

Genetska raznolikost populacija potočnog raka Austropotamobius torrentium (Schrank, 1803) u Hrvatskoj

Bonassin, Lena

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:686491>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

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

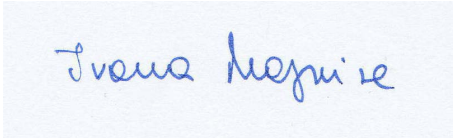


Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Lena Bonassin

**Genetska raznolikost populacija potočnog
raka *Austropotamobius torrentium*
(Schrank, 1803) u Hrvatskoj**

Diplomski rad



Ivana Mejnić

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za molekularne analize na Zoologijskom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod voditeljstvom prof. dr. sc. Ivane Maguire te neposrednim voditeljstvom Leone Lovrenčić, mag. biol. exp. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Hvala mojoj mentorici prof.dr.sc. Ivani Maguire na podršci, pomoći, savjetima i strpljenju tijekom pisanja ovog rada. Zahvalna sam za svo znanje i prilike koje ste mi pružili tijekom proteklih godina.

Hvala Leoni Lovrenčić, mag.biol.exp. na vodstvu kroz ovo istraživanje, na strpljenju za sva moja pitanja, svim savjetima i pomoći svaki put kada je zapelo.

„Bello, bello e (im)possibile“

Hvala Ljudevitu, Antoniji, Ani i Danielu, na prijateljstvu i podršci tijekom studiranja.

Hvala mojim matematičarkama koje su studiranje učinile posebno zabavnim.

Sara, mama, papà. Hvala što ste uvijek vjerovali u mene. Hvala mojoj obitelji. *„...oun bafito soula ganassa.“*

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Genetska raznolikost populacija potočnog raka *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803) u Hrvatskoj

Lena Bonassin

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Potočni rak, *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803), je nativna europska slatkovodna vrsta iz porodice Astacidae koja nastanjuje manje vodotoke na višim nadmorskim visinama. Rakovi porodice Astacidae su ključne vrste slatkovodnih ekosustava, a brojnost njihovih populacija, uključujući i populacija potočnog raka, je pod utjecajem raznih čimbenika koji dovode do značajnog smanjenja broja i veličina populacija. U ovom istraživanju razvijeni su novi mikrosatelitni markeri specifični za potočnog raka te su upotrebljeni u istraživanju genetske raznolikosti populacija ove vrste na području Hrvatske. Od 35 novorazvijenih markera, nakon testiranja, njih četiri su potvrđeni kao prikladni te su, uz četiri prethodno razvijena, korišteni za istraživanje populacijske strukture. Istraživanje je provedeno na 437 jedinki iz 17 populacija korištenjem osam mikrosatelitnih lokusa. Rezultati pokazuju veliku raznolikost populacija koje su grupirane prema geografskoj poziciji i filogrupama određenih na temelju mitohondrijske DNA. Rezultati ovog rada pridonose novim spoznajama o potočnom raku te su primjenjivi u izradi adekvatnih planova zaštite i upravljanja.

(42 stranica, 8 slika, 7 tablica, 84 literaturnih navoda, 9 priloga, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: mikrosatelitni lokusi, populacijska struktura, konzervacija

Voditelj: prof.dr.sc. Ivana Maguire

Neposredni voditelj: Leona Lovrenčić, mag. biol. exp.

Ocjenitelji: prof. dr. sc. Ivana Maguire

doc. dr. sc. Marin Ježić

doc. dr. sc. Nenad Malenica

Rad prihvaćen: 17.2.2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

Genetic diversity of the stone crayfish *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803) populations in Croatia

Lena Bonassin

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

The stone crayfish, *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803), is a native European freshwater species of the family Astacidae that inhabits smaller waterbodies at higher altitudes. Freshwater crayfish are keystone species of freshwater ecosystems. The abundance of their populations, including those of the stone crayfish, is influenced by various factors that lead to a significant decline in the number and size of populations. In this research, new microsatellite markers, specific for *A. torrentium*, were developed. After testing 35 newly developed markers, four were confirmed as suitable. In addition, four previously developed microsatellite markers were used to study population structure of *A. torrentium* in Croatia. The study was conducted on 437 individuals from 17 populations using eight microsatellite loci. The results show a large diversity of populations grouped according to their geographical position and to phylogroups determined based on mitochondrial DNA. The results of this research contribute to the knowledge on stone crayfish and are applicable in the development of adequate protection and management plans.

(42 pages, 8 figures, 7 tables, 84 references, 9 attachments, original in: croatian)

Thesis deposited in Central Biological Library

Keywords: microsatellite loci, population structure, conservation

Supervisor: Prof. Ivana Maguire, PhD

Assistant Supervisor: Leona Lovrenčić, MSc

Reviewers: Prof. Ivana Maguire, PhD

Asst. Prof. Marin Ježić, PhD

Asst. Prof. Nenad Malenica, PhD

Thesis accepted: 17.2.2021.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Slatkovodni rakovi.....	1
1.2. Potočni rak.....	2
1.3. Istraživanja populacijske genetike.....	5
1.3.1. Mikrosateliti.....	5
1.4. Primjena mikrosatelitnih markera u konzervaciji vrste.....	7
2. Cilj istraživanja.....	9
3. Materijali i metode.....	10
3.1. Kemikalije i pribor.....	10
3.2. Područje istraživanja i materijal.....	11
3.3. Dizajn i odabir početnica.....	12
3.4. Testiranje novorazvijenih mikrosatelitnih lokusa.....	12
3.5. Selekcija najprikladnijih mikrosatelitnih lokusa za korištenje u analizi populacijske genetike potočnog raka.....	13
3.6. Genetska raznolikost populacija.....	15
3.7. Genetska struktura populacija.....	16
4. Rezultati.....	17
4.1. Uspješnost amplifikacije mikrosatelitnih lokusa.....	17
4.2. Genotipizacija.....	17
4.3. Genetska raznolikost populacija.....	18
4.4. Genetska struktura populacija.....	22
5. Rasprava.....	28
6. Zaključak.....	33
7. Literatura.....	34
8. Prilozi.....	42

Kratice

16S rRNA – 16S ribosomska RNA

A_{PR} – broj privatnih alela

A_R – alelna bogatstvo

COI – citokrom c oksidaza podjedinica 1

D_A – Nei genetske udaljenosti

DD – engl. *data deficient*, nedovoljno istražena vrsta

ESU – engl. *Evolutionary Significant Unit*, evolucijski značajna jedinica

F_{IS} – koeficijent parenja u bliskom srodstvu

F_{ST} – fiksacijski indeks

H_E – očekivana heterozigotnost

H_O – uočena heterozigotnost

HWE – Hardy-Weinbergova ravnoteža

IAM – engl. *infinite allele model*

ITS2 – engl. *internal transcribed spacer 2*, unutarnja transkribirajuća razmaknica 2

IUCN – engl. *International Union for Conservation of Nature*, Međunarodne unije za očuvanje prirode

MCMC – engl. *Monte Carlo Markov chain*, Monte Carlo markovljevi lanci

mtDNA – mitohondrijska DNA

MU – engl. *management unit*, jedinica upravljanja

N_A – broj alela

NGS – engl. *Next Generation sequencing*, sekvenciranje novih generacija

PCoA – analiza glavnih koordinata

SMM – engl. *stepwise mutation model*

SNP – engl. *Single Nucleotide Polymorphism*, polimorfizmi pojedinačnog nukleotida

SSR – engl. *Simple Sequence Repeat*, jednostavne ponavljajuće sekvence

STR – engl. *Short Tandem Repeats*, kratke uzastopno ponavljajuće sekvence

TPM – engl. *two phase model*

VNTR – engl. *Variable Number Tandem Repeat*, varijabilni uzastopno ponavljajući slijed

VU – engl. *vulnerable*, osjetljiva vrsta

1. Uvod

1.1. Slatkovodni rakovi

Slatkovodni rakovi porodice Astacidae pripadaju podredu Astacidea (red Decapoda, deseteronožni rakovi) koji uključuje pet porodica s 38 rodova te preko 640 opisanih vrsta (Crandall i De Grave 2017). Porodica Astacidae prirodno je rasprostranjena u Europi, Aziji i Sjevernoj Americi, a čine ju četiri roda: *Austropotamobius* (Skorikov, 1907), *Astacus* (Fabricius, 1775), *Pontastacus* (Bott, 1950) i *Pacifastacus* (Bott, 1950) (Crandall i De Grave 2017). Na području Europe, jedina je autohtona porodica slatkovodnih rakova. Vrste ove porodice nastanjuju slatkovodne vodotoke od Urala do Iberijskog poluotoka te Skandinavskog poluotoka do Balkana (Kouba i sur. 2014).

Na području Hrvatske obitavaju četiri autohtone vrste: potočni rak *Austropotamobius torrentium* (Schränk, 1803), bjelonogi ili primorski rak *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858), riječni ili plemeniti rak *Astacus astacus* (Linnaeus, 1758) te uskoškari, turski ili barski rak *Pontastacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823). Vrsta *A. torrentium* rasprostranjena je u potocima kontinentalne Hrvatske na višim nadmorskim visinama; *A. pallipes* na području Istre, Like i Dalmacije; *A. astacus* u kontinentalnom dijelu Hrvatske u rijekama dunavskog sliva te *P. leptodactylus* u istočnoj i središnjoj Hrvatskoj (Maguire i sur. 2011).

Slatkovodni rakovi su ključne vrstama slatkovodnih ekosustava. Održavaju ravnotežu staništa zbog veličine tijela, duljine života, brojnosti, načina hranjenja. Važni su zbog svog utjecaja i promjena koje unose u strukturu i funkciju ekosustava, a gubitak populacija može ugroziti bioraznolikost cijelog staništa (Reynolds i Souty-Grosset 2012). Različiti faktori utječu na rasprostranjenost i brojnost populacija. Najveću ugrozu predstavljaju negativan antropogeni utjecaj: onečišćenje voda, uništavanje staništa te unos stranih invazivnih vrsta slatkovodnih rakova. Unesene strane vrste potiskuju autohtone vrste te prenose patogen *Aphanomyces astaci* Shikora, 1906 koji uzrokuje bolest račju kugu. Europske autohtone vrste rakova najčešće nisu otporne na patogen što je uzrokovalo veliki pad broja populacija (Holdich i sur. 2009).

1.2. Potočni rak

Potočni rak najmanja je vrsta porodice Astacidae (Slika 1). Rasprostranjena je u centralnoj i jugoistočnoj Europi od Njemačke i Češke na sjeveru, Luksemburga na zapadu, Grčke na jugu te Turske i Bugarske na istoku (Kouba i sur. 2014). Nastanjuje vodotoke na višim nadmorskim visinama te je u Hrvatskoj rasprostranjen u rijekama crnomorskog i jadranskog sliva. Prirodna staništa vrste nalaze se u izvorišnim te gornjim dijelovima potoka prosječne godišnje temperature vode do 10 °C, brzog strujanja i kamenitog dna. Potočni rak preferira staništa s puno zaklona (kamenje, korijenje, rupe u obali...) i razvijenom obalnom vodenom vegetacijom za sakrivanje tijekom dnevnog mirovanja, hladnog zimskog perioda i perioda suše (Maguire 2014). Brojnost jedinki u određenom staništu proporcionalna je količini zaklona koji pružaju zaštitu od predatora i odnošenja strujanjem vode (Vlach i sur. 2009).



Slika 1. Potočni rak, *Austropotamobius torrentium* (autor fotografije: D. Lešić).

Nedavnim istraživanjima u Europi i Hrvatskoj, kao i kod ostalih autohtonih vrsta, zabilježen je značajni pad broja jedinki potočnog raka. Prirodna staništa ove vrste su izolirana, međusobno odvojena što onemogućuje prirodnu rekolonizaciju kada dođe do nestanka lokalne populacije (Maguire i sur. 2018). Uzroci smanjenja broja populacija su mnogobrojni, a najčešći je negativni antropogeni utjecaj na stanište ove vrste (Maguire i sur. 2011).

Onečišćenje vodotoka i njihova regulacija, uništavanje obalne vegetacije procesi su koji prate urbanizaciju, a onemogućavaju preživljavanje ove vrste. Potočni rak je vrsta osjetljiva na promjene u kvaliteti i temperaturi vode. Iz tog razloga, klimatske promjene koje se manifestiraju kao periodi ekstremne i dugotrajne suše, predstavljaju izazov za preživljavanje populacija ove vrste (Kouba i sur. 2016).

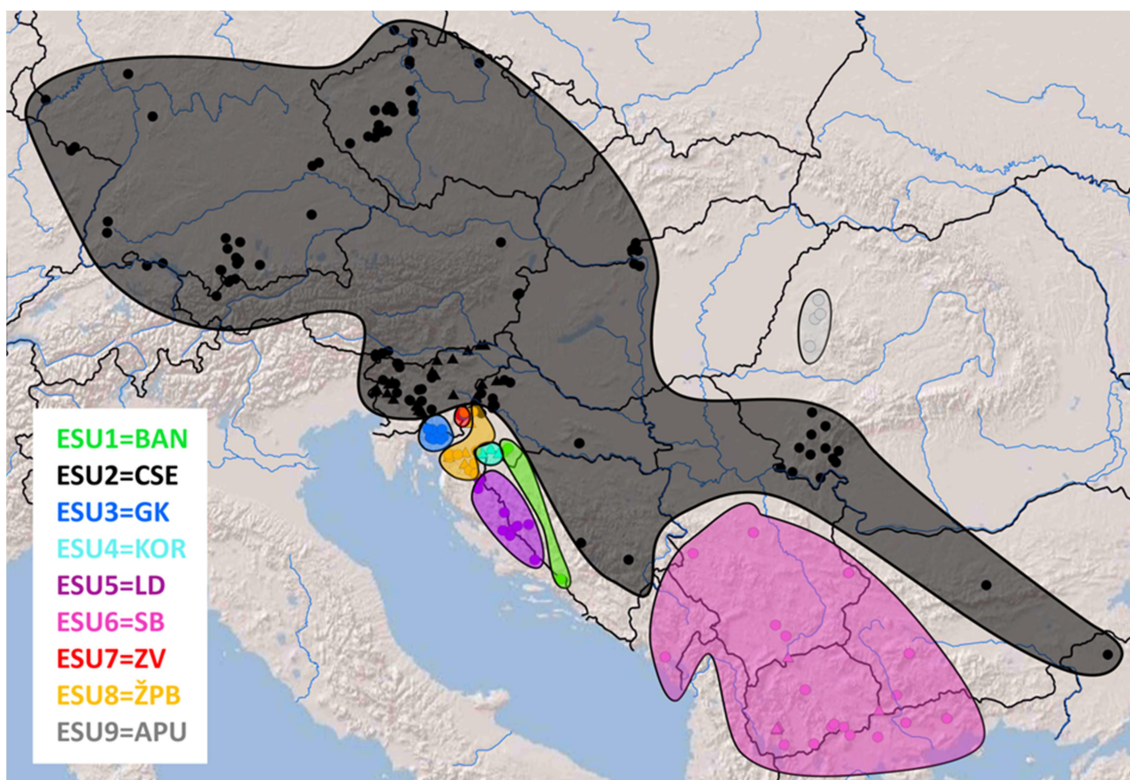
Ugrozu vrsti predstavljaju i invazivne strane vrste slatkovodnih rakova koji se šire prirodno ili potpomognuto nezakonitim unosima od strane ljudi. Invazivne strane vrste utječu na rasprostranjenost autohtonih populacija, dominiraju u kompeticiji za hranom i staništem (Holdich i sur. 2009). Njihova uspješnost omogućena je velikom sposobnošću prilagodbe i preživljavanja okolišnih ekstrema, kao što su suša, temperaturni ekstremni ili smanjena kvaliteta vode. Uz to, brzo rastu, rano postižu spolnu zrelost i posjeduju veći fekunditet od autohtonih vrsta (Souty-Grosset i sur. 2004). Također, strane vrste su prijenosnici patogena *A. astaci* koji uzrokuje bolest račje kuge koja je najčešće letalna za autohtone vrste.

Potočni rak je ugrožena vrsta zaštićena nacionalnim i međunarodnim zakonima. Na nacionalnoj razini zaštićena je Zakonom o zaštiti prirode (NN 80/13) i Pravilnikom o strogo zaštićenim vrstama (NN 144/13) te je uvrštena kao osjetljiva vrsta (VU, engl. *vulnerable*) u Crveni popis rakova slatkih i boćatih voda Hrvatske (Gottstein i sur. 2011). Na međunarodnoj razini, potočni rak se nalazi na Crvenom popisu ugroženih svojti Međunarodne unije za očuvanje prirode (IUCN) kao nedovoljno istražena vrsta (DD, engl. *data deficient*) (Füreder i sur. 2010) te je uvrštena u Dodatak III Konvencije o zaštiti europskih divljih vrsta i prirodnih staništa i u Dodatak II i Dodatak V Direktive o zaštiti prirodnih staništa i divlje faune i flore (Council directive 92/43/EEC, 2000).

Jugoistočna Europa predstavlja jednu od vrućih točaka (engl. *hot spots*) europske bioraznolikosti vrsta. Balkanski poluotok, koji je tijekom glacijacija bio utočište za mnoge taksone je u postglacijalnom periodu bio izvor rekolonizacije središnje i sjeverne Europe za mnoge terestričke i vodene vrste (Hewitt 2011). Danas regiju karakterizira visoka endemičnost slatkovodne i subterestričke faune lokalizirane u uskim/malim područjima i s malim veličinama populacija (Bănărescu 2004). Potočni rak je vrsta prilagođena na uvjete u hladnim vodotocima te je njena rasprostranjenost usko povezana s krškim reljefom (Klobučar i sur. 2013). Fragmentirana paleohidrografija dinarskog krša omogućila je stvaranje biogeografskih barijera, zaštitu tijekom glacijacija i stanište s konstantnim uvjetima

temperature vode što je dovelo do velike raznolikosti i filogeografske strukturiranosti potočnog raka, ali i mnogih drugih taksona (Hewitt 2011; Lovrenčić i sur. 2020a).

Na temelju analize mitohondrijskih gena citokrom c oksidaze podjedinice 1 (*COI*) i 16S rRNA gena te nuklearne regije *ITS2* (engl. *internal transcribed spacer 2*) utvrđeno je postojanje devet filogrupa unutar vrste *A. torrentium* koje predstavljaju zasebne evolucijski značajne jedinice (engl. *Evolutionary Significant Unit*, ESU) (Lovrenčić i sur. 2020a). Također, između jedinki različitih filogrupa nisu pronađene jasne razlike u morfometrijskim karakteristikama (Maguire i sur. 2017; Lovrenčić i sur. 2020b) zbog čega je predloženo da ih se smatra kriptičnim podvrstama (Lovrenčić i sur. 2020a). Kriptičke podvrste, odnosno ESU nazvane su prema geografskim područjima na kojima su populacije rasprostranjene: Banovina (BAN), Središnja i jugoistočna Europa (CSE), Gorski kotar (GK), Kordun (KOR), Lika i Dalmacija (LD), južni Balkan (SB), Zeleni vir (ZV), Žumberak, Plitvice i Bjelolasica (ŽPB) i Apuzeni (APU) (Slika 2).



Slika 2. Geografska distribucija različitih mtDNA filogrupa, odnosno predloženih ESU, preuzeto iz Lovrenčić i sur. 2020a. Različite boje označavaju različite ESU: Banovina (BAN), Središnja i jugoistočna Europa (CSE), Gorski kotar (GK), Kordun (KOR), Lika i Dalmacija (LD), južni Balkan (SB), Zeleni vir (ZV), Žumberak, Plitvice i Bjelolasica (ŽPB) i Apuzeni (APU)

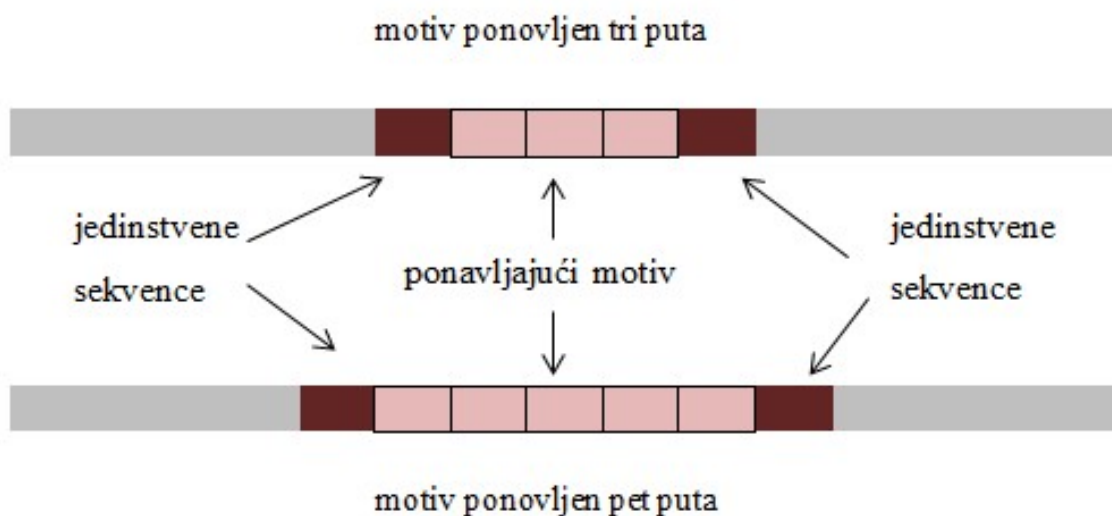
1.3. Istraživanja populacijske genetike

Populacijska genetika proučava genetsku strukturu populacija, njihovu distribuciju, analizira učestalost gena i genotipova te promjene u frekvenciji genotipova unutar i između populacija. Istraživanja populacijske genetike otkrivaju uzorke raznolikosti u prostoru te uzorke evolucijske raznolikosti i adaptacije (Sunde i sur. 2020). Precizno određivanje genetskih karakteristika populacije važno je u stvaranju planova konzervacije vrsta (Zimmerman i sur. 2020).

Kako bi se istražila genetska raznolikost populacija, u istraživanjima se koriste različiti genetski markeri. Markeri mogu biti proteinski ili DNA (molekularni) markeri. Proteinski markeri podrazumijevaju korištenje alozima, alelnih forma protein kodirajućih lokusa detektiranih elektroforezom (Allendorf 2017). Molekularni markeri uključuju mitohondrijske markere te nuklearne markere. Korišteni nuklearni markeri u populacijskim istraživanjima su polimorfizmi pojedinačnog nukleotida – SNP (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*) i varijabilni uzastopno ponavljajući sljedovi – VNTR (engl. *Variable Number Tandem Repeat*) od kojih razlikujemo mikrosatelite i minisatelite.

1.3.1. Mikrosateliti

Mikrosateliti su najčešće korišteni markeri u istraživanjima strukture populacija i konzervacijskoj genetici. Također se nazivaju jednostavne ponavljajuće sekvence – SSR (engl. *Simple Sequence Repeats*) ili kratke uzastopno ponavljajuće sekvence – STR (engl. *Short Tandem Repeats*). Sastoje se od motiva duljine od jednog do šest nukleotida ponovljenih do 100 puta (Guichoux i sur. 2011). Mikrosatelitni lokusi su karakterizirani određenom sekvencom DNA. Sekvenca se sastoji od dijela jedinstvene DNA koja definira i omeđuje lokus i ponavljajućeg motiva (Zardoya i sur. 1996) (Slika 3).



Slika 3. Struktura mikrosatelitnog lokusa s dva alela, s tri, odnosno pet ponavljanja motiva i omeđen jedinstvenom sekvencom.

Mikrosatelitne lokuse karakterizira visoka stopa mutacija i polimorfnost. Polimorfnost proizlazi iz varijacije duljine alela koja je posljedica različitog broja ponavljanja mikrosatelitnog motiva (Ellegren 2000). Promjena u broju ponavljajućih jedinica događa se uslijed insercije ili delecije jedne ponavljajuće jedinice zbog replikacijskog proklizavanja. Tijekom replikacije molekule DNA, lanac kalup i početnica se ne sparuju pravilno što dovodi do delecije ako se nespareni nukleotidi nalaze na lancu kalupu ili insercije ako se nalazi na lancu početnice (Levinson i Gutman 1987). Stope mutacija u mikrosatelitnim sekvencama iznose od 10^{-6} do 10^{-3} mutacija po lokusu po generaciji, takva visoka stopa mutacija uzrokuje prisutnost velikog broja i raznolikosti alela u populaciji (Ellegreen 2000).

Mikrosatelitne sekvence su raspršene po genomu, a najčešće se nalaze u dijelovima nekodirajuće DNA, u intergenskim sekvencama ili intronima. U tim dijelovima genoma, mutacije nisu štetne za organizam i ne dovode do promjene u fenotipu. Manji dio mikrosatelita u genomu, većinom trinukleotidna i heksanukleotidna ponavljanja, nalazi se u kodirajućim regijama. U kodirajućim regijama, za razliku od nekodirajućih, postoji kontrola mutacija koje uzrokuju pomak okvira čitanja. Iako su mikrosateliti evolucijski neutralni DNA markeri te na njih ne utječe prirodna selekcija, dio mikrosatelita pokazuje i ulogu u organizaciji kromatina, regulaciji metaboličkih procesa DNA, te u regulaciji gena (Li i sur. 2002). Za istraživanja populacijske genetike, najčešće su korišteni mikrosateliti u nekodirajućim regijama genoma jer pokazuju veći stupanj polimorfnosti, koji je proporcionalan stopi mutacija (Ellegren 2004; Guichoux i sur. 2011).

Određivanje veličine alela mikrosatelitnih lokusa provodi se umnažanjem mikrosatelitne regije lančanom reakcijom polimeraze – PCR (engl. *polimerase chain reaction*). Produkti umnažanja razdvajaju se kapilarnom elektroforezom prema veličini, a detekcija se temelji na označavanju početnica fluorescentnim bojama (Flores-Rentería i Krohn 2013). Početnice su sintetizirane prema konzerviranim sekvencama koje omeđuju mikrosatelitne lokuse. Te sekvence mogu biti konzervirane između jedinki unutar vrste, ali i unutar roda ili porodice. Takvo svojstvo omogućuje korištenje istih početnica za umnažanje mikrosatelitnih lokusa u različitim vrstama (engl. *cross-amplification*) (Salkoe i Toonen 2006).

1.4. Primjena mikrosatelitnih markera u konzervaciji vrste

Primjena molekularno - genetičkih alata omogućuje istraživanje genetske i populacijske raznolikosti vrsta. Različite genetske značajke (genetska varijabilnost, heterozigotnost, frekvencija alela, populacijska struktura, veličina populacije) dobivene analizom korištenih genetskih markera omogućuju razvoj adekvatnih planova konzervacije ugroženih vrsta i njihovih prirodnih populacija (Schwartz i sur. 2007). Cilj planova upravljanja je prepoznavanje i održavanje genetske varijabilnosti (Moss i sur. 2003). Genetska raznolikost pozitivno je korelirana s veličinom populacije i staništa, veća je kod vrsta sa širim arealom, a manja kod izoliranih populacija te ugroženih vrsta (Frankham 1996). Neutralna genetska varijabilnost populacija odražava evolucijski i posredno, adaptivni potencijal populacije. Smanjenje broja jedinki u populaciji, može dovesti do manje genetske varijabilnosti. Gubitak varijabilnosti događa se najčešće kod malih, izoliranih populacija i populacija koje su prošle kroz učinak uskog grla (engl. *bottleneck*), dolazi do parenja u bliskom srodstvu (engl. *inbreeding*) zbog čega populacije gube stabilnost i brojnost jedinki pada. Takve populacije imaju ograničenu mogućnost preživljavanja i adaptacije na promjene u okolišu (Frankham 2003). Mikrosatelitni lokusi, zbog brze evolucije, služe u analizi nedavnih i trenutnih evolucijskih događaja, a također omogućavaju detekciju strukture blisko srodnih populacija (Chistiakov i sur. 2006).

Do sada je većina istraživanja populacijske strukture slatkovodnih rakova u Europi provedena na riječnom i bjelonogom raku (Baric i sur. 2005; Kõiv i sur. 2008; Schrimpf i sur. 2014; Gross i sur. 2017). Rezultati istih pokazuju veliku genetsku varijabilnost na području jugoistočne Europe dok je varijabilnost u središnjoj te sjevernoj Europi znatno manja (Schrimpf i sur. 2014; Laggis i sur. 2017; Berger i sur. 2018).

Dosadašnja istraživanja genetske raznolikosti populacija na vrsti *A. torrentium* temeljena su na korištenju početnica za mikrosatelitne lokuse iz blisko srodnih vrsta (Iorgu i sur. 2011; Berger i sur. 2018; Pârvulescu i sur. 2020). Mali broj istraživanja proveden je korištenjem vrsno specifičnih početnica (Vorbürger i sur. 2014) koji nisu pokazivali visoku razinu polimorfnosti po alelu u istraživanim populacijama potočnog raka u Švicarskoj.

Ograničenje korištenja mikrosatelitnih markera u istraživanju nemodelnih organizama je dug proces identifikacije i razvoja specifičnih markera, no taj je proces ubrzan korištenjem sekvenciranja novih generacija – NGS (engl. *Next Generation Sequencing*) (Guichoux i sur. 2011). Razvoj novih mikrosatelitnih početnica specifičnih za vrstu omogućuje određivanje genetskih značajki populacija, utvrđivanje njihove raznolikosti i srodstvenih odnosa te identifikaciju evolucijski značajnih jedinica, kao i jedinica upravljanja - MU (engl. *management units*) ugroženim vrstama.

2. Ciljevi istraživanja

Opći cilj rada je doprinijeti spoznajama o raznolikosti populacija potočnog raka u Hrvatskoj u svrhu izrade adekvatnih planova zaštite i upravljanja ovom ugroženom i zaštićenom vrstom.

Specifični ciljevi rada su:

- i. testirati i optimizirati nove mikrosatelitne lokuse kako bi se povećao broj dostupnih markera za istraživanje strukture i raznolikosti populacija vrste *Austropotamobius torrentium*.
- ii. primijeniti set novo razvijenih dobroumnažajućih i polimorfnih markera te istražiti genetsku raznolikost i strukturu populacija ove vrste kako bi se utvrdile populacije i područja najveće genetske raznolikosti vrste, a kojima je potrebno dati prioritet u zaštiti.

Hipoteze:

- i. dizajnom i optimizacijom novih početnica, bit će razvijeni adekvatni lokusi, specifični za vrstu koji mogu zamijeniti korištenje početnica iz drugih vrsta
- ii. prethodnim istraživanjima na temelju mitohondrijske i nuklearne DNA utvrđena je velika raznolikost vrste *Austropotamobius torrentium* na području dinaridskog krša te očekujemo da će, primjenom novorazvijenih markera, biti potvrđena velika raznolikost populacija

3. Materijali i metode

3.1. Kemikalije i pribor

Laboratorijski materijal:

- Mikroeprovete 0,2 mL, 1,5 mL
- Nastavci za mikropipete 10 μ L, 200 μ L, 1000 μ L
- Zaštitne rukavice
- Stalci

Elektroforetski standard:

- Quick-Load 100pb DNA ladder Thermo Scientific

Oligonukleotidne početnice (Prilog 1.):

- 35 parova početnica za umnožavanje mikrosatelitnih lokusa ATM50 – ATM84
- par početnica za umnožavanje mikrosatelitnog lokusa AT1
- par početnica za umnožavanje mikrosatelitnog lokusa AT37
- par početnica za umnožavanje mikrosatelitnog lokusa ATOR37
- par početnica za umnožavanje mikrosatelitnog lokusa Aas3040
- fluorescentno obilježene M13 univerzalne početnice

Kemikalije:

- Etanol
- Promega GoTaq Mix
- Agaroza
- TAE puffer
- Midori Green Advance DNA Stain Nippon Europe Genetics

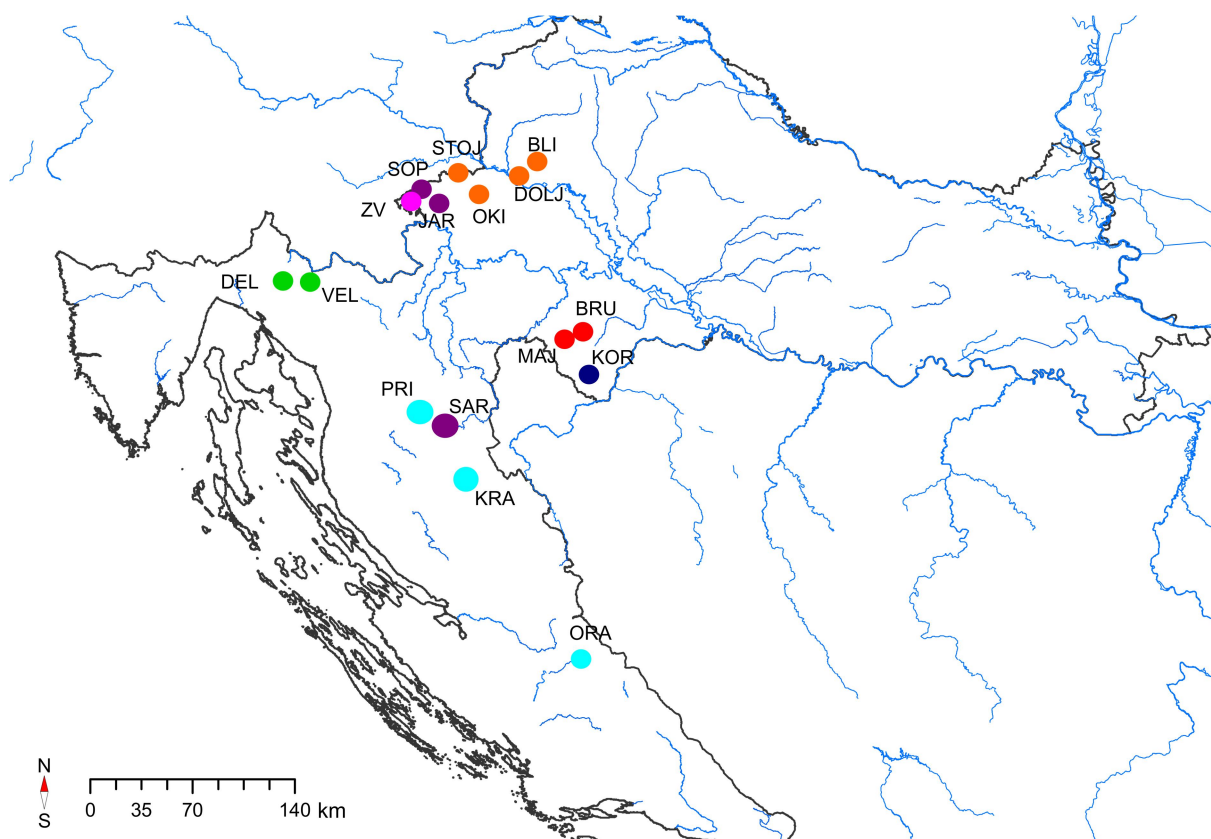
Tehnički pribor i uređaji

- Mikropipete
- Vrtložna miješalica
- Centrifuga
- PCR uređaj
- Kadice za pripremu agaroznog gela
- Analitička vaga

- Mikrovalna pećnica
- Računalo

3.2. Područje istraživanja i materijal

Materijal korišten u ovom radu prikupljen je prethodnim terenskim istraživanjima potočnog raka u potocima Like, Gorskog Kotara, Banovine, Korduna, Žumberka, Prigorja te Žumberka i Samoborskog gorja. Ukupno je prikupljeno 468 uzoraka iz 17 populacija. Uzorci (po jedan pereopod svakog ulovljenog raka) su bili pohranjeni u 96% alkoholu u označenim zasebnim bočicama koje su do izolacije čuvane u hladnjaku. Ukupna genomska DNA iz tkiva izolirana je komercijalnim kitom GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich).



Slika 4. Područja uzorkovanja potočnog raka. Kružićima su označene populacije (oznake prema Tablici 1.). Populacija CRN (Rijeka Crnojevića, Crna Gora) nije prikazana na karti. Različite boje označavaju mtDNA filogrupe: crvena – BAN, narančasta – CSE, zelena – GK, plava – KOR, svijetlo plava – LD, ljubičasta – ŽPB, ružičasta – ZV.

Tablica 1. Popis populacija s oznakom, pripadnost filogrupi i broj uzoraka po populaciji korištenih u analizama populacijske genetike. (BAN – Banovina; CSE – središnja i jugoistočna Europa; GK – Gorski kotar; KOR – Kordun; LD – Lika i Dalmacija; SB – južni Balkan; ZV – Zeleni vir; ŽPB – Žumberak, Plitvice i Bjelolasica).

Populacija	Oznaka	Filogrupa	Broj uzoraka
Brućina	BRU	BAN	31
Maja	MAJ	BAN	30
Bliznec	BLI	CSE	29
Dolje	DOLJ	CSE	31
Okićnica	OKI	CSE	32
Stojdraga	STOJ	CSE	21
Delnički potok	DEL	GK	29
Vele vode	VEL	GK	31
Kordun	KOR	KOR	11
Krasulja	KRA	LD	30
Orašnica	ORA	LD	33
Prijeboj	PRI	LD	24
Rijeka Crnojevića	CRN	SB	15
Zeleni vir	ZV	ZV	29
Jarak	JAR	ŽPB	10
Sartuk	SAR	ŽPB	27
Sopotski slap	SOP	ŽPB	24

3.3. Dizajn i odabir početnica

Dizajn početnica napravljen je u laboratoriju *Écologie et Biologie des Interactions* Sveučilišta u Poitiersu, Francuska prema metodologiji Grandjean i sur. 2017. Sekvence koje su korištene za dizajn početnica, dobivene su *low coverage* sekvenciranjem nove generacije (NGS). Na taj način izdvojene su sekvence koje su zastupljene u velikoj količini u ukupnoj genomskoj DNA: genomi organela, nuklearne ribosomske DNA i repetitivni elementi među kojima su satelitne i mikrosatelitne sekvence. Selekcija mikrosatelita i dizajn početnica izrađen je pomoću programa QDD 3.1 (Megléc i sur. 2014).

Odabir prikladnih početnica za umnožavanje mikrosatelitnih lokusa napravila sam prema protokolu Megléc i sur. 2014.

3.4. Testiranje novorazvijenih mikrosatelitnih lokusa

Ukupno 35 novorazvijenih mikrosatelitnih početnica sam testirala na polimorfizam i uspješnost amplifikacije na osam jedinki, po jednoj iz svake filogrupe (BAN, CSE, GK, KOR, LD, SB, ZV, ŽPB). Značajke početnica prikazane su u Prilogu 1.

Reakcijska smjesa za umnažanje fragmenata DNA PCR reakcijom u ukupnom volumenu 10 μ L, sadržavala je 1x GoTaq Mix, 75 nM uzvodne (engl. *forward*) početnice koja na 5' kraju sadrži sekvencu komplementarnu slijedu nukleotida fluorescentno obilježene M13 univerzalne početnice, 300 nM nizvodne (engl. *reverse*) početnice, 300 nM fluorescentno obilježene M13 univerzalne početnice i 1 μ L DNA. M13 univerzalna početnica obilježena je jednom od četiri boje: 6-FAM (plava), NED (žuta), VIC (zeleno), PET (crvena). PCR reakcija započinje početnom denaturacijom 3 min na 95 °C, slijedi 20 ciklusa koji se sastoje od: denaturacije 30 s na 95 °C, prijanjanja početnica 90 s na 60 °C sa snižavanjem temperature 0,5 °C svaki ciklus do 50 °C i elongacije 30 s na 72 °C, zatim slijedi 12 ciklusa koji se sastoje od: denaturacije 30 s na 95 °C, prijanjanja početnica 90 s na 50 °C i elongacije 30 s na 72 °C te na kraju završne elongacije 30 min na 60 °C. Uspješnost umnožavanja DNA provjerila sam gel elektroforezom na 1%-tnom gelu koji je pripremljen otapanjem agaroze u 1x TAE puferu, a elektroforeza se odvijala 13 min pri 100 V. Za određivanje veličine DNA fragmenata na gelu koristila sam elektroforetski standar Quick-Load 100pb DNA ladder, a za vizualizaciju sam koristila boju Midori Green Advance DNA Stain.

Analiza umnoženih fragmenata kapilarnom elektroforezom provedena je u komercijalnom servisu MacroGen Inc. Za određivanje veličine fragmenata DNA korišten je unutrašnji standard veličina GeneScan 600 LIZ Size Standard. Dobivene elektroferograme analizirala sam računalnim programom GeneMapper v.5 (Life Technologies, USA) koji omogućava određivanje duljine mikrosatelitnih alela određenih lokusa.

3.5. Selekcija najprikladnijih mikrosatelitnih lokusa za korištenje u analizi populacijske genetike potočnog raka

Za umnožavanje na svim uzorcima izabrala sam četiri dobroumnažajuća i polimorfna lokusa ATM57, ATM64, ATM78 i ATM79 te sam koristila četiri para početnica ranije korištenih u drugim istraživanjima AT1, AT37 (Vorbürger i sur. 2014), ATOR37 (Berger i sur. 2018) i AAS3040 koja je specifična za vrstu *A. astacus* (Kõiv i sur. 2008).

Sekvence korištenih početnica prikazane su u Tablici 2. Korištene početnice su za genotipizaciju podijeljene u dva seta (Tablica 2.) na način da ne dolazi do preklapanja fluorescentnih boja i veličine umnoženih fragmenata. Nakon umnožavanja DNA fragmenata (opisano u poglavlju 3.4.) slijedila je genotipizacija.

Tablica 2. Karakteristike mikrosatelitnih lokusa za lančanu reakciju polimerazom (PCR): naziv lokusa, motiv ponavljanja, fluorescentna oznaka M13 univerzalne početnice, sekvenca uzvodne i nizvodne početnice u 5' – 3' smjeru (sekvenca komplementarna M13 označena je podebljanim slovima) te set kojem pripada početnica tijekom genotipizacije.

Lokus	Motiv ponavljanja	Fluorescentna oznaka	Sekvenca uzvodne početnice	Sekvenca nizvodne početnice	Set
ATM57	AAGG	6-FAM	TG TAAAACGACGGCCAGTTC TGGGTCTAGAGCAGCGG	TGGCAAATGGTG AGGAGGAT	I
ATM64	AGG	PET	TG TAAAACGACGGCCAGTTA CTTGAGGGATCGACCAGC	TGACAAAGGTGG CTCGTGAT	I
ATM78	AGGC	VIC	TG TAAAACGACGGCCAGTGC GTCCGGGATACTCTTGAA	CATCTTCTGTGGT GCCACCT	I
ATM79	ACG	NED	TG TAAAACGACGGCCAGTTA CGACTCTCCTGGACCTCC	TTGATTCTCAAGG AGCGGCC	I
AT1	(AGG)... (AGC)	NED	TG TAAAACGACGGCCAGTG AGGTCTAAGGCGACGAGG	CAAGTAAGGGCC GGGTGAG	II
AT37	TAACC	6-FAM	TG TAAAACGACGGCCAGTAC TATCCGACCGAACGAACC	ACAGAACCGATT CTTGGCAT	II
ATOR3 7	AC	PET	TG TAAAACGACGGCCAGTGT GCTTCTGTTGTTTCGCTCTT	TGTTGTGCTAACT GTTGTGAGTCC	II
AAS304 0	TA	VIC	TG TAAAACGACGGCCAGTGT TGTGTGGTAACTCCTGACGA	CAATCGTATCCCA CATGCAG	II

Uzorke u kojima više od dva lokusa nisu umnožena PCR-om izbacila sam iz daljnjih analiza te je set uzoraka činilo 437 jedinki iz 17 populacija (Tablica 1.).

Nakon određivanja veličine alela u programu GeneMapper, koristila sam program TANDEM (Matschiner i Salzburger 2009) koji svakoj realnoj vrijednosti veličine alela pridružuje diskretnu vrijednost (engl. *allele binning*) te su u daljnjim analizama korišteni cijeli brojevi veličine alela, tzv. binovi (engl. *bin*).

Kako bi provjerila prisutnost grešaka tijekom genotipizacije zbog nul-alela (engl. *null alleles*), izostanka alela (engl. *allele dropout*), izostanka duljih alela (engl. *large allele dropout*) i postojanja dodatnih fragmenata (engl. *stutter bands*) koristila sam program MICRO-CHECKER v2.2.3 (Van Oosterhout i sur. 2004). Frekvencije nul-alela izračunala sam u programu FreeNA (Chapuis i Estoup, 2007). Za analizu je korišteno 10 000 ponavljanja.

Sljedeće analize napravila sam s dva seta podataka: jedan je sadržavao osam mikrosatelitnih lokusa (ATM57, ATM78, ATM79, ATM64, AT1, AT37, ATOR37, AAS3040), a drugi, iz kojeg su maknuti lokusi s najviše nul-alela, šest mikrosatelitnih lokusa (ATM57, ATM78, ATM79, ATM64, AT37, AAS3040).

3.6. Genetska raznolikost populacija

Genetska raznolikost jedinki opisuje se kao udio heterozigotnih alela po svakom lokusu. Na razini populacije, genetska raznolikost procijenjena je statističkim pokazateljima: broj alela po lokusu (N_A), frekvencija alela, uočena heterozigotnost (H_O , engl. *observed heterozygosity*), očekivana heterozigotnost (H_E , engl. *expected heterozygosity*), broj privatnih alela (A_{PR}) koji su jedinstveni samo za jednu populaciju. Kako bih procijenila navedene parametre, koristila sam GenALEX 6.5 dodatak u programu MO Excel (Peakall i Smouse 2012). Indeksi parenja u bliskom srodstvu (F_{IS}) i alelna bogatstvo (A_R , engl. *allelic richness*) izračunati su u programu FSTAT 2.9.4. (Goudet 2003).

Korigirane vrijednosti frekvencije alela s obzirom na prisutnost nul-alela izračunate su u programu FreeNA (Chapuis i Estoup 2007) s 10 000 ponavljanja.

Testiranje Hardy-Weinbergove ravnoteže (HWE) provela sam korištenjem programa GENEPOP v4.7.5 (Rousset 2008). Hardy-Weinbergova ravnoteža podrazumijeva da su frekvencije alela i genotipova u populaciji konstantne tijekom generacija. Nulta hipoteza (H_0) glasi: ne postoji odstupanje od ravnoteže.

Procjenu neravnoteže vezanosti gena (engl. *linkage disequilibrium*) izračunala sam u programu GENEPOP v.4.7.5 (Rousset 2008). Neravnotežu vezanosti gena potrebno je testirati kako bi se provjerilo jesu li korišteni lokusi neovisni genetski markeri. S obzirom da kromosomske lokalizacije lokusa nisu poznate, vezani geni mogu utjecati na rezultate populacijsko-genetičkih istraživanja. Nulta hipoteza (H_0) glasi: genotipovi jednog lokusa ne ovise o genotipovima drugog lokusa.

Testovi vjerojatnosti za procjenu Hardy-Weinbergove ravnoteže i neravnoteže vezanosti gena temeljeni su na metodi Markovljevih lanaca (Guo i Thompson 1992; Raymond i Rousset 1995) uz 10 000 dememorizacija, 100 obrada (engl. *batch*) i 1000 iteracija. Zbog velikog broja provedenih statističkih testiranja, primijenjena je Bonferroni korekcija (Rice 1989) granične vrijednosti statističke značajnosti rezultata, koja je postavljena na $p < 0,05$.

Za detekciju mogućih nedavnih smanjenja efektivne veličine populacije koristila sam program Bottleneck 1.2.02 (Cornuet i Luikart 1999). Program računa distribuciju očekivanih heterozigotnosti simulacijom procesa koalescencije pod tri modela mutacija: IAM (engl. *Infinite Allele Model*), SMM (engl. *Stepwise Mutation Model*) i TPM (engl. *Two phase model*).

Za izračun značajnosti viška heterozigotnosti program provodi tri testa: *sign test*, *standardized differences test* i *Wilcoxon sign-rank test*. Distribucija frekvencije alela prikazana je *mode-shift* indikatorom. Na taj je način moguće utvrditi pomak u L-distribuciji frekvencija koja je očekivana.

3.7. Genetska struktura populacija

Fiksacijski indeksi (F_{ST}) izračunati su u programu FSTAT 2.9.4. (Goudet 2003). Korigirane vrijednosti F_{ST} s obzirom na prisutnost nul-alela izračunate su u programu FreeNA s 10 000 ponavljanja. Statistička značajnost razlike F_{ST} vrijednosti testirana je t-testom u programu MO Excel.

Kako bi procijenila postotak ukupne molekularne varijance raspoređen na tri hijerarhijske razine (između filogrupa, između populacija unutar filogrupe i unutar populacija) provela sam analizu molekularne varijance (AMOVA) u programu Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier i sur. 2005).

Genetsku strukturu populacija procijenila sam analizom glavnih koordinata (PCoA) pomoću GenAlEx 6.5 dodatka u programu MO Excel (Peakall i Smouse 2012) koja se temelji na Nei genetskim udaljenostima.

Odnose između populacija sam istražila koristeći neukorijenjeni dendrogram napravljen metodom susjednog sparivanja (Saitou i Nei 1987) temeljen na matrici D_A genetske distanci (Nei i sur. 1983). Analiza je provedena u programu POPULATIONS v.1.2.32 (Langella 1999). Rezultate sam vizualizirala u programu MEGA X (Kumar i sur. 2018) te grafički doradila programom Inkscape 0.92.

Procjenu postojanja genetske strukture unutar populacija, odnosno određivanje pripadnosti jedinki pojedinoj genetskoj grupi (klasteru) analizirala sam pomoću programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard i sur. 2000). Pretpostavljene K vrijednosti definirala sam od 1 do 17 s 10 ponavljanja za svaku vrijednost. Parametri programa su: *burn-in* period 200 000 te broj MCMC (engl. *Monte Carlo Markov chain*, Monte Carlo markovljevi lanci) ponavljanja 1 000 000. Za određivanje najvjerojatnije K vrijednosti koristila sam program STRUCTURE HARVESTER (Earl i vonHoldt 2012) dok sam za vizualizaciju rezultata koristila programe CLUMPP (Jakobsson i Rosenberg 2007) i *distruct* (Rosenberg 2004).

4. Rezultati

4.1. Uspješnost amplifikacije mikrosatelitnih lokusa

Od 35 testiranih lokusa, 11 se pokazalo dobroumnažajuće i polimorfno, bez dodatnih umnoženih fragmenata (*stutter*) i fragmenata nastalih nespecifičnim vezanjem početnica, od čega su četiri s najvećim brojem alela korištena u analizama. Ukupno devet lokusa pokazalo se nevarijabilno te su među testiranim jedinkama pronađeni samo homozigoti ili jedan do dva alela. Na preostalim lokusima uočeno je puno dodatnih fragmenata i fragmenata nastalim nespecifičnim umnažanjem što je onemogućilo pravilno određivanje veličine alela. Detalji o svim testiranim mikrosatelitnim lokusima prikazani su u Prilog 1.

4.2. Genotipizacija

Genotipizacija je provedena na 437 uzoraka iz 17 populacija na osam lokusa. Ukupno je zabilježeno 98 alela na 8 mikrosatelitnih lokusa, s prosječnim brojem od 14,25 alela po lokusu. Najmanji broj alela zabilježen je na lokusima ATM78 i ATM79 (sedam alela), a najveći na lokusima ATM57 i ATM37 (22 alela) (Tablica 3).

Prisutnost nul alela, zabilježena je na šest od osam korištenih lokusa (Tablica 3). Frekvencije nul alela po lokusu iznose od 0,012 (AT37) do 0,146 (ATOR37). Isto tako visoka frekvencija nul alela zabilježena je i za lokus AT1 (0,143). Na lokusima ATM78 i AT37 program MICRO-CHECKER nije zabilježio prisutnost nul alela, dok je program FreeNA izračunao malu frekvenciju nul alela na tim lokusima, 0,014, odnosno 0,012. Rezultati t-testa nisu pokazali značajnu razliku ($p = 0,2$) između F_{ST} vrijednosti i F_{ST} vrijednosti korigiranih na nul alele. Nisu zabilježene greške tijekom genotipizacije zbog umnožavanja dodatnih fragmenata i izostanka alela.

Tablica 3. Naziv lokusa, raspon duljina alela, ukupan broj alela po lokusu, broj nul alela (izračunat u programu MICRO-CHECKER) i frekvencija nul alela (izračunata u programu FreeNA).

Lokus	Raspon duljina alela	Ukupan broj alela	Broj nul alela	Frekvencija nul alela
ATM57	303-459	22	3	0,058
ATM78	236-264	7	0	0,014
ATM79	184-205	7	1	0,044
ATM64	281-308	10	5	0,072
AT1	209-257	12	9	0,143
AT37	252-362	22	0	0,012
ATOR37	156-184	15	9	0,146
AAS3040	224-260	19	4	0,087

S obzirom da nisam znala kako veliki broj nul alela može utjecati na rezultate, daljnje analize sam provela na dva seta podataka: prvi set sa šest lokusa (bez AT1 i ATOR37) i drugi sa svih osam lokusa. Rezultati analiza provedenih na setu podataka s osam lokusa prikazani su u prilogima (Prilog 3 - 8).

4.3. Genetska raznolikost populacija

Parametri genetske raznolikosti populacija potočnog raka prikazani su u Tablici 4. Udio polimorfnih lokusa za sve populacije iznosi prosječno 0,902. Najmanja vrijednost zabilježena je za populacije DEL, JAR i SOP, odnosno za filogrupe GK i ŽPB (Tablica 4). Prosječan broj alela po populaciji je 3,62. Najmanja vrijednost 2,167, prisutna je u populaciji CRN, a najveća 4,833 u populaciji OKI. Najveća vrijednost alelnog bogatstva iznosi 4,385 za populaciju KOR, a najmanje 1,923 za populaciju CRN. Za filogrupe, najveće alelno bogatstvo pokazuju KOR i ZV, a najmanju GK, SB i ŽPB. Ukupan broj detektiranih privatnih alela je 25, s najvećim brojem u populacijama koje pripadaju filogrupu ZV (sedam privatnih alela) i CSE (BLI, 4 i OKI, 5 privatnih alela). Vrijednosti očekivane heterozigotnosti iznose od 0,183 do 0,691, najmanja je zabilježena u populaciji SOP, a najveća u populaciji (kao i filogrupu) KOR. U svim populacijama, osim populacija koje pripadaju GK filogrupu (DEL i VEL) i PRI, očekivana heterozigotnost veća je od uočene heterozigotnosti. Genetska raznolikost izražena kao udio polimorfnih lokusa, alelno bogatstvo i očekivana heterozigotnost veća je u populacijama KOR i ZV, za razliku od populacija SOP i CRN u kojima su niže vrijednosti Koeficijent parenja u bliskom srodstvu (F_{IS}) veći je od nule u svim populacijama, osim DEL, VEL i PRI. Nakon Bonferroni korekcije, u devet populacija je zabilježeno značajno

odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže. Niti jedan lokus u niti jednoj populaciji ne pokazuje značajnu vezanost s drugim lokusom, odnosno nije uočena neravnoteža vezanosti gena.

Tablica 4. Genetska raznolikost populacija i prosječna vrijednost po filogrupama. P – udio polimorfnosti, N_A – prosječni broj alela, A_R – alelna bogatstvo, A_{PR} – broj privatnih alela, H_E – očekivana heterozigotnost, H_O - uočena heterozigotnost, F_{IS} – koeficijent parenja u bliskom srodstvu, p_{HWE} – vjerojatnost Hardy-Weinbergove ravnoteže nakon Bonferronijeve korekcije uz razinu značajnost $\alpha = 0,05$. Značajne vrijednosti označene su zvjezdicom *.

Populacija	Filogrupa	P	N_A	A_R	A_{PR}	H_E	H_O	F_{IS}	p_{HWE}
BRU	BAN	1	4,667	3,607	1	0,541	0,478	0,118	*
MAJ	BAN	1	4,167	3,274	1	0,468	0,345	0,267	*
prosjeck BAN		1	4,417	3,441	2	0,505	0,412	0,193	
BLI	CSE	1	4,167	3,488	4	0,504	0,437	0,135	*
DOLJ	CSE	1	4,167	3,520	1	0,548	0,448	0,184	*
OKI	CSE	1	4,833	3,565	5	0,501	0,412	0,18	*
STOJ	CSE	1	4,167	3,161	3	0,418	0,396	0,054	
prosjeck CSE		1	4,334	3,434	13	0,493	0,423	0,138	
DEL	GK	0,667	2,667	2,419	0	0,375	0,379	-0,01	
VEL	GK	0,833	3,167	2,464	0	0,336	0,36	-0,074	
prosjeck GK		0,75	2,917	2,442	0	0,356	0,369	-0,042	
KOR	KOR	1	4,5	4,385	1	0,691	0,606	0,129	
KRA	LD	1	3,5	2,992	0	0,53	0,481	0,093	
ORA	LD	0,833	3,333	2,429	0	0,259	0,232	0,103	
PRI	LD	1	3,5	3,088	0	0,561	0,591	-0,056	*
prosjeck LD		0,944	3,444	2,836	0	0,45	0,4347	0,047	
CRN	SB	0,833	2,167	1,923	0	0,223	0,156	0,306	*
ZV	ZV	1	4,667	4,028	7	0,576	0,45	0,223	*
JAR	ŽPB	0,667	2,333	2,282	0	0,283	0,267	0,062	
SAR	ŽPB	0,833	3	2,633	1	0,449	0,42	0,067	
SOP	ŽPB	0,667	2,5	1,982	1	0,183	0,077	0,583	*
prosjeck ŽPB		0,722	2,611	2,299	2	0,305	0,255	0,237	

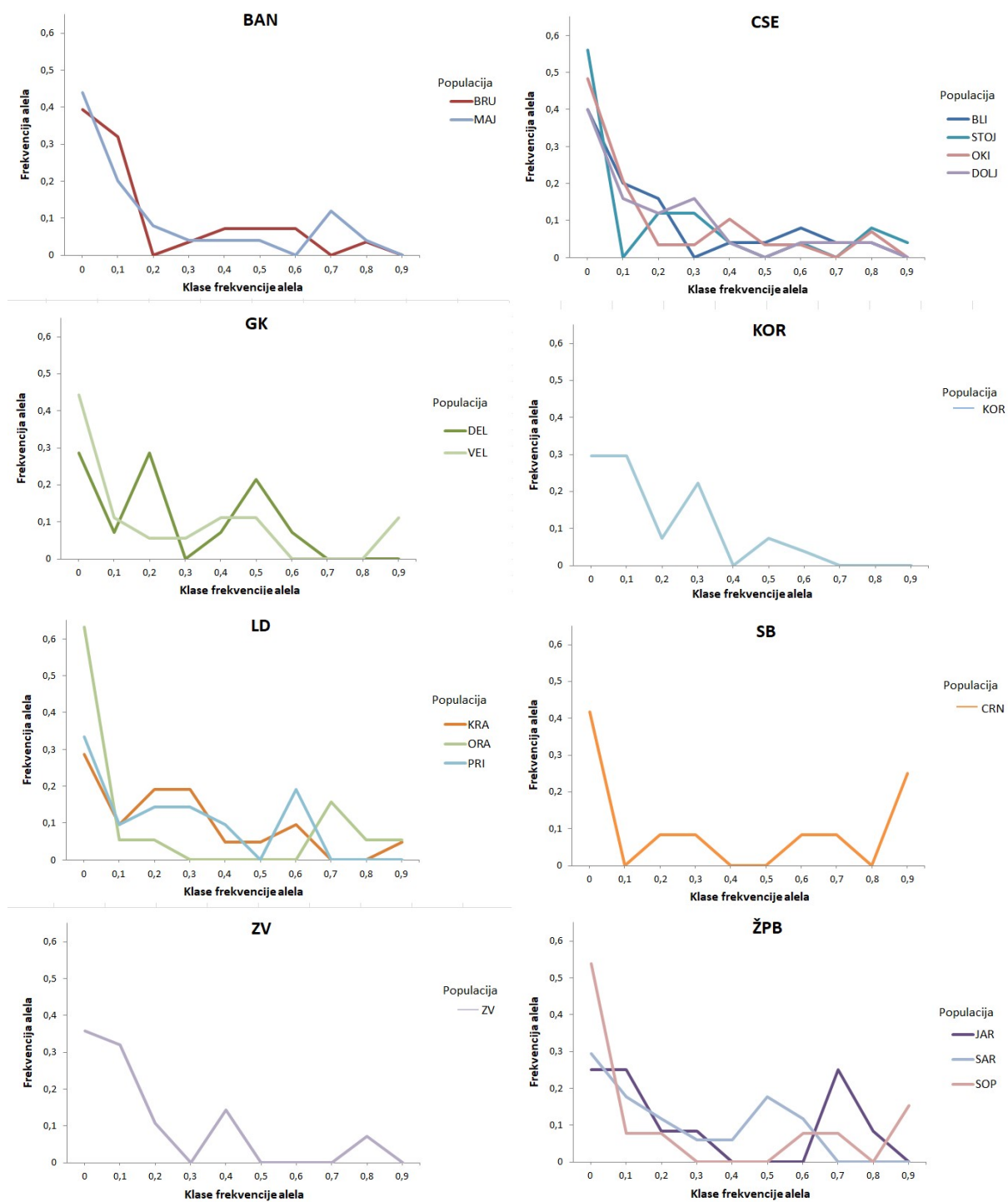
Analizom očekivane i uočene heterozigotnosti moguće je procijeniti postojanje recentnog efekta uskog grla u populaciji. Testiranjem tri različita modela (IAM, TPM, SMM) pomoću *Wilcoxon sign-rank* testa utvrđeno je odstupanje od ravnoteže ($p < 0,05$) između mutacija i genetičkog drifta po dva mutacijska modela u populacijama SAR i KOR (Tablica 5). Ovaj rezultat ukazuje na postojanje viška heterozigota i moguće usko grlo kroz koje su te dvije populacije nedavno prošle.

Osim *Wilcoxon sign-rank* testa primijenjeni su i *sign test*, *standardized differences test* i *Two tail Wilcoxon sign-rank test*, a rezultati su prikazani u Prilog 2.

Tablica 5. Vjerojatnost odstupanja od ravnoteže između mutacija i genetičkog drifta testiran *Wilcoxon sign-rank* testom na tri modela pri značajnosti $\alpha = 0,05$. IAM – *infinite allele model*, TPM – *two phase model*, SMM – *stepwise mutation model*. Statistički značajne vrijednosti pri $p < 0,05$ označene su crvenom bojom.

Populacija	IAM	TPM	SMM
BLI	0,023	0,578	0,984
BRU	0,219	0,5	0,961
DEL	0,031	0,062	0,438
JAR	0,844	0,906	0,938
STOJ	0,922	0,961	0,984
KRA	0,016	0,055	0,344
MAJ	0,079	0,656	0,961
OKI	0,079	0,281	0,5
ORA	0,953	0,984	0,984
DOLJ	0,023	0,219	0,578
PRI	0,008	0,055	0,5
CRN	0,891	0,954	0,953
SAR	0,016	0,016	0,406
SOP	1	1	1
VEL	0,5	0,891	0,953
ZV	0,023	0,281	0,578
KOR	0,008	0,023	0,055

S obzirom da nije zabilježeno odstupanje od ravnoteže genetičkog drifta i mutacija u svim simuliranim modelima, dodatno je napravljen *mode-shift* test distribucije frekvencije alela (Slika 5). Za svaku populaciju *mode-shift* test pokazuje tipičnu L-distribuciju frekvencija alela populacija u ravnoteži mutacija i drifta. Iz grafičkog prikaza je vidljivo da u svim populacijama postoji veća količina rijetkih alela (frekvencija $< 0, 1$) nego u ostalim klasama frekvencija iz čega ne možemo zaključiti da su populacije nedavno prošle kroz usko grlo.



Slika 5. Distribucija frekvencija alela u različitim klasama frekvencije za svaku populaciju dobivene *mode-shift* testom. Populacije su razvrstane prema filogrupama kojima pripadaju.

4.4. Genetska struktura populacija

Za analizu genetske strukture populacija izračunati su fiksacijski indeksi (F_{ST}) (Tablica 6). Globalna razina genetske diferencijacije između istraživanih parova populacija je visoka te iznosi 0,462 s vrijednostima za parove populacija koje se kreću u rasponu od 0,053, između populacija VEL i DEL (obje populacije unutar filogrupe GK), do 0,764, između populacija SOP i ORA koje pripadaju različitim filogrupama (redom ŽPB i LD). Općenito, populacija ORA koja je najjužnije pozicionirana i najudaljenija od svih ostalih populacija, pokazuje najviše vrijednosti F_{ST} . Isto tako, uočljivo je da između populacija unutar iste filogrupe F_{ST} vrijednosti su manje nego između populacija različitih filogrupa.

Tablica 6. Fiksacijski indeksi (F_{ST}) između parova populacija. Tamnija boja označava veću vrijednost F_{ST} .

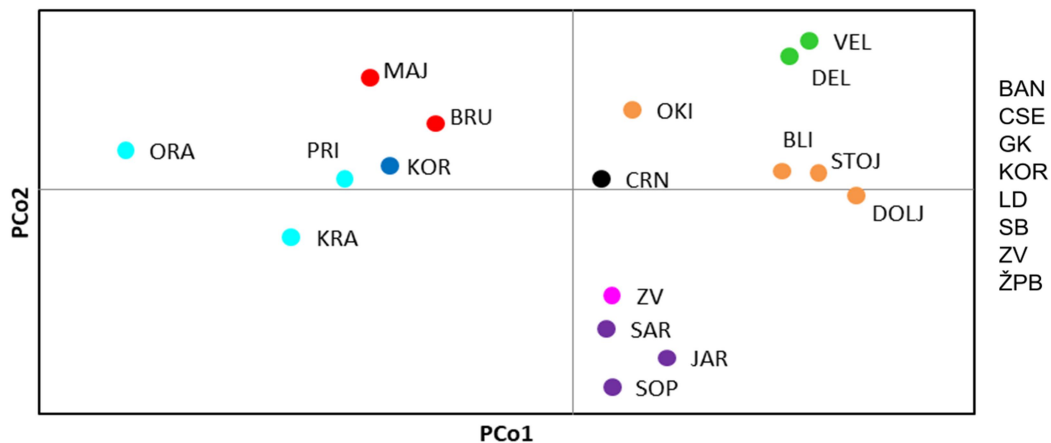
	BLI	BRU	DEL	JAR	STOJ	KRA	MAJ	OKI	ORA	DOLJ	PRI	CRN	SAR	SOP	VEL	ZV	KOR
BRU	0,395																
DEL	0,444	0,502															
JAR	0,480	0,494	0,627														
STOJ	0,167	0,450	0,449	0,533													
KRA	0,463	0,390	0,531	0,513	0,511												
MAJ	0,474	0,090	0,537	0,571	0,525	0,413											
OKI	0,195	0,336	0,471	0,520	0,169	0,458	0,421										
ORA	0,620	0,401	0,684	0,727	0,670	0,509	0,366	0,561									
DOLJ	0,156	0,404	0,387	0,435	0,090	0,447	0,467	0,194	0,598								
PRI	0,436	0,332	0,504	0,493	0,494	0,067	0,346	0,436	0,459	0,424							
CRN	0,508	0,448	0,576	0,615	0,564	0,557	0,537	0,506	0,706	0,449	0,520						
SAR	0,443	0,457	0,551	0,298	0,473	0,466	0,503	0,465	0,631	0,396	0,457	0,589					
SOP	0,566	0,564	0,697	0,073	0,633	0,581	0,633	0,601	0,764	0,529	0,567	0,680	0,418				
VEL	0,469	0,520	0,053	0,654	0,488	0,564	0,557	0,503	0,701	0,415	0,537	0,602	0,586	0,714			
ZV	0,394	0,391	0,485	0,353	0,410	0,421	0,440	0,386	0,561	0,352	0,399	0,453	0,327	0,444	0,519		
KOR	0,386	0,274	0,472	0,455	0,438	0,260	0,299	0,334	0,445	0,357	0,243	0,502	0,383	0,581	0,508	0,321	

Rezultati analize molekularne varijance (AMOVA) prikazani su u Tablica 7. Rezultati ukazuju da je najveći postotak genetske varijacije prisutan unutar populacija, zatim slijedi postotak varijacije između populacija unutar filogrupa, dok je najmanji zabilježeni postotak varijacije prisutan između različitih filogrupa.

Tablica 7. Rezultati analize molekularne varijance. Postotak varijance na tri hijerarhijske razine.

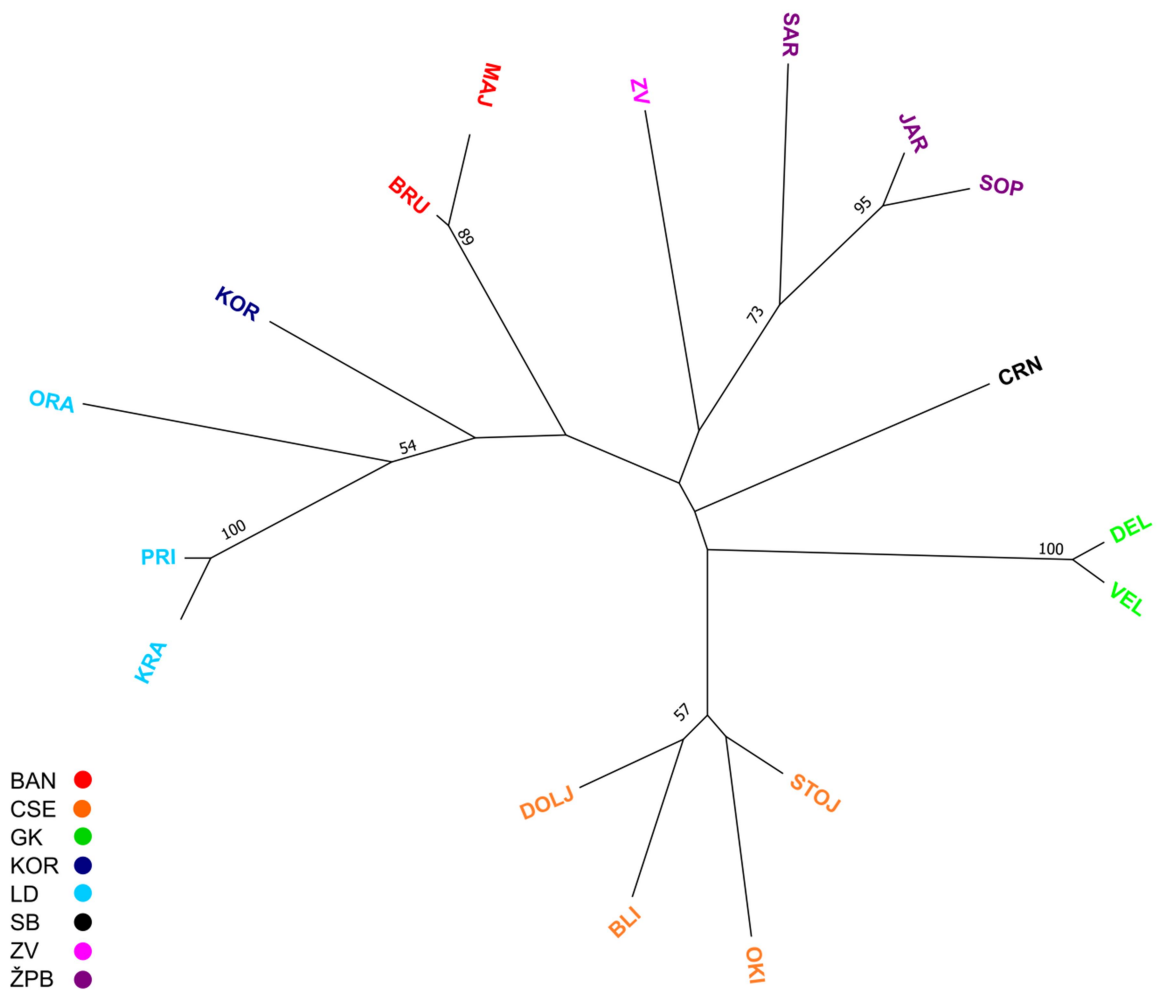
Razina	Postotak varijance / %
Između filogrupa	34,25
Između populacija unutar filogrupe	15,30
Unutar populacija	50,45

Analiza glavnih koordinata grupira populacije koje su jasno odvojene prema filogrupama kojima pripadaju. Prva os objašnjava 44,46% varijacije, a druga os 22,47%. Prva os odvaja populacije filogrupa LD (populacije KRA, ORA i PRI), KOR i BAN (populacije BRU i MAJ), a druga os ZV i ŽPB (populacije JAR, SAR i SOP) od ostatka populacija.



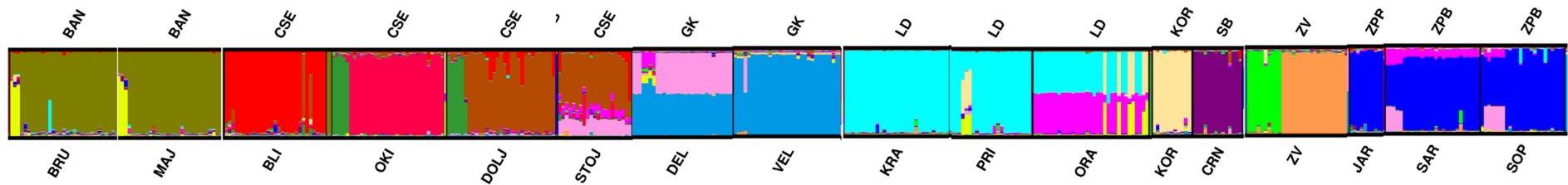
Slika 6. Analiza glavnih koordinata (PcoA). Različite boje označavaju različite filogrupe kojima populacije pripadaju.

NJ dendrogram temeljen na D_A genetskim udaljenostima također pokazuje odvajanje populacija prema pripadajućim filogrupama te visoku razinu diferencijacije između populacija (Slika 7.) na što ukazuju duge grane koje vode vanjskim čvorovima prema kratkim granama između unutarnjih čvorova. Rezultati obju metoda, PcoA i NJ dendrogram ukazuju na grupiranje populacija prema njihovom geografskom položaju, odnosno pripadnosti određenoj filogrupu te je vidljiva diferencijacija populacija.



Slika 7. Neukorijenjeni dendrogram napravljen metodom susjednog sparivanja temeljen na matrici D_A genetskih distanci između populacija. Različite boje označavaju različite filogrupe kojima populacije pripadaju. Imena populacija navedena su u Tablici 1.

Pripadnost jedinki pojedinim klasterima, analizirana pomoću programa STRUCTURE, pokazuje da je najvjerojatniji broj genetskih grupa (K) za istraživane jedinke 15. Rezultati su prikazani na slici 8. Populacije BLI, OKI, CRN, VEL i KOR čine zasebne klastera te njihovoj strukturi malo pridonose genotipovi drugih klastera. Populacije BRU i MAJ (koje su geografski blizu i pripadaju istoj filograpi BAN) čine zajedno jedan klaster, kao i JAR, SAR i SOP (populacije koje pripadaju filograpi ŽPB) te KRA i PRI (populacije koje pripadaju filograpi LD). Svaku od populacija DEL i ORA nije moguće svrstati u samo jedan klaster već polovično pripadaju u svaka po dva klastera. Populacije OKI i DOLJ pripadaju dvama različitim klasterima no vidljivo je da određene jedinke tih populacija pripadaju trećem, zajedničkom klasteru tih dviju populacija. Jedinke iz populacije ZV jasno su podijeljene u dva klastera.



Slika 8. Populacijska struktura analizirana programom STRUCTURE. Oznake iznad grafa označavaju filogrupe kojima pripadaju populacije. Oznake ispod grafa označavaju populacije. Svaka jedinka prikazana je kao jedan stupac. Različite boje predstavljaju različite klustere.

5. Rasprava

Istraživanja populacijske genetike potočnog raka do sada su bila temeljena većinom na mikrosatelitnim lokusima specifičnima za druge vrste (Iorgu i sur. 2011; Berger i sur. 2018; Pârvulescu i sur. 2020). U ovom istraživanju dizajniran je i testiran set početnica za 35 potencijalnih mikrosatelitnih lokusa specifičnih za vrstu *A. torrentium*. Iako je početni broj mikrosatelitnih lokusa bio velik, tijekom genotipizacije su uočeni nedostaci određenih lokusa. Neki od markera su bili dobroumnažajući, ali su se pokazivali monomorfima dok je kod drugih tijekom umnožavanja došlo do nespecifičnog vezanja početnica što je uzrokovalo više detektiranih fragmenata. Također, na nekim lokusima, većinom dinuklotidnog ponavljanja, uočeno je stvaranje dodatnih fragmenata koji nastaju tijekom umnožavanja zbog proklizavanja polimeraze što otežava genotipizaciju. Nakon testiranja i optimizacije, odabrana su četiri nova mikrosatelitna lokusa te su uz njih korištena još četiri dodatna mikrosatelitna lokusa koja su po prvi puta primijenjena u istraživanju populacija ove vrste na području Hrvatske. Svi istraživani lokusi pokazali su se polimorfima. Podaci o broju alela (na 8 lokusa zabilježeno je ukupno 98 alela (Tablica 3.)) dobivenih u ovom istraživanju su visoki što je važno za precizno određivanje svih genetičkih parametara i provođenje analiza s obzirom na mali broj korištenih lokusa (Kalinowski 2002). S obzirom da su lokusi AT1, AT37 i AAS3040 korišteni u prethodnim istraživanjima na vrsti *A. torrentium* (Kõiv i sur. 2008; Iorgu i sur. 2011; Vorburger i sur. 2014) možemo usporediti dobivene rezultate. Uočljivo je da je broj alela utvrđenih u ovom istraživanju trostruko veći od brojeva dobivenih u prethodnim istraživanjima, npr. za lokus AAS3040 je u ovom istraživanju utvrđeno 19 alela, dok je u istraživanju Iorgu i sur. (2011) utvrđeno šest, a u istraživanju Kõiv i sur. (2008) samo tri alela. Razlika u duljini alela u različitim populacijama daje nam uvid u genetsku udaljenost i raznolikost populacija. Mikrosatelitni lokusi karakterizirani su visokom stopom mutacija te procesima koji uzrokuju postepene promjene u broju ponavljanja (*stepwise mutation model*). Stoga, veća razlika u veličini alela upućuje na veći broj mutacija koji se dogodio tijekom perioda koji je protekao od odvajanja od zajedničkog pretka (Hardy i sur. 2003).

Genetska raznolikost može se izraziti i kao alelno bogatstvo (A_R) koje ukazuje na adaptivni potencijal populacije (Greenbaum i sur. 2014). Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je alelno bogatstvo veće za populacije iz filogrupa BAN, CSE, KOR i ZV (Tablica 4). Također, A_R hrvatskih populacija veći je u usporedbi s populacijama vrste *A. torrentium* u Švicarskoj, Austriji i Njemačkoj (Vorburger i sur. 2014; Berger i sur. 2018), a manje od populacija u

Rumunjskoj (Pârvulescu i sur. 2020). Populacije analizirane u ovom istraživanju također pokazuju veći broj privatnih alela (1-7) u odnosu na populacije iz drugih istraživanja (1-2) (Berger i sur. 2018, Pârvulescu i sur. 2020). Privatni aleli su jedinstveni za svaku populaciju te je njihova veličina na rubovima distribucije veličine alela kao što je i očekivano (Szpiech i Rosenberg 2011). Prisutnost velikog broja privatnih alela i alelnog bogatstva ukazuju na područja velike raznolikosti koja su kroz duge periode bila stabilna i u kojima su postojali uvjeti za kontinuirane evolucijske procese kao što su npr. glacijalni refugiji (Hewitt 2011). Rezultati dosadašnjih istraživanja rakova porodice Astacidae (potočnog raka, bjelonogog raka i plemenitog raka) ukazali su da je područje zapadnog dijela Balkana poznato kao vruća točka raznolikosti ovih vrsta (Klobučar i sur. 2013; Schrimpf i sur. 2014; Jelić i sur. 2016; Lovrenčić i sur. 2020a). Isto tako je utvrđeno da je to područje služilo kao njihov glacijalni refugij (Trontelj i sur. 2005; Klobučar i sur. 2013; Schrimpf i sur. 2014; Jelić i sur. 2016; Lovrenčić i sur. 2020a) iz kojeg je krenula rekolonizacija sjevernih dijelova Europe, što je vidljivo i iz podataka o smanjenoj genetskoj raznolikosti rakova u tim sjevernijim područjima (Gross i sur. 2017, Bláha i sur. 2016, Berger i sur. 2018).

Iako je broj detektiranih privatnih alela u pojedinim populacijama visok (Tablica 4), populacije DEL i VEL (GK), JAR (ŽPB), KRA, ORA i PRI (LD) te CRN (SB) nemaju detektiranih privatnih alela što može smanjiti sposobnost jedinki iz ovih populacija da se prilagode budućim promjenama u staništu (Foulley i Olivier 2006). Iako postoji mogućnost da je dio privatnih alela ostao nedetektiran i ostali parametri genetske raznolikosti (smanjeni udio polimorfности, mali broj alela, nisko alelno bogatstvo, smanjena heterozigotnost) ukazuju na lošu adaptivnost i niski evolucijski potencijal ovih populacija.

Razina heterozigotnosti u populaciji govori o raznolikosti populacije. Niska heterozigotnost ukazuje na snažan efekt male populacije, odnosno moguće je da je populacija prošla kroz efekt uskog grla. Suprotno tome, visoka razina uočene heterozigotnosti (H_O) govori o visokoj genetskoj varijabilnosti unutar populacije (Schwartz i sur. 2007). Prosječno najmanju H_O pokazuju populacije iz filogrupe SB i ŽPB. Očekivana heterozigotnost veća je od uočene za sve populacije (osim DEL, VEL i PRI) što ukazuje na veću prisutnost homozigota od očekivanog. Višak homozigota u populaciji može se pripisati prisutnosti nul alela. No, u populacijama koje pokazuju višak homozigota STOJ, KRA, ORA, SAR nije utvrđena prisutnost nul alela, stoga višak homozigota može nastati zbog parenja jedinki u bliskom srodstvu, na što ukazuju i vrijednosti F_{IS} u tim populacijama, ili zbog postojanja

subpopulacija, izoliranih dijelova populacija među kojima ne dolazi do parenja (Garnier-Géré i Chikhi 2013).

Prosječno najveću genetsku raznolikost pokazuju populacije filogrupa BAN, CSE, KOR i ZV s visokim brojem alela, vrijednostima alelnog bogatstva, očekivane heterozigotnosti i uočene heterozigotnosti. Najniža genetska raznolikost detektirana je u populacijama koje pripadaju GK, LD, SB i ŽPB s najmanjim brojem alela po lokusu, vrijednostima alelnog bogatstva, očekivane heterozigotnosti i uočene heterozigotnosti (Tablica 4). Razlog niske genetske varijabilnosti ukazuje na vrlo vjerojatno male populacije koje su izolirane kroz duge vremenske periode a između njih nedostaje protok gena. Do gubitka genetske raznolikosti najčešće dolazi kod malih, izoliranih populacija i populacija koje su prošle kroz usko grlo (Allendorf 2002). Pad brojnosti populacije dovodi do parenja u srodstvu i povećanja broja homozigota u populaciji pa one gube stabilnost.

U ovom istraživanju na šest od osam lokusa zabilježena je prisutnost nul alela (Tablica 3). Nul aleli su posljedica mutacija u regijama na koje se vežu mikrosatelitne početnice, a njihova pojava dovodi do prividnog povećanja broja homozigota (von Oosterhout i sur. 2004). Pojava nul alela je u sličnoj frekvenciji zabilježena za lokuse AT1, ATOR37 i AAS3040 i u prethodnim istraživanjima (Iorgu i sur. 2011; Berger i sur. 2018, Pârvulescu i sur. 2020).

Populacije koje pokazuju višak heterozigota ili homozigota nisu u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži. Hardy-Weinbergova ravnoteža podrazumijeva vrlo velike populacije u kojima dolazi do slučajnog parenja (engl. *random mating*) te nema mutacija, migracija, genetičkog drifta i prirodne selekcije. Testiranjem HWE utvrđeno je da devet populacija nije u HW ravnoteži. Na dio rezultata mogla je utjecati i prisutnost nul alela koji prividno povećavaju broj homozigota. Također, populacije koje nisu u HWE imaju više vrijednosti koeficijenta parenja u bliskom srodstvu F_{IS} ($> 0,1$). F_{IS} koeficijent ukazuje na parenje u bliskom srodstvu, a predstavlja udio uočenih heterozigota u odnosu na očekivani broj heterozigota u populaciji i označava gubitak raznolikosti (Frankham 2005). Većina populacija pokazuje vrijednost $F_{IS} \sim 0$ što znači da efekti parenja u bliskom srodstvu i outbreedinga nisu značajne. Najveća vrijednost F_{IS} utvrđena je kod populacije SOP (0,583). Takva visoka vrijednost može ukazivati na parenje u bliskom srodstvu, no ovakav rezultat može biti i posljedica postojanja nul alela koji su detektirani na tri od šest lokusa testiranih na ovoj populaciji.

Smanjenje heterozigotnosti na polimorfim lokusima može se objasniti učinkom uskog grla (Cornuet i Luikart 1997). Populacije u kojima dođe do smanjenja broja jedinki, prenose na

sljedeće generacije manji broj alela. Iako je učinak uskog grla vidljiv u smanjenju heterozigotnosti koja se bilježi u populaciji, smanjenje u broju alela ukazuje na činjenicu da je populacija recentno prošla kroz usko grlo (Luikart i sur. 1998a). Analiza prisutnosti uskog grla u populacijama provedena je s četiri statistička testa pod pretpostavkom tri mutacijska modela. Niti u jednoj populaciji (sva četiri testa pod pretpostavkom sva tri mutacijska modela) nije otkriven višak heterozigota koji ukazuje učinak uskog grla u populacijama. Kvalitativni opis distribucije alela korišten je za utvrđivanje učinka uskog grla. *Mode shift* test pokazuje promjene u distribuciji alela kod populacija koje su prošle učinak uskog grla na neutralnim lokusima (Luikart i sur. 1998b). U svim populacijama frekvencija rijetke klase alela ($<0,1$) je veća od frekvencije ostalih klasa što je očekivano za populacije koje nisu prošle recentni učinak uskog grla.

Wrightova F-statistika procjenjuje raznolikost i strukturu populacija, osim F_{IS} vrijednosti, F_{ST} fiksacijski indeks, govori o varijaciji u frekvenciji alela u odnosu na cijelu populaciju. Vrijednosti F_{ST} koje su bliže nuli upućuju na genetski bliske populacije, dok vrijednosti bliže jedan govore o potpuno diferenciranim populacijama između kojih ne postoji protok gena. F_{ST} vrijednosti za istražene populacije iznose od 0,053 do 0,764, a više od 90% vrijednosti usporedbi parova populacija je iznad vrijednosti 0,2 što ukazuje na visoku genetsku diferencijaciju (Hamilton 2009). Kao što je i očekivano vrijednosti fiksacijskog indeksa su najmanje između populacija unutar iste filogrupe, a veće su što su populacije geografski udaljenije. Vrijednosti fiksacijskog indeksa za hrvatske populacije veće su u odnosu na one procijenjene u drugim istraživanjima potočnog raka (Vorburger i sur. 2014; Berger i sur. 2018; Pârvulescu i sur. 2020) što ukazuje na dulju izoliranost populacija što je u skladu s prethodnim istraživanjima o vremenima razdvajanja filogrupa potočnih rakova (Klobučar i sur. 2013; Lovrenčić i sur. 2020a). Rezultati analize molekularne varijance pokazuju da je najveća raznolikost sadržana unutar populacija, a najmanja između populacija unutar filogrupe. Tu pojavu moguće je objasniti dugom izoliranošću populacija i geografskom udaljenosti što je u skladu s visokim F_{ST} vrijednostima.

Genetsku strukturiranost i diferencijaciju među populacijama moguće je predstaviti i pomoću D_A genetskih udaljenosti. Za razliku od F_{ST} vrijednosti koje uzimaju u obzir usporedbu parova populacija, D_A udaljenosti računaju se na način da se istovremeno uzimaju u obzir udaljenosti između svih populacija. Za izračun genetske diferencijacije model uzima u obzir i evolucijske sile mutaciju i drift koje utječu na lokuse (Takezaki i Nei 1996). Vrijednost D_A udaljenosti se povećavaju što je dulja vremenska odvojenost populacija. Dendrogram konstruiran metodom

susjednog sparivanja temeljen na D_A udaljenostima pokazuje grupiranje populacija prema pripadnim filogrupama i veliku genetsku različitost populacija na što ukazuju duge grane koje odvajaju vanjske čvorove prema kraćim granama između unutarnjih čvorova (Slika 7). Podudarne rezultate je dala i analiza glavnih koordinata (Slika 6).

Rezultati strukturiranja populacija pokazuju postojanje 15 različitih klastera. Većina populacija grupira se u klastere s populacijama koje pripadaju istoj filogrupi (Slika 8), što je podudarno s rezultatim analize molekularne varijance u kojoj je utvrđeno da je najmanja varijabilnost među populacijama unutar iste filogrupe. Za populaciju ZV utvrđeno je da dio jedinki pripada jednom, a dio jedinki različitom klasteru što ukazuje na postojanje jedinki koje su unutar populacije genetski vrlo različite.

Rezultati analiza genetske raznolikosti mogu se koristiti u svrhu konzervacije ove osjetljive i zaštićene vrste jer omogućavaju estimaciju adaptivnog i evolucijskog potencijala populacije (Schwartz i sur. 2007). Konzervacija autohtonih populacija rakova nužna je jer se u slatkovodnim sustavima opaža kontinuirano opadanje u brojnosti populacija (Holdich i sur. 2009). Efikasne konzervacijske strategije zahtijevaju poznavanje ekologije (ekoloških zahtjeva), genetske raznolikosti i genetskih struktura samih populacija. Korištenjem mikrosatelitnih markera u svrhu istraživanja populacijskih istraživanja moguće je dobiti uvid u postojanje jedinstvenih i/ili posebno ugroženih populacija (Schwartz i sur. 2007). Cilj konzervacijskih planova je zaštititi populacije koje pokazuju najveću genetsku raznolikost, kao i idenificirati rizik populacija s najmanjom raznolikošću i najmanjim adaptivnim potencijalom (Moss i sur. 2003.). Uzimajući u obzir sve istražene parametre genetske raznolikosti populacija, populacije s najmanjom genetskom raznolikošću i posljedično adaptivnim potencijalom su populacije iz filogrupa SB, ŽPB, GK. Suprotno tome, genetski raznolike su populacije koje pripadaju filogrupama KOR, ZV, LD, CSE i BAN.

6. Zaključak

Populacijsko genetičke analize provedene su na 12 mikrosatelitnih lokusa 437 jedinki iz 17 populacija.

Novorazvijeni lokusi pogodni su za korištenje u daljnjim istraživanjima populacijsko genetske strukture potočnog raka. Markere ATM57 i ATM64 potrebno je dodatno optimizirati kako bi se izbjegla/smanjila pojava nul alela i moguća pogreška u određivanju genetske raznolikosti populacija. Iako je velika pojava nul alela utvrđena na lokusima AT1 i ATOR37, njihovo uključivanje u analize nije pokazalo značajnu razliku u rezultatima.

Veliki broj privatnih alela i alelnog bogatstva te visoke razine očekivane i uočene heterozigotnosti te fiksacijskog indeksa pokazuju da je genetska raznolikost i diferencijacija populacija potočnog raka u Hrvatskoj velika.

U većini populacija uočena heterozigotnost je manja od očekivane heterozigotnosti, no s obzirom da nije potvrđeno da su populacije prošle kroz usko grlo, ove vrijednosti je moguće objasniti blago pozitivnim vrijednostima koeficijenta parenja u bliskom srodstvu.

Prema analizama populacijske strukture, populacije su jasno odvojene prema geografskoj poziciji i pripadajućim mtDNA filogrupama.

Populacije u Hrvatskoj pokazuju veću genetsku raznolikost u odnosu na dosad istražene populacije potočnog raka u Europi.

Ovo istraživanje pruža temelj za buduća istraživanja te omogućuje praćenje raznolikosti potočnog raka tijekom vremena te daje doprinos saznanjima o genetskoj raznolikosti vrste u Europi.

Rezultati istraživanja bit će korišteni u budućim planovima upravljanja ovom osjetljivom vrstom.

7. Literatura

- Allendorf, F. W. 2017. Genetics and the conservation of natural populations: allozymes to genomes. *Mol. Ecol.* 26, 420-430
- Allendorf F. W. 2002. Genetics and the Persistence of Small Populations. U: Liberg O. (ur.) Genetics aspects of viability in small wolf populations with special emphasis on the Scandinavian wolf population. Report from an International Expert Workshop (Liberg, O.). Färna Herrgård, 44.
- Bănărescu, P.M. 2004. Distribution pattern of the aquatic fauna of the Balkan Peninsula. U: Griffiths, H.J., Kryštufek, B. I Reed J.M. (ur.) Balkan Biodiversity, Pattern and Process in the European Hotspot. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, str. 203-217
- Baric, S., Höllrigl, A., Füreder, L., Dalla Via, J. 2005. Mitochondrial and microsatellite DNA analyses of *Austropotamobius pallipes* populations in South Tyrol (Italy) and Tyrol (Austria). *Bull. Fr. Pêche Piscic.* 376-377, 599-612
- Berger, C., Štambuk, A., Maguire, I., Weiss, S., Füreder, L. 2018. Integrating genetics and morphometrics in species conservation – A case study on the stone crayfish, *Austropotamobius torrentium*. *Limnologica* 69, 28-38
- Bláha, M., Žurovcová, M., Kouba, A., Policar, T. 2016. Founder event and its effect on genetic variation in translocated populations of noble crayfish (*Astacus astacus*). *J. Appl. Genetics* 57, 99-106
- Chistiakov, D. A., Hellemans, B., Volckaert, F. A. M. 2006. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture* 255, 1-29
- Chapuis, M. P., Estoup, A. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol. Biol. Evol.* 24, 621-631
- Cornuet, J.M., Luikart, G. 1997. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144, 2001-2014
- Council directive 92/43/EEC on the conservation of natural habitats and of wild fauna and flora. 2000. The Official Journal of the European Union. L296, 1-15

- Crandall, K., De Grave, S. 2017. An updated classification of the freshwater crayfishes (Decapoda: Astacidea) of the world, with a complete species list. *J. Crust. Biol.* 37 (5), 615-653
- Earl, D. A., vonHoldt, B. M. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* 4, 359-361
- Ellegren, H. 2004. Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. *Nat. Rev. Genet.* 5 (6), 435-445
- Ellegren, H. 2000. Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends Genet.* 16 (12), 551-558
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online* 1, 47-50
- Flores-Rentería, L., Krohn, A. 2013. Scoring Microsatellite Loci. U: Kantartzi, S. (ur.) *Microsatellites. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Totowa, NJ, Humana Press, str. 319-336
- Foulley, J. L., Ollivier, L. 2006. Estimating allelic richness and its diversity. *Livest. Sci.* 101, 150-158
- Frankham R. 2005. Stress and adaptation in conservation genetics. *J. Evol. Biol.* 18(4), 750-755
- Frankham, R. 2003. Genetics and conservation biology. *C. R. Biol.* 326
- Frankham R. 1996. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conserv. Biol.* 10, 1500–1508
- Füreder, L., Gherardi, F., Souty-Grosset, C. 2010. *Austropotamobius torrentium*. The IUCN Red List of Threatened Species. e.T2431A121724677
- Garnier-Géré, P., Chikhi, L. 2013. Population subdivision, Hardy-Weinberg equilibrium and the Wahlund effect. U: eLS. John Wiley & Sons, Chichester
- Gottstein, S., Hudina, S., Lucić, A., Maguire, I., Ternjej, I., Žganec, K. 2012. Crveni popis rakova (Crustacea) slatkih i boćatih voda Hrvatske. Državni zavod za zaštitu prirode

- Goudet, J. 2003. FSTAT (ver. 2.9.4), a program to estimate and test population genetics parameters. Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html> Updated from Goudet (1995)
- Grandjean, F., Tan, M. H., Gan, M. H., Lee, Y. P., Kawai, T., Distefano, R. J., Blaha, M., Roles, A. J., Austin, C. M. 2017. Rapid recovery of nuclear and mitochondrial genes by genome skimming from Northern Hemisphere freshwater crayfish. *Zool. Scr.* 46, 718-728
- Grandjean, F., Souty-Grosset, C. 2000. Genetic and morphological variation in the endangered crayfish species, *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet) (Crustacea, Astacidae) from the Poitou-Charentes region (France). *Aquat. Sci.* 62, 1-19
- Greenbaum, G., Templeton, A. R., Zarmi, Y., Bar-David, S. 2014. Allelic richness following population founding events – A stochastic modeling framework incorporating gene flow and genetic drift. *PloS ONE* 9, e115203
- Gross, R., Kõiv, K., Pukk, L., Kaldre, K. 2017. Development and characterization of novel tetranucleotide microsatellite markers in the noble crayfish (*Astacus astacus*) suitable for highly multiplexing and for detecting hybrids between the noble crayfish and narrow-clawed crayfish (*A. leptodactylus*). *Aquaculture* 472, 50-56
- Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Chaumeil, P., Léger, P., Lepais, O., Lepoittevin, C., Malausa, T., Revardel, E., Salin, F., Petit, R.J. 2011. Current trends in microsatellite genotyping. *Mol. Ecol. Resour.* 11, 591-611
- Guo, S. W., Thompson, E. A. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics* 48, 361-372
- Hamilton, M. B. 2009. *Population Genetics*. John Wiley & Sons, Chichester
- Hardy, O. J., Charbonnel, N., Fréville, H., Heuertz, M. 2003. Microsatellite allele sizes: a simple test to assess their significance on genetic differentiation. *Genetics* 163, 1467-1482
- Hewitt, G.M. 2011 *Mediterranean Peninsulas: The evolution of hotspots*. U: Zachos, F.E. i Habel, J.C. (ur.) *Biodiversity Hotspots*. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag, str. 123-147
- 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. *Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst.* 394-395, 11

- Iorgu, E. I., Popa, O. P., Petrescu, A.-M., Popa, L. O. 2011. Cross-amplification of microsatellite loci in the endangered stone crayfish *Austropotamobius torrentium* (Crustacea: Decapoda). *Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst.* 401, 08
- Jakobsson, M., Rosenberg, N. A. 2007. *CLUMPP*: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23, 1801-1806
- Jelić, M., Klobučar, G. I. V., Grandjean, F., Puillandre, N., Franjević, D., Futo, M., Amouret, J., Maguire, I. 2016. Insights into the molecular phylogeny and historical biogeography of the white-clawed crayfish (Decapoda, Astacidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 103, 26-40
- Jombart, T. 2008. *adeigenet*: a R package for the multivariate analysis of genetic markers *Bioinformatics* 24, 1403-1405
- Kalinowski, S. T. 2002. How many alleles per locus should be used to estimate genetic distances? *Heredity* 88, 62-65
- Klobučar, G.I.V., Podnar, M., Jelić, M., Franjević, D., Faller, M., Štambuk, A., Gottstein, S., Simić, V., Maguire, I. 2013. Role of the Dinaric Karst (western Balkans) in shaping the phylogeographic structure of the threatened crayfish *Austropotamobius torrentium*. *Freshw. Biol.* 58 (6), 1089-1105
- Kouba, A., Tikal, J., Císař, P., Veselý, L., Fořt, M., Příborský, J., Patoka, J., Buřič, M. 2016. The significance of droughts for hyporheic dwellers: evidence from freshwater crayfish. *Sci. Rep.* 6, 26569
- Kouba, A., Petrusek, A., Kozák, P. 2014. Continental-wide distribution of crayfish species in Europe: update and maps. *Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst.* 413, 05
- Kõiv, K., Gross, R., Paaver, T., Kuehn, R. 2008. Isolation and characterization of first microsatellite markers for the noble crayfish, *Astacus astacus*. *Conserv. Genet.* 9, 1703-1706
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547-1549
- Laggis, A., Baxevaniam, A.D., Charalampidou, A., Maniatsi, S., Triantafyllidis, A., Abatzopoulos, T. J. 2017. Microevolution of the noble crayfish (*Astacus astacus*) in the Southern Balkan Peninsula. *BMC Evol. Biol.* 17 (122)

- Langella, O. 1999. Populations 1.2.32: a population genetic software. <https://bioinformatics.org/populations/>
- Levinson, G., Gutman, G. 1987. Slipped-strand mispairing: A major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* 4 (3), 203-221
- Li, Y. C., Korol, A. B., Fahima, T., Beiles, A., Nevo, E. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol. Ecol.* 11, 2453-2465
- Lovrenčić, L., Bonassin, L., Boštjančić, Lj. L., Podnar, M., Jelić, M., Klobučar, G., Jaklič, M., Slavevska-Stamenković, V., Hinić, J., Maguire, I. 2020a. New insights into the genetic diversity of the stone crayfish: taxonomic and conservation implications. *BMC Evol. Biol.* 20 (146)
- Lovrenčić, L., Pavić, V., Majnarić, S., Abramović, L., Jelić, M., Maguire, I. 2020b. Morphological diversity of the stone crayfish – traditional and geometric morphometric approach. *Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst.* 421, 1
- Luikart, G., Cornuet, J. M. 1998. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conserv. Biol.* 12, 228-237
- Luikart, G., Sherwin, W. B., Steele, B. M., Allendorf, F. W. 1998a. Usefulness of molecular markers for detecting population bottlenecks via monitoring genetic change. *Mol. Ecol.* 7, 963-974
- Luikart, G., Allendorf, F. W., Cornuet, J. M., Sherwin, W. B. 1998b. Distortion of allele frequency distributions provided a test for recent population bottlenecks. *J. Hered.* 89, 238–247
- Maguire, I., Klobučar, G., Žganec, K., Jelić, M., Lucić, A., Hudina, S. 2018. Recent changes in distribution pattern of freshwater crayfish in Croatia – threats and perspectives. *Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst.* 419, 2
- Maguire, I., Marn, N., Klobučar, G. 2017. Morphological evidence for hidden diversity in the threatened stone crayfish *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803) (Decapoda: Astacoidea: Astacidae) in Croatia. *J. Crust. Biol.* 37 (1), 7-15

- Maguire, I. 2014. Nacionalni programi za praćenje stanja očuvanosti vrsta i staništa u Hrvatskoj. Potočni rak ili rak kamenjar *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803). Državni zavod za zaštitu prirode
- Maguire, I., Jelić, M., Klobučar, G. 2011. Update on the distribution of freshwater crayfish in Croatia. *Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst.* 401, 31
- Megléc, E., Pech, N., Gilles, A., Dubut, V., Hingamp, P., Trilles, A., Grenier, R., Martin, J.F. 2014. QDD version 3.1: a user-friendly computer program for microsatellite selection and primer design revisited: experimental validation of variables determining genotyping success rate. *Mol. Ecol. Resour.* 14, 1302-1313
- Moss, R., Pieltney, S. B., Palmer, S. C. F. 2003. The use and abuse of microsatellite DNA markers in conservation biology. *Wildl. Biol.* 9, 243-250
- Narodne Novine 2013. Pravilnik o strogo zaštićenim vrstama. Narodne novine 144/13
- Narodne Novine 2013. Zakon o zaštiti prirode. Narodne novine 80/13
- Nei, M., Tajima, F., Taten, Y. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *J. Mol. Evol.* 19, 153-170
- Pârvulescu, L., Iorgu, E. L., Zaharia, C., Ion, M. C., Satmari, A., Krapal, A. M., Popa, O. P., Miok, K., Petrescu, I., Popa, L. O. 2020. The future of endangered crayfish in light of protected areas and habitat fragmentation. *Sci. Rep.* 10, 14870
- Peakall, R., Smouse, P. E. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539
- Pritchard, J. K., Stephens, M., Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-959
- Raymond, M., Rousset, F. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49, 1280-1283
- Reynolds, J., Souty-Grosset, C. 2012. Management of freshwater biodiversity: crayfish as bioindicators. Cambridge University Press, Cambridge
- Rice, W. R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43, 223-225

- Rosenberg, N. A. 2004. *Distruct*: a program for the graphical display of population structure. *Mol. Ecol. Notes* 4, 137-138
- Rousset, F. 2008. GENEPOP'007: a complete re-implantation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resour.* 8, 103-106
- Saitou, N., Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425
- Schrimpf, A., Theissinger, K., Dahlem, J., Maguire, I., Pârvulescu, L., Schulz, H. K., Schulz, R. 2014. Phylogeography of noble crayfish (*Astacus astacus*) reveals multiple refugia. *Freshw. Biol.* 59, 761-776
- Schwartz, M. K., Luikart, G., Waples, R.S. 2007. Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *Trends Ecol. Evol.* 22 (1), 25-33
- Selkoe, K. A., Toonen, R. J. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol. Lett.* 9, 615-629
- Sunde, J., Yıldırım, Y., Tibblin, P., Forsman, A. 2020. Comparing the performance of microsatellites and RADseq in population genetic studies: Analysis of data for pike (*Esox lucius*) and a synthesis of previous studies. *Front. Genet.* 11 (218)
- Souty-Grosset, C., Grandjean, F., Gouin, N. 2004. Conservation and management of native crayfish populations. *Freshw. Crayfish.* 14, 1-20
- Szpiech, Z., Rosenberg, N. A. 2011. On the distribution of private microsatellite alleles. *Theor. Popul. Biol.* 80 (2), 100-113
- Takezaki, N., Nei, M. 1996. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics* 144, 389-399
- Trontelj, P., Machino, Y., Sket, B. 2005. Phylogenetic and phylogeographic relationships in the crayfish genus *Austropotamobius* inferred from mitochondrial COI gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 34, 212 - 226
- van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M., Shipley, P. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes.* 4, 535-538

- Vlach, P., Fischer, D., Hulec, L. 2009. Microhabitat preferences of the stone crayfish *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803). *Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst.* 394-395, 15
- Vorburger, C., Rhyner, N., Hartikainen, H., Jokela, J. 2014. A set of new and cross-amplifying microsatellite loci for conservation genetics of the endangered stone crayfish (*Austropotamobius torrentium*). *Conservation Genet. Resour.* 6, 629-631
- Zardoya, R., Vollmer, D. M., Craddock, C., Streelman, J. T., Karl, S., Meyer, A. 1996. Evolutionary conservation of microsatellite flanking regions and their use in resolving the phylogeny of cichlid fishes (Pisces: Perciformes). *Proc. R. Soc. Lond. B.* 263, 1589-1598
- Zimmerman, S. J., Aldridge, C. L., Oyeler-McCance, S. J. 2020. An empirical comparison of population genetic analyses using microsatellite and SNP data for a species of conservation concern. *BMC Genomics* 21 (382)

8. Prilozi

Prilog 1. Značajke svih testiranih mikrosatelitnih lokusa za lančanu reakciju polimerazom (PCR): naziv lokusa, motiv ponavljanja, sekvenca uzvodne i nizvodne početnice u 5' – 3' smjeru.

Prilog 2. Vjerojatnost simulirana modelima IAM – *infinite allele model*, TPM – *two phase model*, SMM – *stepwise mutation model* izračunata pomoću tri testa: *Sign test*, *Standardized differences test*, *Two tail Wilcoxon sign rank test*. Značajne vrijednosti označene su crvenom bojom.

Prilog 3. Genetska raznolikost populacija i prosječna vrijednost po filogrupama za osam mikrosatelitnih lokusa. P – postotak polimorfnosti, N_A – prosječni broj alela, A_R – alelna bogatstvo, A_{PR} – privatni aleli, u_{HE} – očekivana heterozigotnost, H_O - uočena heterozigotnost, F_{IS} – koeficijent parenja u bliskom srodstvu, p_{HWE} – vjerojatnost Hardy-Weinberg ravnoteže nakon Bonferroni korekcije uz značajnost $\alpha = 0,05$. Značajne vrijednosti označene su zvjezdicom *.

Prilog 4. Rezultati analize molekularne varijance (AMOVA) za osam mikrosatelitnih lokusa. Postotak varijance na tri hijerarhijske razine.

Prilog 5. Vjerojatnost odstupanja od ravnoteže između mutacija i genetičkog drifta za osam mikrosatelitnih lokusa simulirana modelima IAM – *infinite allele model*, TPM – *two phase model*, SMM – *stepwise mutation model* izračunata pomoću četiri testa: *Sign test*, *Standardized differences test*, *One tail Wilcoxon rank test*, *Two tail Wilcoxon sign rank test*. Značajne vrijednosti označene su crvenom bojom.

Prilog 6. Distribucija frekvencija alela u različitim klasama frekvencije za svaku populaciju dobivene *mode-shift* testom na osam mikrosatelitnih lokusa. Populacije su razvrstane prema filogrupama kojima pripadaju.

Prilog 7. Fiksacijski indeksi (F_{ST}) između parova populacija za osam mikrosatelitnih lokusa. Tamnija boja označava veću vrijednost F_{ST} .

Prilog 8. Analiza glavnih koordinata (PcoA) na osam mikrosatelitnih lokusa. Različite boje označavaju različite filogrupe kojima populacije pripadaju.

Prilog 9. Neukorijenjeni dendrogram napravljen metodom susjednog sparivanja temeljen na matrici D_A genetskih distanci između populacija na osam mikrosatelitnih lokusa. Različite boje označavaju različite filogrupe kojima populacije pripadaju. Imena populacija navedena su u Tablici 1.

Prilog 1. Značajke svih testiranih mikrosatelitnih lokusa za lančanu reakciju polimerazom (PCR): naziv lokusa, motiv ponavljanja, sekvenca uzvodne i nizvodne početnice u 5' – 3' smjeru.

Lokus	Motiv	Sekvenca uzvodne početnice	Sekvenca nizvodne početnice
ATM50	AG	TGTA AAAACGACGGCCAGTCTTAAC CCACTCCTGCTGCA	AAGAGACGGTCAATGTACACGT
ATM51	AGG	TGTA AAAACGACGGCCAGTGGAGG ACA ACTGGATAATGACGT	TG TACTGCTCAACACCACAAGT
ATM52	AGG	TGTA AAAACGACGGCCAGTCGGGTC ATCATGCCCAAGTT	GGGTCTTGTGAGGAACGAGG
ATM53	AGC	TGTA AAAACGACGGCCAGTCTCCA CAACCCATGGTACC	GAGGTGGACGTCCTTGCTAG
ATM54	AGGC	TGTA AAAACGACGGCCAGTGCCTAG CAACTAGAGCCACC	CACACTCCTGCCTCCATTCA
ATM55	AG	TGTA AAAACGACGGCCAGTGCCCTA GAGGAAACGACTGG	AGAGATTCTTGGTGACCGC
ATM56	AACCT	TGTA AAAACGACGGCCAGTAGTCAG CCAGTCCTCTCGAT	TCCTCTCACCTGTACACCGT
ATM57	AAGG	TGTA AAAACGACGGCCAGTTCTGGG TCTAGAGCAGCGG	TGGCAAATGGTGAGGAGGAT
ATM58	AC	TGTA AAAACGACGGCCAGTCGATGG CGGCGTGAGAAATA	CGTGTGCGTTGTATGGTTGC
ATM59	AAGGC	TGTA AAAACGACGGCCAGTCAGTGT AAGGTAGGCAGCGT	TGCTCCTTCACCTGCCTCTA
ATM60	AC	TGTA AAAACGACGGCCAGTTAAGCA CAGCGACAGTTCCT	GCCTAACGGTCTGTGTTTCGT
ATM61	AGG	TGTA AAAACGACGGCCAGTCAGGGC AGGTCTACATTCCA	ACAACGGAACAGTGACACGT
ATM62	ATC	TGTA AAAACGACGGCCAGTGAGAA GGCCTGCGTTCTGTA	CTGGTGATGGTCATTATGATGGTG
ATM63	AGCC	TGTA AAAACGACGGCCAGTCAGACA GCCAGCTAGCCAG	ATATGTGATGCCACGCTGCT
ATM64	AGG	TGTA AAAACGACGGCCAGTTACTTG AGGGATCGACCAGC	TGACAAAGGTGGCTCGTGAT
ATM65	AGCC	TGTA AAAACGACGGCCAGTGGGCA ACTTGTCGGTTGAGA	TATAACCAGCCTTGCCAGCC
ATM66	AG	TGTA AAAACGACGGCCAGTAACTCC AGAGCCTCCTCAGT	CCGGGATGTGTAAGTGTGGT
ATM67	AAGG	TGTA AAAACGACGGCCAGTGTGACC AGGGCTTCAAGTCA	AGGCATCTTCCGGTTCATCC
ATM68	AGC	TGTA AAAACGACGGCCAGTGGCTTC TCAACCACCGTTA	GGAAGCTGGCTACAGGGTAC
ATM69	AG	TGTA AAAACGACGGCCAGTATCCAT CATGCAACTGGTCC	ATATGCTGGTGGCCTTCTGG
ATM70	AC	TGTA AAAACGACGGCCAGTCACGCA CAAAGAATGACACGT	TGTGCGTGTCTGTCAGTCAA
ATM71	AG	TGTA AAAACGACGGCCAGTGTTTCC CGTCGTCCTCGTAA	GGAGATCCTGTTGGCGTTCA
ATM72	AGG	TGTA AAAACGACGGCCAGTTAGTCC AGGCAACAATCGCT	GCGTACTCATGCACACCAC
ATM73	AC	TGTA AAAACGACGGCCAGTTTAGGA CCCTGCTTGTGGTG	CCCATGTCAAGTGCCTCTG
ATM74	AGGC	TGTA AAAACGACGGCCAGTTGTCTG CCTCCCTACCTACC	CGACGTGTGGACCAGTTACA

Prilog 1. Nastavak

Lokus	Motiv	Sekvenca uzvodne početnice	Sekvenca nizvodne početnice
ATM75	AC	TGTA AAAACGACGGCCAGTGGACTC CAGAACCGAGTGTT	GCGCCGTATAATGCAGCTTG
ATM76	AGC	TGTA AAAACGACGGCCAGTGAGCAC TCAGTCCCTTCGAG	CGATCTATCGGTGGTGCTGG
ATM77	AGG	TGTA AAAACGACGGCCAGTGCCGA ATGAAGAAATCGCG	TCCAGATGTGAACTCCCTGGT
ATM78	AGGC	TGTA AAAACGACGGCCAGTGCGTCC GGGATACTCTTGAA	CATCTTCTGTGGTGCCACCT
ATM79	ACG	TGTA AAAACGACGGCCAGTTACGAC TCTCCTGGACCTCC	TTGATTCTCAAGGAGCGGCC
ATM80	CCG	TGTA AAAACGACGGCCAGTGTAGCA GAGGTGGGAAGACG	TTGTACCTGACGACAGAGCG
ATM81	ACC	TGTA AAAACGACGGCCAGTCTGGAG GCCATACGAGAC	CCGTGTCAATGCCTGTAGCT
ATM82	AGC	TGTA AAAACGACGGCCAGTATACCG CTCATGCCACTACC	GAGGAAGCTCTCAGGCAGTC
ATM83	AC	TGTA AAAACGACGGCCAGTTAGAGA ATGTCACGCCCTCG	GTTTCGTCCA ACTGGCAGTCT
ATM84	AC	TGTA AAAACGACGGCCAGTCTACTG CCACTTGTGAACGC	TCCCGCATCACCATTGTGTT

Prilog 2. Vjerojatnost simulirana modelima IAM – *infinite allele model*, TPM – *two phase model*, SMM – *stepwise mutation model* izračunata pomoću tri testa: *Sign test*, *Standardized differences test*, *Two tail Wilcoxon sign rank test*. Značajne vrijednosti označene su crvenom bojom.

	Sign test			Standardized differences test			Two tail Wilcoxon signrank		
	IAM	TPM	SMM	IAM	TPM	SMM	IAM	TPM	SMM
BLI	0,149	0,534	0,048	0,179	0,499	0,064	0,047	1,000	0,047
BRU	0,375	0,275	0,243	0,101	0,443	0,026	0,438	1,000	0,109
DEL	0,075	0,401	0,593	0,021	0,082	0,290	0,063	0,125	0,875
JAR	0,623	0,232	0,196	0,355	0,114	0,025	0,875	0,313	0,188
STOJ	0,229	0,200	0,041	0,084	0,002	0,000	0,438	0,109	0,047
KRA	0,134	0,175	0,498	0,026	0,106	0,286	0,031	0,109	0,688
MAJ	0,373	0,563	0,062	0,258	0,346	0,028	0,156	0,844	0,109
OKI	0,105	0,382	0,402	0,165	0,366	0,012	0,156	0,563	1,000
ORA	0,143	0,129	0,107	0,063	0,001	0,000	0,156	0,063	0,063
DOLJ	0,167	0,505	0,542	0,069	0,260	0,313	0,047	0,438	1,000
PRI	0,024	0,469	0,212	0,021	0,107	0,430	0,016	0,109	1,000
CRN	0,519	0,476	0,421	0,271	0,107	0,023	0,625	0,156	0,156
SAR	0,038	0,052	0,379	0,023	0,100	0,349	0,031	0,031	0,813
SOP	0,055	0,047	0,047	0,093	0,021	0,001	0,063	0,063	0,063
VEL	0,494	0,141	0,120	0,414	0,311	0,066	1,000	0,625	0,156
ZV	0,162	0,476	0,508	0,080	0,297	0,218	0,047	0,563	1,000
KOR	0,032	0,195	0,526	0,012	0,047	0,155	0,016	0,047	0,109

Prilog 3. Genetska raznolikost populacija i prosječna vrijednost po filogrupama za osam mikrosatelitnih lokusa. P – postotak polimorfnosti, N_A – prosječni broj alela, A_R – alelna bogatstvo, A_{PR} – privatni aleli, uH_E – očekivana heterozigotnost, H_O - uočena heterozigotnost, F_{IS} – koeficijent parenja u bliskom srodstvu, p_{HWE} – vjerojatnost Hardy-Weinberg ravnoteže nakon Bonferroni korekcije uz značajnost $\alpha = 0,05$. Značajne vrijednosti označene su zvjezdicom *.

Populacija	Filogrupa	P	N_A	A_R	A_{PR}	uH_E	H_O	F_{IS}	p_{HWE}
BRU	BAN	1,00	4,75	3,62	1	0,551	0,473	0,144	*
MAJ	BAN	1,00	4,13	3,19	1	0,456	0,313	0,317	*
prosjeak BAN		1,00	4,44	3,41	2	0,50	0,39	0,23	
BLI	CSE	1,00	4,13	3,48	4	0,524	0,431	0,18	
DOLJ	CSE	1,00	4,50	3,86	2	0,595	0,465	0,221	*
OKI	CSE	1,00	5,00	3,84	5	0,543	0,440	0,193	*
STOJ	CSE	1,00	3,88	2,90	3	0,362	0,351	0,032	
prosjeak CSE		1,00	4,38	3,52	14	0,51	0,42	0,16	
DEL	GK	0,75	2,75	2,50	0	0,393	0,349	0,113	*
VEL	GK	0,88	3,13	2,49	0	0,344	0,363	-0,055	
prosjeak GK		0,81	2,94	2,49	0	0,37	0,36	0,03	
KOR	KOR	0,88	3,88	3,79	3	0,585	0,455	0,232	*
KRA	LD	0,88	3,13	2,72	0	0,454	0,434	0,045	
ORA	LD	0,88	3,25	2,53	0	0,307	0,227	0,262	*
PRI	LD	1,00	3,50	3,11	0	0,532	0,485	0,09	*
prosjeak LD		0,92	3,29	2,79	0	0,43	0,38	0,13	
CRN	SB	0,88	2,38	2,21	0	0,304	0,183	0,407	*
ZV	ZV	1,00	4,50	3,89	10	0,584	0,402	0,316	*
JAR	ŽPB	0,75	2,38	2,32	0	0,307	0,325	-0,061	
SAR	ŽPB	0,88	2,88	2,60	1	0,457	0,315	0,315	*
SOP	ŽPB	0,75	2,63	2,18	2	0,262	0,058	0,782	*
prosjeak ŽPB		0,79	2,63	2,37	3	0,34	0,23	0,35	

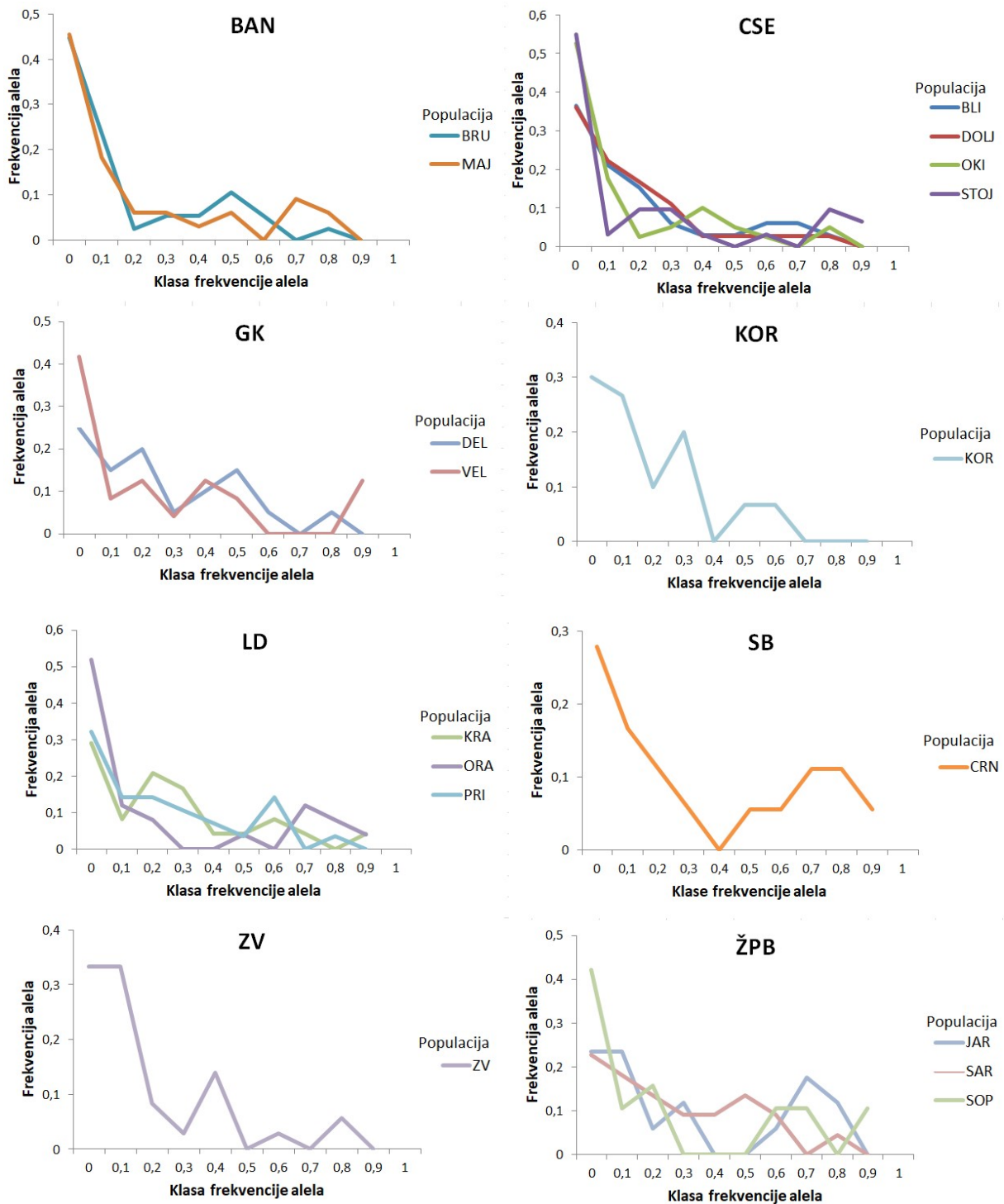
Prilog 4. Rezultati analize molekularne varijance (AMOVA) za osam mikrosatelitnih lokusa. Postotak varijance na tri hijerarhijske razine.

Razina	Postotak varijacije / %
Između filogrupa	36,07
Između populacija unutar filogrupe	14,91
Unutar populacija	49,03

Prilog 5. Vjerojatnost odstupanja od ravnoteže između mutacija i genetičkog drifta za osam mikrosatelitnih lokusa simulirana modelima IAM – *infinite allele model*, TPM – *two phase model*, SMM – *stepwise mutation model* izračunata pomoću četiri testa: *Sign test*, *Standardized differences test*, *One tail Wilcoxon rank test*, *Two tail Wilcoxon sign rank test*. Značajne vrijednosti označene su crvenom bojom.

	Sign test			Standardized differences test			One tail Wilcoxon rank test			Two tail Wilcoxon sign rank		
	IAM	TPM	SMM	IAM	TPM	SMM	IAM	TPM	SMM	IAM	TPM	SMM
BLI	0,207	0,492	0,059	0,089	0,419	0,072	0,014	0,473	0,980	0,027	0,945	0,055
BRU	0,443	0,248	0,071	0,102	0,440	0,005	0,125	0,629	0,980	0,250	0,844	0,055
DEL	0,018	0,154	0,549	0,016	0,075	0,250	0,008	0,023	0,344	0,016	0,047	0,688
JAR	0,604	0,251	0,202	0,383	0,128	0,017	0,656	0,781	0,922	0,844	0,563	0,438
STOJ	0,082	0,061	0,009	0,022	0,000	0,000	0,963	0,986	0,996	0,195	0,039	0,012
KRA	0,087	0,107	0,626	0,026	0,092	0,326	0,008	0,039	0,406	0,016	0,078	0,813
MAJ	0,433	0,499	0,015	0,353	0,174	0,001	0,273	0,770	0,986	0,547	0,547	0,039
OKI	0,039	0,439	0,255	0,095	0,462	0,010	0,037	0,230	0,727	0,074	0,461	0,641
ORA	0,468	0,423	0,366	0,252	0,018	0,000	0,766	0,961	0,961	0,578	0,109	0,109
DOLJ	0,070	0,277	0,597	0,016	0,109	0,468	0,006	0,037	0,422	0,012	0,074	0,844
PRI	0,007	0,494	0,077	0,022	0,121	0,492	0,002	0,037	0,680	0,004	0,074	0,742
CRN	0,510	0,531	0,381	0,448	0,296	0,084	0,594	0,766	0,813	0,938	0,578	0,469
SAR	0,009	0,013	0,649	0,006	0,036	0,166	0,004	0,004	0,055	0,008	0,008	0,109
SOP	0,327	0,260	0,060	0,328	0,082	0,005	0,719	0,961	0,984	0,688	0,109	0,047
VEL	0,506	0,182	0,159	0,350	0,351	0,094	0,406	0,711	0,961	0,813	0,688	0,109
ZV	0,061	0,265	0,272	0,029	0,159	0,324	0,006	0,098	0,371	0,012	0,195	0,742
KOR	0,015	0,131	0,421	0,009	0,052	0,164	0,004	0,020	0,055	0,008	0,039	0,109

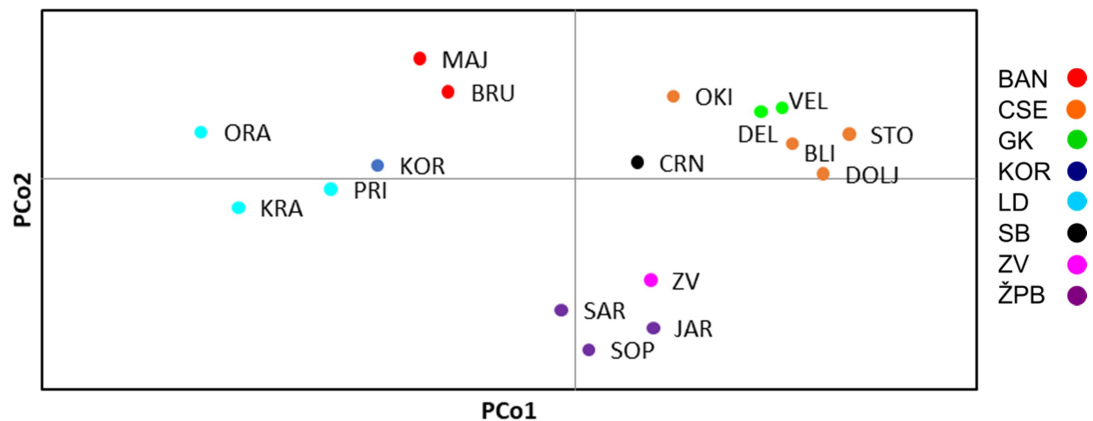
Prilog 6. Distribucija frekvencija alela u različitim klasama frekvencije za svaku populaciju dobivene *mode-shift* testom na osam mikrosatelitnih lokusa. Populacije su razvrstane prema filogrupama kojima pripadaju.



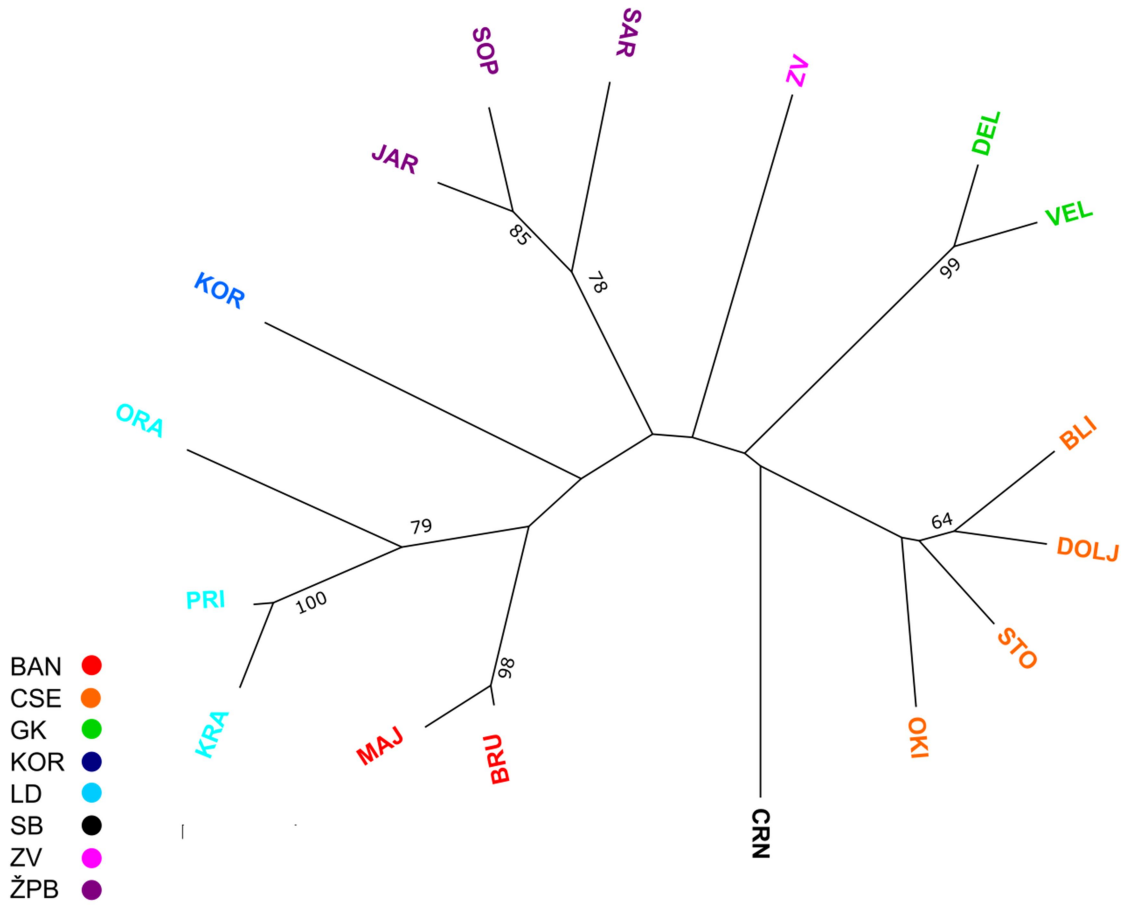
Prilog 7. Fiksacijski indeksi (F_{ST}) između parova populacija za osam mikrosatelitnih lokusa. Tamnija boja označava veću vrijednost F_{ST} .

	BLI	BRU	DEL	JAR	STO	KRA	MAJ	OKI	ORA	DOLJ	PRI	CRN	SAR	SOP	VEL	ZV	KOR
BLI																	
BRU	0,385																
DEL	0,444	0,479															
JAR	0,473	0,478	0,591														
STO	0,188	0,452	0,489	0,573													
KRA	0,496	0,381	0,564	0,565	0,581												
MAJ	0,462	0,078	0,520	0,558	0,521	0,441											
OKI	0,182	0,339	0,446	0,487	0,249	0,480	0,421										
ORA	0,582	0,359	0,645	0,680	0,666	0,452	0,381	0,522									
DOLJ	0,119	0,372	0,374	0,407	0,133	0,463	0,437	0,172	0,545								
PRI	0,444	0,316	0,501	0,492	0,539	0,107	0,359	0,426	0,390	0,409							
CRN	0,451	0,432	0,549	0,583	0,575	0,578	0,522	0,438	0,650	0,383	0,513						
SAR	0,445	0,441	0,525	0,271	0,523	0,487	0,497	0,439	0,575	0,379	0,417	0,561					
SOP	0,531	0,526	0,639	0,089	0,635	0,588	0,601	0,540	0,689	0,473	0,518	0,609	0,326				
VEL	0,476	0,509	0,242	0,625	0,539	0,597	0,554	0,485	0,667	0,409	0,536	0,584	0,560	0,661			
ZV	0,395	0,394	0,445	0,388	0,457	0,462	0,451	0,366	0,534	0,340	0,411	0,440	0,352	0,426	0,495		
KOR	0,426	0,343	0,512	0,513	0,528	0,404	0,393	0,377	0,484	0,380	0,338	0,518	0,427	0,564	0,551	0,374	

Prilog 8. Analiza glavnih koordinata (PcoA) na osam mikrosatelitnih lokusa. Različite boje označavaju različite filogrupe kojima populacije pripadaju.



Prilog 9. Neukorijenjeni dendrogram napravljen metodom susjednog sparivanja temeljen na matrici D_A genetskih distanci između populacija na osam mikrosatelitnih lokusa. Različite boje označavaju različite filogrupe kojima populacije pripadaju. Imena populacija navedena su u Tablici 1.



Životopis

Rođena sam 14. rujna 1996. godine u Puli. Svoje školovanje započinem u OŠ-SE „Giuseppina Martinuzzi“ te nastavljam u TSS-SMSI „Dante Alighieri“, smjer opća gimnazija. 2015. godine upisujem Preddiplomski sveučilišni studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Titulu sveučilišne prvostupnice molekularne biologije stječem 2018. godine kada upisujem Diplomski sveučilišni studij Molekularne biologije na istom fakultetu. Od 2017. godine obavljam praksu u laboratoriju za molekularne analize Zoologijskog zavoda Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu pod mentorstvom prof.dr.sc. Ivane Maguire. Od 2019. godine suvoditeljica sam Sekcije za rakove u Udruzi studenata biologije BIUS. Sudjelovala sam u studentskom projektu „Razvoj novih tehnika kariotipizacije slatkovodnih rakova (porodica Astacidae)“. Za vrijeme studija sudjelovala sam u manifestacijama Dan i noć na PMF-u te Smotri Sveučilišta u Zagrebu.

Nagrade:

2019. Rektorova nagrada za individualni znanstveni i umjetnički rad (jedan ili dva autora), kategorija prirodne znanosti

Publikacije:

Lovrenčić, L., **Bonassin, L.**, Boštjančić, L.L., Podnar, M., Jelić, M., Klobučar, G., Jaklič, M., Slavevska-Stamenković, V., Hinić, J., Maguire, I. 2020. New insights into the genetic diversity of the stone crayfish: taxonomic and conservation implications. *BMC Evol. Biol.* 20, 146

Boštjančić, L.L., **Bonassin, L.**, Anušić L., Lovrenčić, L., Besendorfer, V., Maguire, I., Grandjean, F., Austin, C.M., Greve, C., Hamadou A.B., Mlinarec, J. 2020. The *Pontastacus leptodactylus* (Astacidae) Repeatome Provides Insight Into Genome Evolution and Reveals a Remarkable Diversity of Satellite DNA. *Front. Genet.* 11, 611745.