59. Murofushi, M., Deguchi, Y., Yosida, T. H. 1984. 79. Karyological study of the red swamp crayfish and the Japanese lobster by air-drying method. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, **60**(8), 306-309.
 60. Niiyama, H. 1934. The Chromosomes of the crayfish, *Cambaroides Japonicus* (De Haan). *Journal of the Faculty of Science, Hokkaido Imperial University, Series VI, Zoology*, **3**(2), 41-53.
 61. Niiyama, H., 1962. On the unprecedentedly large number of chromosomes of the crayfish *Astacus trowbridgii* Stimpson. *Annotationes zoologicae Japonenses*, **35**, 229-233.
 62. Nyström, P. 2002. Ecology. U: Holdich, D. M. (ur.) *Biology of freshwater crayfish*. Blackwell Science, Oxford, 192-235.
 63. Pavlica, M. 2012. Mrežni udžbenik iz genetike. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb. Online: <<http://www.genetika.biol.pmf.unizg.hr/index.html>>.
 64. Pidoux, A. L., Allshire, R. C. 2000. Centromeres: getting a grip of chromosomes. *Current opinion in cell biology*, **12**, 308-319.
 65. Plohl, M. 2010. Those mysterious sequences of satellite DNAs. *Periodicum biologorum*, **112**(4), 403–410.
 66. Pravilnik o proglašavanju divljih svojti zaštićenim i strogo zaštićenim 2009. NN 99/09.
 67. Prowazek, S. 1902. Ein Beitrag zur Krebspermatogenese. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*, **71**, 445-456.
 68. Rakovi 2013. Online: <<http://rakovi.biol.pmf.unizg.hr/rakovi/index.htm>>.

69. Reed, K. M., Philips, R.B. 1997. Polymorphism of the nucleolus organizer region (NOR) on the putative *sex chromosomes* of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) is not sex related. *Chromosome research*, **5**, 221-227.
70. Reynolds, J. D. 2002. Growth and reproduction. U: Holdich, D. M. (ur.) *Biology of freshwater crayfish*. Blackwell Science, Oxford, 152-191.
71. Rousseau-Gueutin, M., Gaston, A., Ainouche, A., Ainouche, M. L., Olbricht, K., Staud, G., Richard, L., Denoyes-Rothan, B. 2009. Tracking the evolutionary history of polyploidy in *Fragaria* L. (strawberry): New insights from phylogenetic analyses of low-copy nuclear genes. *Molecular phylogenetics and evolution*, **51**, 515–530, doi:10.1016/j.ympev.2008.12.024.
72. Sarri, V., Ceccarelli, M., Cionini, P. G. 2011. Quantitative evolution of transposable and satellite DNA sequences in *Picea* species. *Genome*, **54**(5), 431-435.
73. Scalici, M., Solano, E., Gibertini, G. 2010. Karyological analyses on the Australian crayfish *Cherax destructor* (*Decapoda: Parastacidae*). *Journal of crustacean biology*, **30**(3), 528-530.
74. Schmidt, M. 1982. Chromosome banding in *Amphibia*. VII. Analysis of the structure and variability of NORs in *Anura*. *Chromosoma*, **87**, 327-344.
75. Scholtz, G. 2002. Phylogeny and evolution. U: Holdich, D. M. (ur.) *Biology of freshwater crayfish*. Blackwell Science, Oxford, 30-52.
76. Szczepanski, T. S., Noletto, R. B., Cestari, M. M., Artoni, R. F. 2010. A comparative study of two marine catfish (*Siluriformes, Ariidae*): Cytogenetic tools for determining cytotaxonomy and karyotype evolution. *Micron*, **41**, 193–197, doi:10.1016/j.micron.2009.11.004.
77. Sellars, M. J., Li, F., Preston, N. P., Xiang, J. 2010. Penaeid shrimp polyploidy: Global status and future direction. *Aquaculture*, **310**, 1–7, doi:10.1016/j.aquaculture.2010.10.002.
78. Sharma, A. K., Sharma, A. 1972. *Chromosome techniques — theory and practice*. Butterworth Publishers, London.
79. Sheng, M., Wang, L., Tian, X., 2013. Identification of the full set of *Fagopyrum esculentum* trisomics by heterochromatin banding analysis and rDNA physical mapping. *Scientia horticulturae*, **155**, 15–23, doi:dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2013.02.027.

80. Silver, D., Cukerzis, J. M. 1964. The number of chromosomes in *Astacus leptodactylus*. *Tsitologiya*, **6**, 631-633.
81. Sinclair, E. A., Fetzner Jr, J. W., Buhay, J., Crandall, K. A. 2004. Proposal to complete a phylogenetic taxonomy and systematic revision for freshwater crayfish (*Astacidea*). *Freshwater crayfish*, **14**, 21-29.
82. Skurdal, J., Taugbøl, T. 2002. *Astacus*. U: Holdich, D. M. (ur.) *Biology of freshwater crayfish*. Blackwell Science, Oxford, 467-510.
83. Śmietana, P., Schulz, H. K., Keszka, S., Schulz, R. 2006. A proposal for accepting *Pontastacus* as a genus of European crayfish within the family *Astacidae* based on a revision of the West and East European taxonomic literature. *Bulletin francais de la peche et de la pisciculture*, **380-381**, 1041-1052.
84. Soltis, D. E., Soltis P. S. 1999. Polyploidy: Recurrent formation and genome evolution. *Trends in ecology & evolution*, **14** (9), 348-352.
85. Stewart, J. A., Chaiken, M. F., Wang, F., Price, C. M. 2012. Maintaining the end: Roles of telomere proteins in end-protection, telomere replication and length regulation. *Mutation research/Fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*, **730**, 12–19, doi:10.1016/j.mrfmmm.2011.08.011.
86. Tamarin, R. H. 1999. *Principles of genetics*, sixth edition. WCB/McGraw-Hill, Boston.
87. Tan, X., Qin, J. G., Chen, B., Chen, L., Li, X. 2004. Karyological analyses on redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (*Decapoda: Parastacidae*). *Aquaculture*, **234**, 65–76, doi:10.1016/j.aquaculture.2003.12.020.
88. Taylor, C. A. 2002. *Taxonomy and conservation of native crayfish stocks*. U: Holdich, D. M. (ur.) *Biology of freshwater crayfish*. Blackwell Science, Oxford, 236-257.
89. Thermo 2013. DAPI nuclear counterstain. U: Thermo scientific 2013. Online: <<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=01041204>>.
90. Torres-Ruiz, R.A., Hemleben, V. 1994. Pattern and degree of methylation in ribosomal RNAs of *Cucurbita pepo* L. *Plant molecular biology*, **26**, 1167-1179.
91. Trontelj, P., Machino, Y., Sket, B. 2005. Phylogenetic and phylogeographic relationships in the crayfish genus *Austropotamobius* inferred from mitochondrial COI gene sequences. *Molecular phylogenetics and evolution*, **34**, 212–226, doi:10.1016/j.ympev.2004.09.010.

92. Vagnarelli, P., Ribeiro, S.A., Earnshaw, W.C. 2008. Centromeres: Old tales and new tools. *FEBS letters*, **582**, 1950–1959, doi:10.1016/j.febslet.2008.04.014.
93. Zakon o zaštiti prirode, 2013. NN 80/13.