

Praćenje bolesti račje kuge u populacijama invazivne vrste bodljibradog raka (*Faxonius limosus*) u Hrvatskoj

Bednjanić, Mia

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:217:754514>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-03**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Mia Bednjanić

**Praćenje bolesti račje kuge u populacijama
invazivne vrste bodljibradog raka (*Faxonius
limosus*) u Hrvatskoj**

Diplomski rad

Zagreb, 2024.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Mia Bednjanić

**Monitoring of crayfish plague in populations
of the invasive spiny-cheek crayfish
(*Faxonius limosus*) in Croatia**

Master thesis

Zagreb, 2024.

Ovaj rad je izrađen na Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Sandre Hudina i Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta pod komentorstvom izv. prof. dr. sc. Ane Bielen. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra ekologije i zaštite prirode.

ZAHVALA

Veliko hvala mojim mentoricama izv. prof. dr. sc. Sandri Hudina i izv. prof. dr. sc. Ani Bielen na strpljenju, brzim odgovorima, stručnoj pomoći i savjetima kroz cjelokupno pisanje diplomskog rada.

Hvala mojim roditeljima, bakama, Elici, Filipu i ostatku obitelji na ljubavi, podršci, razgovoru i sponzorstvu tijekom svih ovih brojnih godina studiranja, ne bih to mogla završiti bez vas.

I za kraj, HVALA mojoj grupi H. i cimerima koji su bili uz mene tokom najboljih i najgorih trenutaka i što ste mi studiranje učinili manje bolnim, ljepšim i nezaboravnim. Vaša podrška, smijeh, razgovori i zajednički izlasci dali su mi vjetar u leđa i bez vas ovo iskustvo ne bi bilo isto.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Praćenje bolesti račje kuge u populacijama invazivne vrste bodljobradog raka (*Faxonius limosus*) u Hrvatskoj

Mia Bednjanić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Bodljobradi rak (*Faxonius limosus*) je invazivna vrsta koja predstavlja značajnu prijetnju autohtonim populacijama rakova u Europi. Potječe iz Sjeverne Amerike te se brzo širi na nova područja gdje ulazi u kompeticiju za resurse s autohtonim vrstama te prenosi bolesti poput račje kuge. Račja kuga, uzrokovana patogenom *Aphanomyces astaci*, ima devastirajući učinak na autohtone vrste rakova, što naglašava potrebu za stalnim monitoringom ovog patogena. Na području istočne Hrvatske, *Faxonius limosus* širi svoj areal u Dunavu i Dravi te ugrožava native vrste rakova *Astacus astacus* i *Pontastacus leptodactylus*. Dosadašnja istraživanja pokazala su prisutnost patogena u populacijama *F. limosus*, ali bez uspješne genotipizacije zbog niske koncentracije DNA patogena u uzorcima. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi prisutnost patogena *Aphanomyces astaci* u recetnim uzorcima bodljobradog raka iz istočne Hrvatske. Koristeći PCR metodu patogen nije detektiran u 11 analiziranih jedinki *Faxonius limosus*, ali je detektiran u uzorku autohtone vrste *Astacus astacus* sakupljene u istočnom dijelu Republike Hrvatske. Genotipizacija patogena *A. astaci* dobivenog iz vrste *A. astacus* nije bila uspješna, vjerojatno zbog preniske koncentracije DNA patogena u uzorku. U nastavku istraživanja potrebno je koristiti osjetljivije molekularne metode za pouzdaniju detekciju patogena.

Ključne riječi: *Aphanomyces astaci*, genotipizacija, autohtone vrste, detekcija patogena (39 stranica, 9 slika, 5 tablica, 93 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Sandra Hudina

Komentor: Izv. prof. dr. sc. Ana Bielen

Ocjenitelji: Izv. prof. dr. sc. Sandra Hudina

Prof. dr. sc. Ivana Maguire

Prof. dr. sc. Jasna Lajtner

Rad prihvaćen: 04.07.2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Monitoring of crayfish plague in populations of the invasive spiny-cheek crayfish (*Faxonius limosus*) in Croatia

Mia Bednjanić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The spiny-cheek crayfish (*Faxonius limosus*) is an invasive species that poses a significant threat to native crayfish populations in Europe. Originating from North America, it rapidly spreads to new areas, competing with native species for resources and transmitting diseases such as crayfish plague. Crayfish plague, caused by the pathogen *Aphanomyces astaci*, has a devastating impact on native crayfish species, highlighting the need for constant monitoring of this pathogen. In eastern Croatia, *Faxonius limosus* is expanding its range in the Danube and Drava rivers, threatening the native crayfish species *Astacus astacus* and *Pontastacus leptodactylus*. Previous research has shown the presence of the pathogen in populations of *F. limosus*, but without successful genotyping due to the low concentration of pathogen DNA in the samples. The aim of this study was to determine the presence of the pathogen *Aphanomyces astaci* in recent samples of spiny-cheek crayfish from eastern Croatia. Using the PCR method, the pathogen was not detected in 11 analyzed individuals of *Faxonius limosus*, but it was detected in a sample of the native species *Astacus astacus* collected in the eastern part of the Republic of Croatia. Genotyping of the *A. astaci* pathogen obtained from *A. astacus* was unsuccessful, probably due to the low concentration of pathogen DNA in the sample. Further research needs to use more sensitive molecular methods for more reliable detection of the pathogen.

Keywords: *Aphanomyces astaci*, genotyping, native species, pathogen detection
(39 pages, 9 figures, 5 tables, 93 references, original in: Croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Assoc. Prof. Sandra Hudina, PhD
Co-mentor: Assoc. Prof. Ana Bielen, PhD

Reviewers: Assoc. Prof. Sandra Hudina, PhD
Prof. Ivana Maguire, PhD
Prof. Jasna Lajtner, PhD

Thesis accepted: 04.07.2024.

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. Deseteronožni rakovi kao ključne vrste	2
1.2. Autohtone vrste deseteronožnih rakova u Hrvatskoj	2
1.3. Invazivni deseteronožni rakovi u Europi i Hrvatskoj	3
1.4. Bodljobrادي rak - <i>Faxonius limosus</i> (Rafinesque, 1817)	4
1.4.1. Sistematika	4
1.4.2. Morfologija	5
1.4.3. Biologija i ekologija	7
1.4.4. Rasprostranjenost i utjecaj	7
1.5. Račja kuga	10
1.5.1. Životni ciklus uzročnika račje kuge	10
1.5.2. Genotipovi račje kuge.....	12
1.6. Ciljevi istraživanja	14
2. MATERIJALI I METODE	15
2.1. Uzorkovanje	15
2.2. Izolacija DNA	16
2.3. Detekcija patogena <i>Aphanomyces astaci</i> PCR-testom	17
2.4. Elektroforeza u agaroznom gelu	19
2.5. Genotipizacija patogena <i>Aphanomyces astaci</i>	19
3. REZULTATI	22
3.1. Detekcija patogena <i>A. astaci</i> PCR-testom	22
3.3. Genotipizacija patogena <i>A. astaci</i> PCR-testom	22
4. RASPRAVA	24
5. ZAKLJUČAK	27
6. LITERATURA	28

1. UVOD

Strane vrste su one koje su se slučajnim i/ili namjernim unosom rasprostranile na nova područja, tj. izvan svog prirodnog područja obitavanja. Ukoliko štetno djeluju na bioraznolikost te negativno utječu na ekonomiju, gospodarstvo i zdravlje ljudi nazivaju se invazivnim stranim vrstama (ISV) (NN 13/2024). Tijekom posljednjih dvaju desetljeća širenje ISV postao je, nakon izravnog uništavanja staništa, drugi najvažniji uzrok smanjenja globalne bioraznolikosti (Crowl i sur., 2008). ISV su prijetnja autohtonim vrstama jer mogu zauzimati istu ekološku nišu pa dolaze u kompeticiju za hranu i prostor (Strayer, 2012). Osim toga, predacija, parazitizam i prijenos bolesti uzrokuju promjene u hranidbenoj mreži i sastavu vrsta, zajednica na svim trofičkim razinama što često rezultira smanjenjem broja autohtonih vrsta na tom području (Havel i sur., 2015). Ako ekosustavom dominira nekoliko široko rasprostranjenih invazivnih vrsta bioraznolikost i ravnoteža ekosustava se narušava te dolazi do biotičke homogenizacije (Olden i sur., 2004).

Osim negativnog utjecaja na ekosustave, ISV imaju izražen negativan utjecaj na ekonomiju. Od 1960. do 2020. godine troškovi uzrokovani širenjem ISV u Europi iznosili su 116,61 milijardi eura, od čega se 60 % odnosi na sanaciju štete koju su prouzročile, 20 % na prevenciju, edukaciju i upravljanje populacijama invazivnih vrsta obuhvaćajući više sektora (zdravstvo, poljoprivredu, šumarstvo, ribarstvo) te 20 % spada u mješoviti trošak (kombinacija štete/gubitka i upravljanja) (Haubrock i sur., 2021). Procijenjeni troškovi ovise o veličini države i broju stanovnika, istraženosti invazivnih vrsta, upravljanju populacijama invazivnih vrsta, stoga najviše troškove imaju zemlje zapadne i središnje Europe (Haubrock i sur., 2021).

Među različitim tipovima ekosustava, slatkovodni ekosustavi često se smatraju osobito ugroženim od strane invazivnih stranih vrsta zbog njihove prostorne ograničenosti (prekrivaju manje od 1 % površine Zemlje), visoke bioraznolikosti, povezanosti s ljudskim aktivnostima, osjetljivosti na promjene kvalitete vode i fragmentacije staništa. Invazivne strane vrste doprinose ostalim antropogeno-uvjetovanim razlozima ugroženosti slatkovodnih ekosustava poput ribolova, akvakulture, gradnje hidroelektrana, urbanizacije, korištenja prijevoznih sredstava i onečišćenja (Havel i sur., 2015).

1.1. Deseteronožni rakovi kao ključne vrste

Unutar slatkovodnih ekosustava, slatkovodni deseteronožni rakovi značajno izravno i neizravno utječu na ekosustav u kojem žive te se stoga smatraju inženjerima ekosustava i ključnim vrstama (Weinländer i Füreder, 2016). Ključne vrste su one koje unatoč tome što čine mali dio ukupne biomase snažno utječu na raznolikost drugih vrsta (Davic i sur., 2003). Njihov utjecaj na brojnost i rasprostranjenost drugih biljnih i životinjskih vrsta može se očitovati kroz različite ekološke funkcije kao što su kontrola populacija drugih vrsta, stvaranje ili promjena staništa te doprinos hranidbenim mrežama (Reynolds i sur., 2013).

Slatkovodni deseteronožni rakovi među najvećim su vrstama makrozoobentosa te snažno utječu na stanište u kojem obitavaju. Nazivamo ih bioturbatorima jer vrše obradu sedimenta i lišća. Prehrana im je omnivorna i raznolika te uključuje makrofite, nitaste alge, perifiton (Weinländer i Füreder, 2016) te vodene beskralježnjake i kralježnjake (tj. jaja vodozemaca i riba) (James i sur., 2015). Rakovi se često ponašaju kao ključni predatori u složenim hranidbenim mrežama. Ukoliko je prisutna veća populacija rakova na nekom području, mogu modificirati stanište, npr. uništavanjem naslaga makrofita i perifitona (Momot, 1995). Također, predstavljaju izvor hrane ribama, pticama, sisavcima i ljudima. U nekim zemljama povijesno su dio ljudske prehrane pa imaju i komercijalnu važnost (Weinländer i Füreder, 2016).

1.2. Autohtone vrste deseteronožnih rakova u Hrvatskoj

Populacije autohtonih deseteronožnih rakova u Hrvatskoj suočavaju se s brojnim prijetnjama koje uzrokuju njihovu ugroženost i smanjenje areala. U Hrvatskoj su prisutne četiri autohtone vrste slatkovodnih rakova: potočni rak *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803), bjelonogi rak *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858), riječni rak *Astacus astacus* (Linnaeus, 1758) i uskoškari rak *Pontastacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) (Maguire i sur., 2016). Riječni, potočni i bjelonogi rak zaštićeni su Zakonom o zaštiti prirode (NN 80/13, 15/18) odnosno Pravilnikom o strogo zaštićenim vrstama (NN 144/2013). Prema kategoriji ugroženosti riječni i potočni rak spadaju u osjetljive vrste (VU, engl. *vulnerable*), dok bjelonogi rak ima status ugrožene vrste (EN, engl. *endangered*) (NN 144/2013). Uskoškari rak nije na listi

zaštićenih vrsta, a njegov status ugroženosti je: najmanje zabrinjavajuć (LC, engl. *least concern*) (IUCN, 2017).

Najveću prijetnju predstavljaju ISV rakova koji prenose račju kugu, bolest koja je devastirala populacije autohtonih rakova diljem Europe (Bláha i sur., 2022). Osim invazivnih vrsta i bolesti koje oni prenose, autohtone vrste rakova ugrožavaju i drugi čimbenici poput gubitka i degradacije staništa, urbanizacije, industrijalizacije i poljoprivrednih aktivnosti koje dovode do uništavanja prirodnih staništa, zagađenja voda i promjene vodenih tokova. Promjene u korištenju zemljišta i regulacija rijeka smanjuju dostupnost prikladnih staništa za ove vrste (Chucholl, 2013, Crowl i sur., 2008). Klimatske promjene također mogu promijeniti hidrologiju i termalne režime vodenih tijela, što može dodatno negativno utjecati na njihova staništa (Patoka i sur., 2016). Prekomjerni ribolov i neodrživo gospodarenje vodnim resursima također doprinose smanjenju populacija autohtonih rakova kao i unos kemikalija (pesticidi i teški metali) koje imaju štetne učinke na njihovo zdravlje (Weinländer i Füreder, 2016).

1.3. Invazivni deseteronožni rakovi u Europi i Hrvatskoj

Strane vrste slatkovodnih deseteronožnih rakova jedne su od najuspješnijih i najštetnijih invazivnih vrsta na globalnoj razini (Hänfling i sur., 2011). Jedan od njihovih štetnih utjecaja je širenje raznih bolesti (Crowl i sur., 2012). Među njima je najznačajniji i najbolje istražen patogen *Aphanomyces astaci* (Schikora, 1906) kojeg u Europi prenose invazivne vrste rakova iz Sjeverne Amerike i uzrokuje bolest račju kugu (Jussila i sur., 2021). Također, ISV rakova imaju visoku sposobnost prilagodbe različitim uvjetima okoliša, izraženu kompetitivnost i agresiju, brzi rast, veliki fekunditet i rano spolno sazrijevanje (Jussila i sur., 2021). Mogu direktno utjecati na promjenu staništa stvarajući skloništa duž rijeka i jezera destabilizirajući tlo (Reynolds i sur., 2013). Zbog toga dolazi do povećanja erozije i smanjenja kvalitete vode. Ove promjene mogu imati kaskadni učinak na ekosustav utječući na vegetaciju, taloženje sedimenta i obrasce protoka vode te tako narušavaju prirodnu ravnotežu ekosustava gdje može doći do smanjenja autohtonih populacija rakova te potencijalno dovesti neke do lokalnog izumiranja (Faller i sur., 2016). Porastom globalne trgovine, balastnim vodama, onečišćenjem te klimatskim promjenama broj ISV rakova u slatkovodnim sustavima neprestano raste (Hänfling i sur., 2011). Uspostavljanje

strane ili gubitak autohtone vrste slatkovodnog raka donosi trajne i nepovratne negativne učinke na ekosustav (James i sur., 2015).

Nentwig i sur. (2018) su u „100 najgorih invazivnih vrsta Europe“ ubrojili čak 12 vrsta slatkovodnih rakova iz Sjeverne Amerike i Australije. Prve ISV rakova unesene su radi uzgoja u akvakulturi sredinom 19. st. i od tada strane vrste rakova intenzivnim širenjem istiskuju europske vrste (Holdich i sur., 2009). Osim unosa radi ljudske prehrane, puno stranih vrsta rakova unosi se preko trgovine kućnim ljubimcima za koju je opetovano pokazano da može rezultirati ispuštanjem ISV u prirodu (Bláha i sur., 2022).

Danas je u Europi prisutan velik broj invazivnih stranih vrsta slatkovodnih rakova. Kouba i suradnici (2014) zabilježili su 11 ISV rakova rasprostranjenih Europom, ali smatra se da je njihov broj danas znatno veći. Od ISV rakova prisutnih u Europi, u Hrvatskoj je dosad pronađeno i zabilježeno tri vrste porijeklom iz Sjeverne Amerike: *Faxonius limosus* (Rafinesque, 1817) – bodljobrادي rak, *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) – signalni rak i *Procambarus virginalis* Lyko, 2017 – mramorni rak (Maguire i sur., 2016). Ove vrste nalaze se na popisu ISV koje izazivaju zabrinutost u Uniji, Uredbom EU 1143/2014 (EC, 2016). Prva zabilježena invazivna vrsta slatkovodnog raka u Hrvatskoj je bodljobrادي rak (*Faxonius limosus*) (Maguire i Gottstein-Matočec, 2004) koji je ujedno i modelni organizam u ovom istraživačkom radu.

1.4. Bodljobrادي rak - *Faxonius limosus* (Rafinesque, 1817)

1.4.1. Sistematika

Prema Crandallu i De Graveu (2017), prihvaćeni naziv vrste je *Faxonius limosus* (Rafinesque, 1817), zamjenjujući prethodni naziv *Orconectes limosus*. Sistematika vrste bodljobrადog raka prikazana je u Tablici 1.

Tablica 1. Sistematika vrste *Faxonius limosus*.

CARSTVO	Animalia
PODCARSTVO	Eumetazoa
KOLJENO	Arthropoda
RAZRED	Malacostraca
PODRAZRED	Eumalacostraca
NADRED	Eucarida
RED	Decapoda
PODRED	Reptantia
PORODICA	Cambaridae
ROD	<i>Faxonius</i>
VRSTA	<i>Faxonius limosus</i> (Rafinesque, 1817)

1.4.2. Morfologija

Jedinke bodljibradog raka obično narastu do 10 cm (Hamr, 2002), no neki primjerci prelaze 12 cm (Pöckl i sur., 2006). Kliješta su im mala, s oštrim vrhovima (Alekhovich i Buřič, 2017) (Slika 1). Boja tijela im varira od tamnosmeđe do maslinasto zelene, sa crvenim do smeđe crvenim trakama koje su vidljive na abdominalnim segmentima (Slika 2). S trbušne strane su svijetlo žute boje (Hamr, 2002). Posjeduju dugačke postorbitalne grebene koji završavaju oštrim bodljama i relativno dug, oštar rostrum (Slika 2) (Hamr, 2002). Površina tijela im je glatka, ali imaju karakteristične bodlje na obrazima prema kojima je vrsta dobila ime (Holdich i sur., 2006) (Slika 2).



Slika 1. Prikaz klijesta bodljibradog raka s dorzalne (lijevo) i ventralne strane (desno)
(prilagođeno i preuzeto iz Alekhnovich i Buřič, 2017)



Slika 2. Prikaz jedinke bodljibradog raka (*Faxonius limosus*). Crvenim krugom označen je rostrum, a crvenim kvadratima postorbitalni greben i bodlje (Foto: Hudina S.)

1.4.3. Biologija i ekologija

Prirodno stanište bodljibradog raka su tekućice i stajaćice (Alekhnovich i Buřič, 2017), a najviše preferira plitka dna sa slojem sedimenta u koji se može ukopati (Kouba i sur., 2016). Kao i druge ISV rakova, mogu se prilagoditi različitim uvjetima te imaju visoku toleranciju na zagađenje (npr. često obitavaju u organski obogaćenim jezerima i ribnjacima te podnose anorgansko onečišćenje) (Alekhnovich i Buřič, 2017). Također, toleriraju povišenu temperaturu vode i smanjenu koncentraciju kisika u vodi te mogu izdržati suha razdoblja i do nekoliko tjedana (Holdich i sur., 2006).

Životni vijek im je između dvije i tri godine, a pojedine jedinke mogu živjeti do 4 godine (Souty-Grosset i sur., 2006). Spolnu zrelost dostižu tokom drugog ljeta, s nešto više od godine dana starosti, pri čemu njihova dužina tijela iznosi između 25 i 35 mm (Hamr, 2002). Juvenilne jedinke imaju brzi rast i visoku smrtnost tijekom prve godine života (Alekhnovich i Buřič, 2017), a nakon postizanja spolne zrelosti rast im usporava (Reynolds, 2002). Parenje se odvija u proljeće i jesen (Buřič i sur., 2013), a mladi se izliježu 40 - 50 dana nakon oplodnje (Kozák i sur., 2006). Broj jaja koje ženka može izleći varira između 50 i 300 (Holdich i sur., 2006).

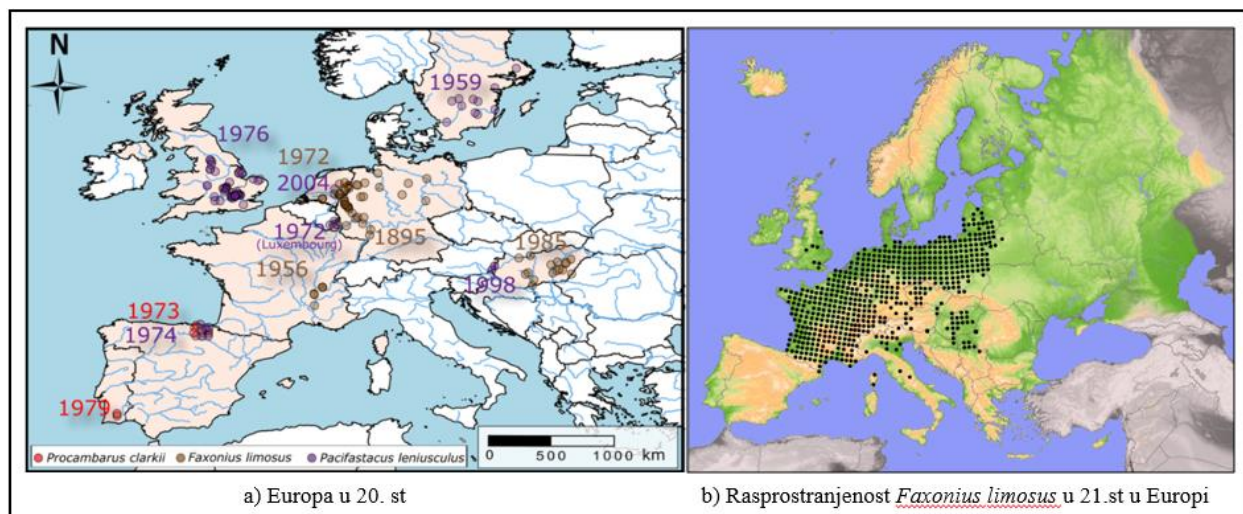
Iako su većina slatkovodnih rakova noćne životinje, kod bodljibradih rakova je zabilježena visoka dnevna aktivnost u odnosu na neke autohtone europske vrste (Buřič, 2009). Bodljibradi rakovi se širokom trofičkom nišom prilagođavaju uvjetima okoliša i dostupnim resursima. U početnoj fazi života juvenilne jedinke hrane se uglavnom zooplanktonom, a kasnije bentoskim beskralježnjacima. Odrasle jedinke hrane se uglavnom detritusom i biljkama te makrobekralježnjacima (Vojkovská i sur., 2014).

1.4.4. Rasprostranjenost i utjecaj

Bodljibradi rak je vrsta autohtona za istočnu obalu Sjeverne Amerike i Kanade (Filipova i sur., 2011). Prva je invazivna strana vrsta rakova namjerno unesena u Europu iz Sjeverne Amerike te spada u “stare strane vrste rakova” (eng. old NICS, *non-indigenous crayfish species*) (Holdich i Black, 2007). Unesen je kako bi se nadomjestile populacije autohtonih vrsta rakova, ponajprije riječnog raka *Astacus astacus*, no ubrzo se pokazalo kako je ova vrsta invazivna

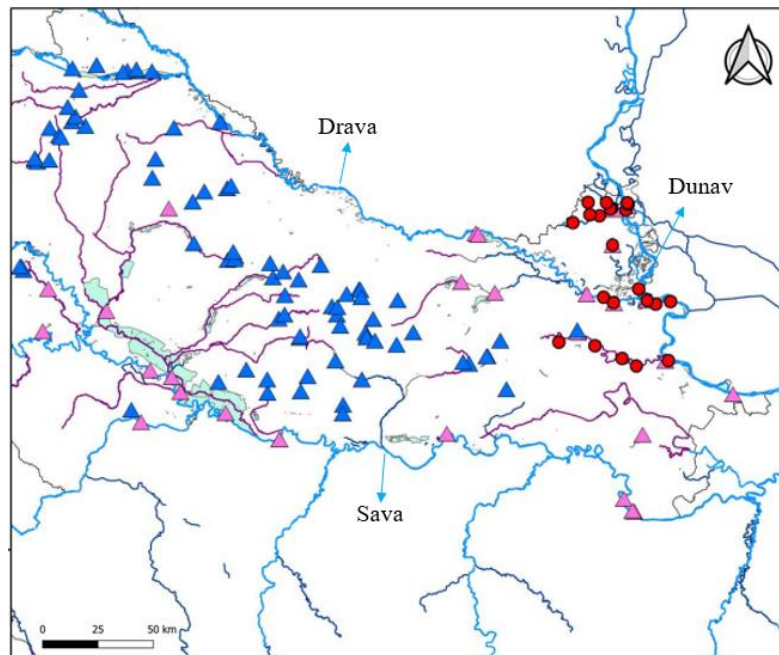
(Alekhnovich i Buřič, 2017). Širenje bodljobrađog raka u Europi izazvalo je ozbiljne i štetne učinke na autohtone populacije rakova (Alekhnovich i Buřič, 2017). S obzirom na njegov veliki fekunditet, visoku toleranciju i prilagodljivost na raznolike uvjete okoliša u usporedbi s autohtonim rakovima, ima dobre preduvjete za naseljavanje europskih staništa, daljnje širenje i istiskivanje autohtonih europskih vrsta s njihovih trenutnih lokaliteta (Kozák i sur., 2015).

Nakon što je prvo unesen u Poljsku (1890.), Njemačku (1895.) i kasnije Francusku (Slika 3a) (Hamr, 2002) prirodno se proširio rijekama i kanalima te ljudskim utjecajem putem trgovine i ribarskih mreža (Holdich i Black, 2007). U Austriji je prvi puta zabilježen 1969. godine, a tijekom 90-ih godina u Italiji (Alekhnovich i Buřič, 2017). Holdich i Black prvi puta su ovu vrstu zabilježili u Velikoj Britaniji 2007. godine. Bodljobrađi rak se postupno rijekom Dunav proširio na istok Europe. U Mađarskoj je zabilježeno da se populacije šire oko 13 km godišnje (Puky i Shad, 2006.). Govedič (2017.) u svom istraživanju navodi da je 2015. godine bodljobrađi rak prvi puta zamijećen u Sloveniji u rijeci Dravi na granici sa Hrvatskom. Također, pronađen je u Srbiji, Rumunjskoj i Bugarskoj od kuda se vjeruje da će se proširiti dalje na istok i jug Europe (Alekhnovich i Buřič, 2017). Danas je bodljobrađi rak rasprostranjen u najmanje 22 države Europe (Kouba i sur., 2014; Jussila i sur., 2021). Njegova distribucija prikazana je na Slici 3b.



Slika 3. a) Prikaz prvog unosa i širenja rakova tijekom 20. st. u Europi (*Faxonius limosus* označen je narančastom bojom) (preuzeto iz Soto i sur., 2023); **b)** Prikaz rasprostranjenosti vrste *Faxonius limosus* u Europi u 21. st. (preuzeto i prilagođeno iz Kouba i sur., 2014)

Osim na europskoj razini, bodljobrادي rak je prva zabilježena ISV rakova u Hrvatskoj te je prvi put pronađen 2003. godine u Parku prirode Kopački rit (Maguire i Klobučar, 2003). Dolazeći iz Mađarske, rijekom Dunav proširio se u Hrvatsku (Maguire i sur. 2018.) od kuda se dalje širi prema istoku. Hudina i sur. su 2008. godine zabilježili njegovu prisutnost u rijeci Dravi. Ušće rijeke Drave udaljeno je manje od 10 km nizvodno od prvog nalaza bodljobrადog raka u Dunavu pa se pretpostavlja da je *F. limosus* dospio u Dravu još 2003. godine, dok je brzina njegovog širenja rijekom Dravom 1,5 km godišnje (Hudina i sur., 2009). S obzirom na brzinu njegovog širenja i lakoću uspostavljanja populacija na drugim područjima danas se susreće se s našim autohtonim vrstama *Pontastacus leptodactylus* i *Astacus astacus* (Maguire i Gottstein-Matočec, 2004) (Slika 4). Maguire i sur. (2016) navode kako je *F. limosus* već istisnuo vrstu *P. leptodactylus* s mnogih lokaliteta.



Slika 4. Rasprostranjenost vrsta *Faxonius limosus* (crveni krug), *Astacus astacus* (plavi trokut) i *Pontastacus leptodactylus* (rozi trokut) u istočnoj Hrvatskoj. (preuzeto i prilagođeno iz podataka prof. dr. sc. Ivana Maguire)

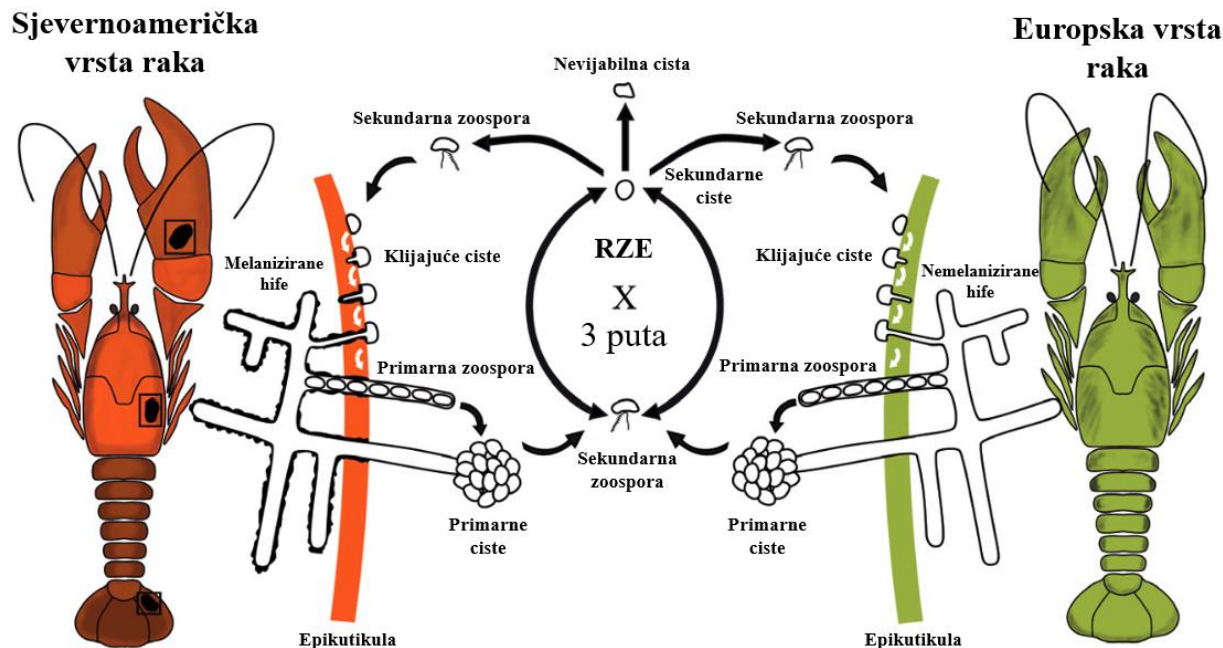
1.5. Račja kuga

Jedna od najpogubnijih bolesti slatkovodnih rakova je račja kuga. Uzrokuje ju patogen *Aphanomyces astaci* (Schikora, 1906) koji je zbog svog brzog širenja i pogubnog utjecaja na autohtone vrste rakova uvršten u 100 najgorih invazivnih vrsta na svijetu (Lowe i sur., 2004). Ovaj patogen pripada redu Saprolegniales razredu Oomycetes (vodene plijesni) (Oidtmann i sur., 2004). Račja kuga je desetkovala autohtone populacije slatkovodnih rakova i još uvijek prijete populacijama diljem Europe pri čemu dolazi do ekonomskih i ekoloških gubitaka (Holdich i sur., 2009). Sjevernoameričke vrste rakova evolucijski su stekle otpornost na ovaj patogen te time postale vektori kojima se *A. astaci* prenosi na autohtone europske vrste rakova (Svoboda i sur., 2017).

1.5.1. Životni ciklus uzročnika račje kuge

Životni ciklus patogena *A. astaci* sastoji se od nespalnog razmnožavanja, dok spolno razmnožavanje, inače uobičajeni dio životnog ciklusa vodenih plijesni, kod ove vrste nikada nije zabilježeno (Diéguez-Uribeondo i sur., 2009). Ciklus nespalnog razmnožavanja patogena i načina širenja na nove domaćine prikazan je na Slici 5. Vegetativne hife koje rastu unutar zaražene jedinke izlaze iz kutikule raka. U kontaktu s vodom, procesom sporulacije u sporangijima nastaju primarne zoospore (OIE, 2019). One se pretvaraju u primarne ciste tvoreći kuglaste nakupine - sporangije (Diéguez-Uribeondo i sur., 2009). Iz svake primarne ciste formirat će se infektivna sekundarna biflagelatna zoospora koja pomoću bičeva pliva u stupcu vode tražeći pogodnog domaćina za daljnje širenje (Oidtmann i sur., 2002). Dodatna prilagodba koju posjeduju samo parazitske vrste roda *Aphanomyces* je poliplanetizam (RZE, engl. *repeated zoospore emergence*). Naime, životni vijek zoospore traje samo nekoliko sati (Rezinciuc i sur., 2015). Nakon toga se ona pretvori u cistu koja se ponovo pretvara u zoosporu, i tako do tri puta, povećavajući vjerojatnost da zoospora pronađe odgovarajućeg domaćina. Zoospore kemotaksičnim kretanjem pronalaze kutikulu domaćina gdje se pretvaraju u cistu (Unestam i Weiss, 1970), najčešće na mjestima u blizini ozljede (Nyhlen i Unestam, 1980). Njezinim klijanjem hife penetriraju u kutikulu inficirajući domaćina pri čemu dolazi do širenja micelija unutrašnjim organima i razvoja bolesti račje kuge (Cerenius i Söderhäll, 1984). Glavni simptomi

bolesti su melanizacija kutikule, promjene u ponašanju (dnevna aktivnost i izlazak iz skrovišta), nekoordinirano kretanje te postupna paraliza i smrt (Unestam i Weiss, 1970). U kasnijoj fazi infekcije ili nakon uginuća domaćina dolazi do nove produkcije sporangija (Oitdman i sur., 2002).



Slika 5. Prikaz životnog ciklusa patogena *A. astaci* kod sjevernoameričkih vrsta rakova (lijevo) te europskih vrsta rakova (desno) (preuzeto i prilagođeno iz Rezinciuc i sur., 2015).

Glavna obrambena reakcija koju sjevernoamerički rakovi posjeduju protiv infekcije patogenom *A. astaci* je kontinuirana aktivnost sustava profenoloksidaze (engl. *prophenoloxidase system*, proPO). Ovaj sustav je važan dio imunskog odgovora rakova i drugih beskralježnjaka. Pomoću brze aktivnosti proPO sustava, patogen ostaje zarobljen u kutikuli jer dolazi do melanizacije hifa čime se sprječava daljnje prodiranje u tkivo (Söderhäll i Cerenius, 1998). Kod kontakta patogena s kutikulom, klijajuću hifu okruže semigranulirani hemociti koji ju izoliraju unutar stvorene kapsule. Zatim se oko kapsule agregira sloj granuliranih hemocita i aktivira se proPO sustav pa patogen ostaje u kapsuli okružen ljepljivim melaninom. Na taj način onemogućava se daljnji rast i širenje patogena (Makkonen i sur., 2012.).

Povećana otpornost na patogen kod sjevernoameričkih rakova u odnosu na europske autohtone vrste temelji se na stalnoj aktivnosti proPO sustava i njegovoj brznoj reakciji tijekom infekcije patogenom (Oidtmann i sur., 2004). Kod autohtonih europskih vrsta rakova reakcija aktivacije proPO sustava je sporija jer se sustav aktivira tek u kontaktu s patogenom. Također, melanizacija hifa je djelomična i unutar nekoliko dana dolazi do njihovog rasta i širenja unutar domaćina nakon čega jedinke obole od račje kuge (Cerenius i sur., 2003).

Iako su sjevernoameričke ISV rakova velikim dijelom otporne na zarazu račjom kugom, njihova otpornost ipak nije potpuna. U slučaju slabljenja imuniteta, primjerice uslijed drugih bakterijskih ili gljivičnih infekcija, ozljeda ili stresa, ipak može doći do razvoja račje kuge i uginuća jedinke (Söderhäll i Cerenius, 1992).

1.5.2. Genotipovi račje kuge

Do danas je utvrđeno da postoji pet različitih genotipova patogena *A. astaci*, A do E, koji imaju različitu virulenciju prema različitim vrstama rakova domaćina (Jussila i sur., 2021). Genotipovi patogena prvi su put određeni pomoću metode nasumične amplifikacije polimorfne DNA (engl. *Random Amplified Polymorphic DNA*, RAPD) koristeći genomsku DNA čistih kultura patogena (Bouallegui, 2021; Svoboda i sur., 2017). Do danas su razvijene jednostavnije i brže metode genotipizacije uzročnika račje kuge koje se mogu koristiti i kod drugih tipova uzoraka, kao što je ukupna DNA izolirana iz tkiva ili biofilma kutikule zaražene životinje (Pavić i sur., 2020; Pavić i sur., 2021). Primjerice, razvijen je PCR-test u kojem se koriste posebne početnice za umnožavanje specifičnih regija različitih genotipova patogena (Minardi i sur., 2018); polimorfizam dužine amplificiranih fragmenata, AFLP-PCR (engl. *amplified fragment length polymorphism*) u kojem se koriste markeri koji omogućuju analizu višestrukih lokusa (Rezinciuc i sur., 2013) te mikrosatelitni biljezi čija dužina varira ovisno o genotipu (Grandjean i sur., 2014).

Genotip A (As) izoliran je iz autohtonih europskih vrsta *Astacus astacus* i *Pontastacus leptodactylus*, dok prvi domaćin (koji je potogen unio u Europu), za kojeg se pretpostavlja da je ISV raka, još nije pronađen (Kozubíková i sur., 2011). Pretpostavlja se da je ovaj genotip

izazvao masovne pomore rakova u 19. st. u Europi i od tada se širi Europom (Huang i sur., 1994). Genotip B (PsI) izoliran je iz jedinki vrste *P. leniusculus* pronađenih u jezerima Tahoe i Hennesy u SAD-u te kasnije u Europi kada je unosom ove vrste došlo do izbijanja račje kuge. Zbog visoke virulencije, ovaj genotip se brzo proširio te uzrokovao izbijanje račje kuge u svim regijama Europe (Ungureanu i sur., 2020). Genotip C (PsII) također je izoliran iz vrste *P. leniusculus*, ali ovaj genotip je pronađen u jezerima Pitt u Kanadi (Huang i sur., 1994) te nije rasprostranjen u Europi (Söderhäll i Cerenius, 1999). Genotip D (Pc) izoliran je iz vrste *P. clarkii* (Rezinciuc i sur., 2014). Krajem 20. st. ova je vrsta unesena u Španjolsku te je tada zapaženo za ovaj genotip da ima viši temperaturni optimum od ostalih genotipova (Diéguez-Uribeondo i sur., 1995; Rezinciuc i sur., 2014). Kozubíková i sur. su 2011. godine izolirali genotip E (Or) iz vrste *Faxonius limosus*. Genotip E izazvao je brojne epidemije u Češkoj, a neke su zabilježene u Francuskoj i na estonskom otoku Saaremaa u Baltičkom moru (Ungureanu i sur., 2020).

U Hrvatskoj su do sada zabilježena dva genotipa račje kuge. Genotipovi A je detektiran kod autohtonih vrsta *A. astacus* i *P. leptodactylus*, a genotip B kod invazivne vrste *P. leniusculus* (Maguire i sur., 2016; Pavić i sur., 2020). Međutim, s obzirom na rasprostranjenost vrsta *F. limosus* i *P. virginalis*, postoji mogućnost da su u Hrvatskoj prisutni i drugi genotipovi račje kuge koji su rasprostranjeni Europom. Primjerice, Keller i suradnici (2014) izolirali su genotip D, čiji je glavni nositelj *P. clarkii*, i kod vrste *P. virginalis*. Iako je *F. limosus* nositelj genotipa E, raniji pokušaji genotipizacije kod ove vrste nisu bili uspješni zbog preniske količine DNA patogena (Maguire i sur., 2018) stoga je potrebno provesti daljnja istraživanja kako bi se utvrdila prisutnost ovog genotipa u Hrvatskoj.

1.6. Ciljevi istraživanja

Do danas prisutnost ni genotipovi račje kuge u populacijama bodljibradog raka u Hrvatskoj nisu sustavno istraživani. U radu Maguire i sur. (2016) testirane su 24 jedinke *F. limosus* sakupljene u razdoblju od 2003. do 2012. godine na području istočne Hrvatske (Dunav, Kopački rit, rijeka Vuka) te je u 14 jedinki (58 %) utvrđena prisutnost patogena *A. astaci*, no zbog niske koncentracije DNA patogena ni u jednom od pozitivnih uzoraka nije bilo moguće utvrditi genotip. Glavni cilj ovog istraživanja bio je, koristeći recentne uzorke, utvrditi da li je patogen *Aphanomyces astaci* i dalje prisutan u populacijama bodljibradog raka na području istočne Hrvatske. Specifični ciljevi ovog rada bili su:

1. Utvrditi prisutnost uzročnika račje kuge u novo prikupljenim uzorcima bodljibradog raka (većinom iz 2023. godine) pomoću PCR-testa u kojem se koriste početnice koje specifično umnažaju ITS-regiju 5.8S rRNA gena patogena *A. astaci* (Oidtmann i sur., 2006.).
2. Za uzorke koji budu pozitivni na prisutnost patogena *A. astaci* pokušati odrediti genotip patogena prema ranije objavljenoj metodi (Minardi i sur., 2018).

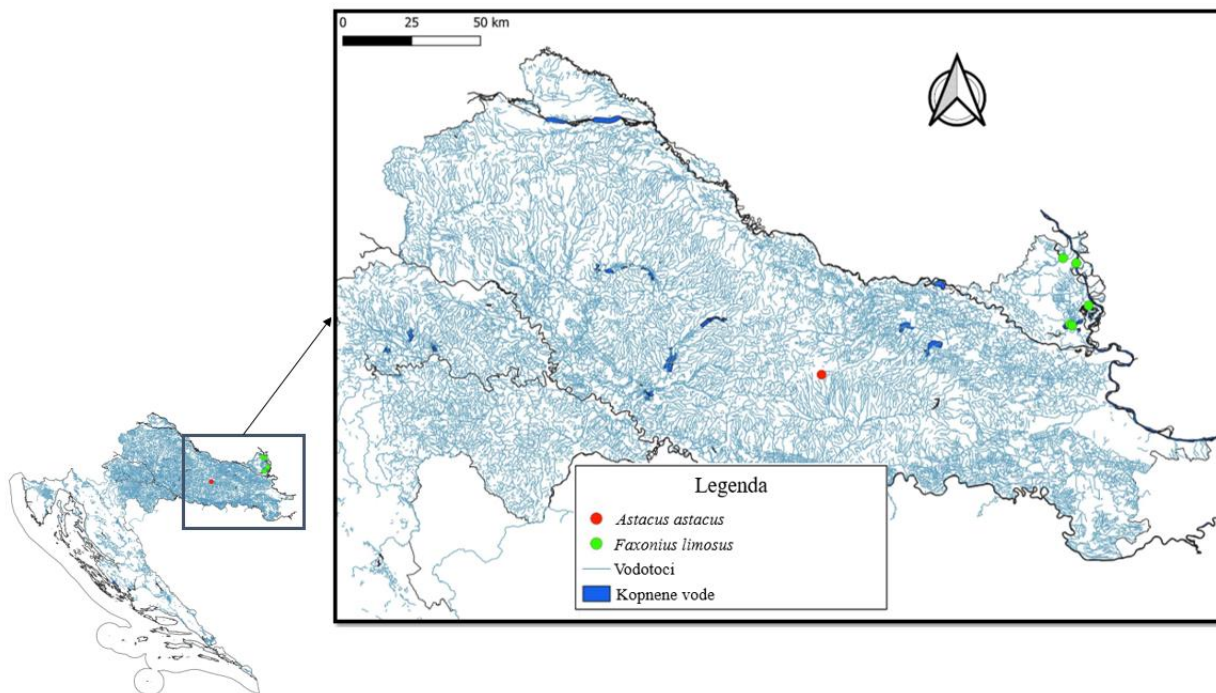
2. MATERIJALI I METODE

2.1. Uzorkovanje

Uzorci koji su korišteni za potrebe ovog istraživanja potječu sa pet lokaliteta na području istočne Hrvatske (Tablica 1.). Rakovi su ulovljeni vršama tijekom 2019. i 2023. godine te potom pohranjeni u 96 %-tnom etanolu te su dio astakološke zbirke prof. dr. sc. Ivane Maguire. Osim 11 uzoraka vrste *F. limosus*, u rad je uključena i jedna jedinka nativnog raka *A. astacus* (uzorak broj 8) (Slika 6). Radilo se o jedinki koja je pri uzorkovanju imala simptome račje kuge te je korištena u svrhu validacije metoda detekcije primijenjenih u ovom radu.

Tablica 2. Vrste rakova i lokacije uzoraka korištenih u istraživanju.

	IME VRSTE	LOKALITET	GODINA	LOKACIJA	
				x	y
1.	<i>Faxonius limosus</i>	Vemeljski Dunavac	2023.	687060	5063302
2.	<i>Faxonius limosus</i>	Podunavlje	2023.	680244	5056534
3.	<i>Faxonius limosus</i>	Podunavlje	2023.	680244	5056534
4.	<i>Faxonius limosus</i>	Dunav	2023.	682554	5078716
5.	<i>Faxonius limosus</i>	Dunav	2023.	682554	5078716
6.	<i>Faxonius limosus</i>	Dunav	2023.	682554	5078716
7.	<i>Faxonius limosus</i>	Kopački rit	2023.	681040	5055998
8.	<i>Astacus astacus</i>	Veličanka	2023.	589896	5038170
9.	<i>Faxonius limosus</i>	Dunavac Draž	2023.	677740	5080550
10.	<i>Faxonius limosus</i>	Dunavac Draž	2023.	677740	5080550
11.	<i>Faxonius limosus</i>	Kopački rit	2019.	681040	5055998
12.	<i>Faxonius limosus</i>	Kopački rit	2019.	681040	5055998

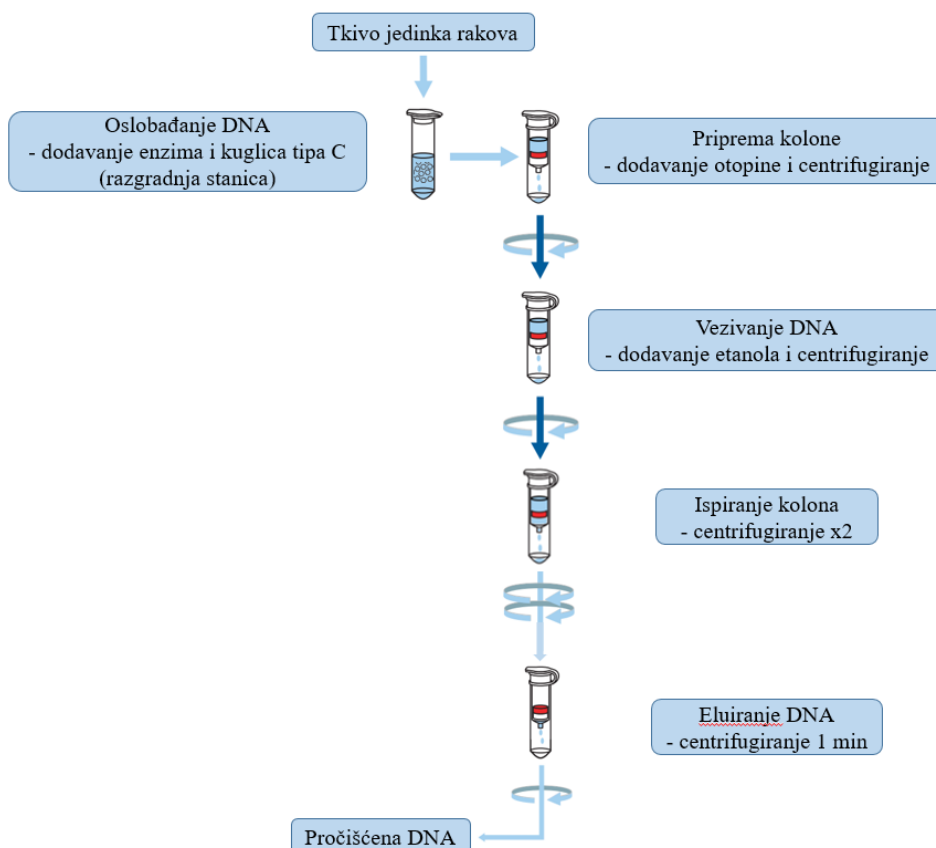


Slika 6. Lokacije na kojima su sakupljene jedinke *Astacus astacus* i *Faxonius limosus* u istočnoj Hrvatskoj.

2.2. Izolacija DNA

Svakoj jedinki sam sterilnim instrumentima uzela tri vrste uzoraka: abdominalnu kutikulu, jedan uropod te melanizirane dijelove kutikule. Iz izdvojenih tkiva izolirala sam ukupnu DNA koristeći komercijalni komplet GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma Aldrich) prema uputama proizvođača (Slika 7) te uz određene modifikacije u početnim koracima homogenizacije tkiva. Izdvojena tkiva sam zajedno s kuglicama tipa C te puferom koji sadrži enzime Proteinazu K i RNazu A stavila u mikroeprevete i provela lizu tkiva u uređaju Vortex Mixer u trajanju od 20 minuta pri maksimalnoj snazi. Tijekom ovog koraka kuglice tipa C pomažu u razbijanju hitinske kutikule i celulozne stanične stijenke oomiceta (ako je prisutna u uzorku) kako bi se DNA lakše izdvojila iz stanica. Epruvete su potom odstajale preko noći u vodenoj kupki na 55 °C. Djelovanje enzima proteinaze K koji razgrađuje proteine cijepanjem peptidne veze te RNaze A koja degradira RNA, kao inkubacija uzoraka preko noći omogućuje potpuniju razgradnju staničnih materijala, omogućavajući maksimalnu ekstrakciju DNA iz uzorka. Nakon lize stanica slijede koraci selektivnog vezanja DNA na kolonu te

ispiranja kolone kako bi se uklonile nečistoće (Slika 7). Nakon višestrukog ispiranja kolonica dodala sam 200 µl otopine za eluciju DNA (10 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA, pH 9,0) i kolonu centrifugirala 1 min pri $\geq 6500 \times g$ kako bi se DNA eluirala s nje. Izolirana ukupna DNA pohranjena je na -20°C .



Slika 7. Prikaz postupka izolacije DNA (preuzeto i prilagođeno iz protokola za izolaciju DNA - GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit, Sigma Aldrich)

2.3. Detekcija patogena *Aphanomyces astaci* PCR-testom

Lančana reakcija polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) je metoda eksponencijalnog umnožavanja specifičnih fragmenata DNA (Wages, 2005). Metoda PCR sastoji se od tri faze: denaturacija dvolančane DNA, vezanje početnica na ciljna mjesta jednolančane DNA i produženje fragmenata DNA. Tijekom prve faze dolazi do razdvajanja lanaca DNA na visokoj temperaturi između 90° i 95°C . Nakon što se lanci razdvoje temperatura

se spušta kako bi se oligonukleotidne početnice vezale na komplementarne nukleotidne sljedove DNA-kalupa. Potom slijedi treća faza (faza elongacije) gdje dolazi do produživanja i sinteze novih fragmenata DNA u smjeru 5'-3' uz pomoć Taq DNA-polimeraze (enzim iz bakterije *Thermus aquaticus*), a izvodi se na temperaturi od 72 °C (Wages, 2005). Tokom PCR-reakcije ponavlja se između 20 i 40 ovakvih ciklusa koji uključuju denaturaciju, vezanje početnica i elongaciju, a svakim ciklusom udvostručuje se količina amplificiranog DNA-fragmenta vodeći do njegova eksponencijalnog umnožavanja (Kadri, 2019).

PCR-testom uz korištenje uzvodne početnice (engl. *forward*) 42 i nizvodne početnice (engl. *reverse*) 640 koje specifično umnažaju ITS-regiju 5.8S rRNA gena patogena *A. astaci* (Oidtmann i sur., 2006.), analizirala sam je li u uzorcima prisutna DNA patogena. Ukoliko je patogen prisutan dolazi do umnožavanja DNA-fragmenta veličine od 569 parova baza (pb) (Oidtmann i sur., 2006.). U Tablici 2. naveden je sastav korištene reakcijske smjese. Kao pozitivnu kontrolu koristila sam genomsku DNA *A. astaci* PEC8 (genotip B), a kao negativnu kontrolu destiliranu vodu.

Tijekom provođenja PCR-reakcija početna denaturacija odvijala se na 96 °C kroz 5 min. Nakon toga je uslijedilo 35 ciklusa koji su uključivali denaturaciju 1 min na 96 °C, sparivanje početnica 1 min na 61 °C i produživanje lanaca 1 min na 72 °C. Završno produživanje lanaca odvijalo se kroz 5 min na 72 °C.

Tablica 3. Reakcijska smjesa korištena za PCR

1.	EmeraldAmp MAX PCR Master Mix 2x	12,5 µL
2.	10 mM uzvodna početnica 42	1,25 µL
3.	10 mM nizvodna početnica 640	1,25 µL
4.	Deionizirana voda	9 µL
5.	DNA kalup	1 µL
6.	UKUPNO	25 µL

2.4. Elektroforeza u agaroznom gelu

Elektroforeza u agaroznom gelu metoda je koja odvaja fragmente nukleinskih kiselina (DNA i RNA) različitih veličina (od 100 pb do 25 kpb) i konformacija. U električnom polju negativno nabijene molekule DNA ili RNA kreću se prema anodnom (pozitivnom) polu (Yilmaz, 2012). Kretanje, tj. migracija DNA molekula unutar gela ovisi o više čimbenika. Kraće molekule migriraju brže od dužih. Osim veličine molekule brzina migracije ovisi i o: koncentraciji i vrsti agaroze (kretanje molekula je brže ako je koncentracija agaroze manja), naponu koji se primjenjuje, puferu za elektroforezu i konformaciji molekula. Primjerice, superzavijena, kružna i linearna DNA iste duljine putuju različitom brzinom kroz agarozni gel: superzavijena DNA putuje najbrže zbog svoje visoke kompaktnosti, kružna DNA putuje srednjom brzinom, dok linearna DNA putuje najsporije zbog svoje manje kompaktnosti i većeg hidrodinamičkog volumena. Vizualizacija molekula DNA odvija se nakon bojenja odgovarajućom bojom pod UV-svjetlom (Lee i sur., 2012).

U ovom radu za analizu uspješnosti izolacije ukupne DNA iz uzoraka te amplifikacije i veličine DNA-fragmenata dobivenih PCR-om koristila sam 1 %-tni agarozni gel koji sam pripremila s 80 mL pufera TAE (40 mM Tris; 20 mM octena kiselina; 1mM EDTA). Smjesu sam zagrijala do vrenja kako bi se agarozna otopila, otopinu ohladila do oko 60 °C te joj dodala GelStar™ NucleicAcid Gel Stain 10,000X (Lonza, Švicarska) za kasniju vizualizaciju DNA pod UV-svjetlom. Elektroforeza se odvijala pri naponu od 100 V u puferu 1xTAE u trajanju od 50 min, na aparaturi Owl Easy Cast B1 Mini Gel Electrophoresis System (Thermo scientific, SAD).

2.5. Genotipizacija patogena *Aphanomyces astaci*

Genotipizaciju sam provela metodom koju su razvili Minardi i suradnici (2018), a temelji se na PCR-testovima kojima se može identificirati svaki od pet poznatih genotipova patogena *A. astaci*. Ova metoda temelji se na identifikaciji regija specifičnih za genome različitih genotipova patogena. Na temelju tih regija dizajnirani su parovi početnica (eng. *primer*) koji su specifični za svaki genotip (Tablica 4). Ukoliko se genotip prisutan u uzorku podudara sa početnicama dolazi do amplifikacije specifične regije genoma, rezultirajući pozitivnim PCR-testom. Kao pozitivnu

kontrolu koristila sam genomsku DNA izoliranu čiste kulture *A. astaci* PEC8 (genotip B), dok sam kao negativnu kontrolu koristila destiliranu vodu. Reakcijska smjesa za PCR navedena je u Tablici 5. PCR-program sastojao se od početne denaturacije na 95 °C tijekom 5 min. Nakon toga je uslijedilo 35 ciklusa koji su sadržavali denaturaciju (95 °C, 1 min), sparivanje početnica (45 sekundi pri različitim temperaturama navedenim u Tablici 4) i produženje lanaca (72 °C, 45 sekundi). Završno produljenje lanaca odvijalo se na 72 °C kroz 5 min.

Tablica 4. Početnice korištene za genotipizaciju *Aphanomyces astaci* (preuzeto i prilagođeno iz Minardi i sur., 2018)

Ime početnica	Sekvenca (5'-3')	Genotip	Veličina amplikona (bp)	Temperatura vezanja početnica (engl. <i>annealing</i>) (°C)
A_unique_F	GCAACTTCCACGTAGTTACAAATC	A	765	61
A_unique_R	GCTGCTGGCTACTTCTCAGTGTT			
B_unique_F	CGAAAAGCTCGAGAACGCAGAGC	B	884	63
B_unique_R	CGTTCCTCTTCAGTGTAGCGCTC			
C_unique_F	CCAGCAACATACCAGTTGCGAACG	C	771	61
C_unique_R	GCACAATTTGATCCCTCTTTTCTG			
D_unique_F	GCAAGAAGTAAAGGATATTTATTC	D	761	50
D_unique_R	GCTTATAGTATCTACATTTTCCGC			
E_unique_F	GCAGTTGAGATCCATCTTCATCAT	E	736	63
E_unique_R	CGAAACTACGTCCTAATCAACACA			

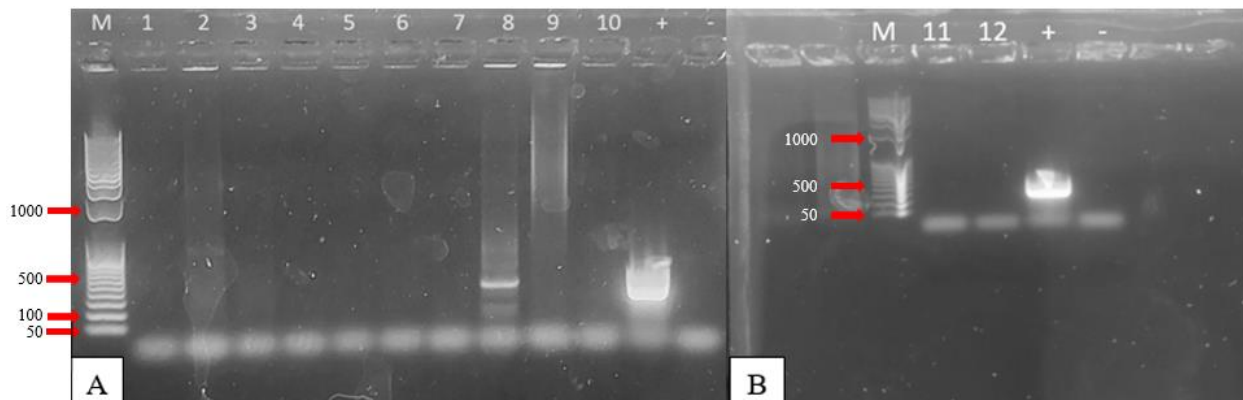
Tablica 5. Sastav reakcijske smjese za PCR-genotipizaciju

Sastav	Uzorak	Pozitivna kontrola (+)	Negativna kontrola (-)
EmeraldAmp MAX PCR 2x Master Mix	12,5 μL	12,5 μL	12,5 μL
10 mM uzvodna početnica	1 μL	1 μL	1 μL
10 mM nizvodna početnica	1 μL	1 μL	1 μL
DNA kalup	2 μL	1 μL	-
Deionizirana voda	8,5 μL	9,5 μL	10,5 μL
UKUPNO	25 μL	25 μL	25 μL

3. REZULTATI

3.1. Detekcija patogena *A. astaci* PCR-testom

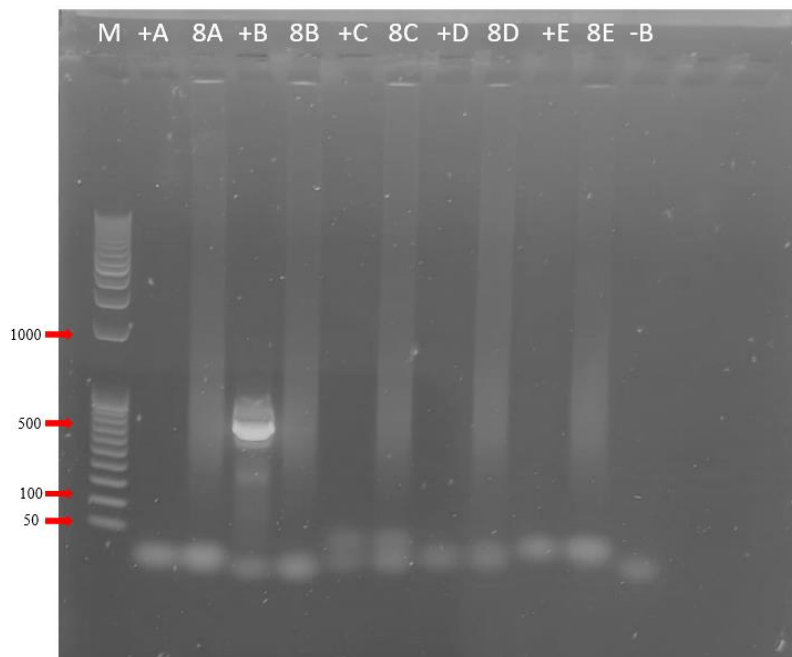
Rezultati PCR-testa za detekciju patogena *A. astaci* pokazali su da je svih 11 jedinki rakova *F. limosus* bilo negativno na prisutnost patogena (Slika 8). Patogen je detektiran samo u uzorku broj 8 (*A. astacus*) što je vidljivo iz prisutne vrpce veličine 569 pb.



Slika 8. A i B - prikaz PCR-testa za detekciju patogena *A. astaci* u DNA uzorcima izoliranim iz jedinki rakova *F. limosus* (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12) i *A. astacus* (8). Molekularni marker je DirectLoad™ 50 bp DNA StepLadder. Pozitivna kontrola (+) sadrži genomsku DNA izoliranu iz čiste kulture patogena *A. astaci*, dok negativna kontrola (-) ne sadrži DNA.

3.3. Genotipizacija patogena *A. astaci* PCR-testom

Genotipizacija patogena *A. astaci* PCR-testom (Slika 9) provedena je za uzorak *A. astacus* (uzorak 8) koji se pokazao kao pozitivan u prijašnjem koraku. Međutim, sve reakcije su bile negativne, vjerojatno zbog preniske koncentracije DNA patogena *A. astaci* u uzorku pa nije bilo moguće odrediti genotip kojim je bila zaražena jedinka. Pozitivna kontrola za genotip B dala je odgovarajući amplicon veličine 569 pb, dok pozitivne kontrole za ostale genotipove nismo imali.



Slika 9. Genotipizacija patogena *A. astaci* PCR-testom za uzorak *A. astacus* (8). Molekularni marker je DirectLoad™ 50 bp DNA StepLadder. Uzorci (8A do 8E) sadržavaju DNA uzorak br. 8 te početnice za detekciju odgovarajućeg genotipa patogena. Pozitivne kontrole (+A do +E) sadrže genomsku DNA izoliranu iz čiste kulture patogena *A. astaci* PEC8 (genotip B) te početnice za detekciju odgovarajućeg genotipa. Negativna kontrola (-B) sadrži početnice za detekciju genotipa B i destiliranu vodu umjesto uzorka.

4. RASPRAVA

Uvođenje i širenje invazivnih stranih vrsta poput bodljibradog raka *F. limosus* u nove ekosustave može stvoriti dodatni pritisak na već ugrožene autohtone populacije kroz kompeticiju za resurse i širenje bolesti (Boršić i sur., 2018). Ranija istraživanja pokazala su da bodljibradi rak može djelovati kao prenositelj patogena *A. astaci* i pridonijeti širenju račje kuge u Europi (Bláha i sur., 2022; Chucholl, 2013). Tako je *A. astaci* genotip E zabilježen kod *F. limosus* (Kozubíková i sur., 2011) uzrokovao masovne pomore u populacijama *A. astacus* i *A. torrentium* u Češkoj (Kozubíková-Balcarová i sur., 2014), te u populaciji *A. pallipes* u Francuskoj (Grandjean i sur., 2014). Prema ranijem istraživanju Maguire i suradnika (2016), utvrđeno je da populacije *F. limosus* u Hrvatskoj latentno nose patogen *A. astaci*. Od ukupno 24 analizirana uzorka, 58 % rakova *F. limosus* bilo je pozitivno na račju kugu, što pokazuje kako je u analiziranim populacijama uzročnik račje kuge prisutan. Iako nije bilo zabilježenih izbijanja bolesti račje kuge (engl. *disease outbreak*) prisutnost latentno inficiranih populacija bodljibradog raka predstavlja opasnost za autohtone vrste rakova, prvenstveno vrsta *A. astacus* i *P. leptodactylus* koje su im geografski najbliže (Slika 4). U područjima kontakta vrsta *F. limosus* i *P. leptodactylus*, već su utvrđene značajno veće gustoće invazivne vrste naspram autohtone vrste (Hudina i sur., 2009) i zabilježen nestanak autohtone vrste *P. leptodactylus* iz područja kontakta (Maguire i sur., 2018). Moguće je da je istiskivanje populacija *P. leptodactylus* uzrokovano i širenjem patogena, ali su mogući i drugi uzroci poput kompeticije.

Međutim, u ovom je istraživanju svih 11 uzoraka *F. limosus* bilo negativno na prisutnost patogena. Jedan od mogućih razloga za ovakav rezultat jest otpornost invazivne vrste poput *F. limosus* na infekciju patogenom jer mogu preživjeti i djelovati kao prijenosnici patogena bez vidljivih simptoma, dok su autohtone vrste poput *A. astacus* osjetljivije i često ugibaju uslijed infekcije (Cerenius i sur., 2003; Bouallegui, 2021). Jedinke prenosioci obično imaju nisku količinu patogena na kutikuli s obzirom da imuni sustav raka sprječava da patogen prodre u unutrašnjost organizma i izazove bolest (Bouallegui, 2021). Na istoj istraženoj lokaciji (Kopački rit i rijeka Dunav) 2016. godine, u istočnoj Hrvatskoj (Maguire i sur., 2016) prisutnost patogena *A. astaci* (engl. *pathogen load*) kod vrste *F. limosus* određena je kvantitativnim PCR-om (engl. *quantitative real-time polymerase chain reaction*, qRT-PCR) (Vrålstad i sur., 2009) te je iznosila između A2 i A3. Raspon semikvantitativnih količina DNA patogena prema ovoj metodi je od A0

(u uzorku nema DNA *A. astaci*) do A7 (iznimno visoka količina DNA *A. astaci* u uzorku). Zbog niske koncentracije patogena genotipizacija nije bila moguća. U usporedbi s navedenim ranijim istraživanjem Maguire i sur. (2016), u ovom je radu za detekciju patogena korišten standardni, a ne kvantitativni PCR, koji je za red veličine osjetljivija metoda (Tuffs i Oidtmann, 2011). Stoga je moguće da je patogen u istraživanim populacijama *F. limosus* i dalje prisutan, ali u preniskoj količini da se detektira standardnim PCR-om te su potrebna dodatna istraživanja upotrebom osjetljivijih metoda poput kvantitativnog (Vrålstad i sur., 2009; Strand i sur., 2023) i digitalnog PCR-a (Grbin i sur., 2023).

Nadalje, mogućnost razlikovanja genotipova patogena *A. astaci* (A, B, C, D, E) presudno je u epidemiološkim i biološkim istraživanjima račje kuge i praćenju širenja različitih sojeva patogena (Ungureanu i sur., 2020; Minardi i sur., 2018). Različiti genotipovi imaju različitu virulenciju prema nativnim europskim vrstama rakova. Genotipovi B, D i E imaju visoku virulenciju i mogu uzrokovati velike pomore autohtonih populacija rakova, dok drugi manje virulentni genotipovi (A) omogućavaju preživljavanje jedinki kroz duži period (Oidtmann i sur., 2006; Diéguez-Uribeondo i sur., 2009; Makkonen i sur., 2011). Primjerice, populacije *A. astacus* i *A. torrentium* u NP Plitvička jezera su više godina latentno zaražene A genotipom *A. astaci*, bez zabilježenih masovnih pomora (Pavić i sur., 2021). U ovom radu genotipizacija patogena *A. astaci* PCR-testom nije uspjela i za to je vjerojatno glavni razlog preniska koncentracija DNA patogena u uzorku. To je vidljivo i iz relativno slabe vrpce kod detekcije patogena (Slika 9). Neuspjeh genotipizacije može biti posljedica i slabe kvalitete uzorka DNA ili loših uvjeta skladištenja koji mogu uzrokovati degradaciju DNA. U našem slučaju, u etanolu su bile konzervirane cijele jedinke rakova te postoji mogućnost da zbog hitinske kutikule na površini tijela konzervans nije dospio do tkiva te je došlo do njegove degradacije. Nedavno je istraživanje pokazalo da takvo čuvanje može negativno utjecati na mogućnost detekcije *A. astaci* (Pisano i sur., 2024). Naposljetku, korištene su specifične početnice dizajnirane u svrhu prepoznavanja od ranije poznatih genotipova *A. astaci*. Ukoliko je prisutan nepoznati genotip ili varijanta patogena efikasnost početnica kao i uspješnost detekcije može se smanjiti.

U budućim istraživanjima treba nastaviti s monitoringom širenja invazivne vrste bodljibradog raka *F. limosus* u Hrvatskoj i detekcijom uzročnika račje kuge korištenjem maksimalno osjetljivih molekularnih metoda (Vrålstad i sur., 2009; Grbin i sur., 2023; Strand i sur., 2023).

Kontinuirani monitoring omogućuje da se pravovremeno utvrde najugroženije autohtone populacije rakova te razviju i provedu pravovremene i učinkovite mjere zaštite.

5. ZAKLJUČAK

- Patogen *Aphanomyces astaci* koji uzrokuje račju kugu nije detektiran je u invazivnim jedinkama *Faxonius limosus*, ali je detektiran u uzorku autohtone vrste *Astacus astacus* sakupljene u istočnom dijelu Republike Hrvatske.
- Genotipizacija patogena *A. astaci* dobivenog iz *A. astacus* nije bila uspješna, vjerojatno zbog preniske koncentracije DNA patogena u uzorku.
- Temeljem prijašnjih i trenutačnih istraživanja utvrđeno je da populacije *F. limosus* u Hrvatskoj latentno nose patogen *A. astaci*, ali u niskim koncentracijama bez zabilježenih izbijanja epidemije (engl. *disease outbreak*).
- Prisutnost latentno inficiranih populacija bodljibradog raka predstavlja opasnost za autohtone vrste rakova *A. astacus* i *P. leptodactylus*.
- S obzirom da je patogen ranijim istraživanjima detektiran u populacijama *F. limosus* korištenjem osjetljivijih metoda (kvantitativni PCR), u nastavku istraživanja potrebno je koristiti osjetljivije molekularne metode (qRT-PCR i ddPCR) za pouzdaniju detekciju patogena.

6. LITERATURA

1. Alekhnovich A., Buřič M. (2017): NOBANIS – Invasive alien species fact sheet – *Orconectes limosus*. – From : Online Database of the European Network on invasive alien species – NOBANIS www.nobanis.org (Pristupljeno: 30.04.2024.)
2. Bláha M., Weiperth A., Patoka J., Szajbert B., Balogh E. R., Staszny Á., Ferincz Á., Lente V., Maciaszek R., Kouba A. (2022): The pet trade as a source of non-native decapods: the case of crayfish and shrimps in a thermal waterbody in Hungary. *Environ. Monit. Assess.* 194 (10): 795.
3. Boršić I., Ješovnik A., Mihinjač T., Kutleša P., Slivar S., Mustafić M.C., Desnica S. (2018): Invasive alien species of Union concern (Regulation 1143/2014) in Croatia. *Nat. Croat.* Vol. 27: 357-398.
4. Bouallegui Y. (2021): A comprehensive review on crustaceans' immune system with a focus on freshwater crayfish in relation to crayfish plague disease. *Front. Immunol.* 12: 667787.
5. Buřič M. (2009): Biology of spiny-cheek crayfish (*Orconectes limosus*, Rafinesque, 1817) under conditions of the Czech Republic and the study of factors influencing its invasive spreading. Ph.D thesis. University of South Bohemia České Budějovice.
6. Buřič M., Kouba A., Kozák P. (2013): Reproductive plasticity in freshwater invader: from long-term sperm storage to parthenogenesis. *PLoS ONE* 8: e77597.
7. Cerenius L., Bangyeekhun E., Keyser P., Söderhäll I., Söderhäll K. (2003): Host prophenoloxidase expression in freshwater crayfish is linked to increased resistance to the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*. *Cell. Microbiol.* 5: 353-357.
8. Cerenius L., Söderhäll K. (1984): Repeated zoospore emergence from isolated spore cysts of *Aphanomyces astaci*. *Exp. Micol.* 8: 370–377.
9. Chucholl, C. (2013): Invaders for sale: trade and determinants of introduction of ornamental freshwater crayfish. *Biol. Invasions.* 15: 125-141.

10. Crandall K.A., De Grave S. (2017): An updated classification of the freshwater crayfishes (Decapoda: Astacidea) of the world, with a complete species list. *J. Crustacean Biol.* 37(5): 615-653.
11. Crowl T.A., Crist T.O., Parmenter R.R., Belovsky G., Lugo A.E. (2008): The spread of invasive species and infectious disease as drivers of ecosystem change. *Front. Ecol. Environ.* 6: 238 - 46.
12. Davic R. D. (2003): Linking keystone species and functional groups: A new operational definition of the keystone species concept. *Conserv. Ecol.* 7.
13. Diéguez-Uribeondo J., García M.A., Cerenius L., Kozubíková E., Ballesteros I., Windels C., Weiland J., Kator H., Söderhäll K., Martín M.P. (2009): Phylogenetic relationships among plant and animal parasites, and saprotrophs in *Aphanomyces* (Oomycetes). *Fungal Genet. Biol.* 46: 365–376.
14. Diéguez-Uribeondo J., Huang T. S., Cerenius L. (1995): Physiological adaptation of an *Aphanomyces astaci* strain isolated from the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. *Mycol. Res.* 99 (5): 574-578.
15. Dudgeon D., Arthington A. H., Gessner M. O., Kawabata Z.-I., Knowler D. J., Lévêque C., Naiman R. J., Prieur - Richard A.-H., Soto D., Stiassny M. L. J., Sullivan, C. A. (2005): Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biol. Rev.* 81(02): 163-182.
16. EC, 2016: Commission Implementing Regulation (EU) 2016/1141 of 13 July 2016 adopting a list of invasive alien species of Union concern pursuant to Regulation (EU) No 1143/2014 of the European Parliament and of the Council. *Official Journal of the European Union L.* 189: 4-8. https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_impl/2016/1141/oj (Pristupljeno: 25.05.2024.)
17. Faller M., Harvey G. L., Henshaw A. J., Bertoldi W., Bruno M.C., England J. (2016): River bank burrowing by invasive crayfish: spatial distribution, biophysical controls and geomorphic significance. *Sci. Total Environ.* Vol 569–570: 1190–1200.

18. Filipova L., Lieb D. A., Grandjean F., Petrusek A. (2011): Haplotype variation in the spiny-cheek crayfish *Orconectes limosus*: colonization of Europe and genetic diversity of native stocks. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 30(4): 871-881.
19. Govedič M. (2017): First record of the spiny-cheek crayfish (*Orconectes limosus*) in Slovenia – 300 km upstream from its known distribution in the Drava River. *Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst.* 418: 7.
20. Grandjean F., Vrålstad T., Diéguez-Uribeondo J. (2014): Microsatellite markers for direct genotyping of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* (Oomycetes) from infected host tissues. *Vet. Microbiol.* 170: 317-324.
21. Grbin D., Geček S., Miljanović A., Pavić D., Hudina S., Žučko J., Rieder J., Pisano S. R. R., Adrian-Kalchhauser I., Bielen A. (2023): Comparison of exoskeleton microbial communities of co-occurring native and invasive crayfish species. *J. Invertebr. Pathol.* Vol 201:107996.
22. Hamr P. (2002). *Orconectes*. U: Holdich D.M. (ur.): *Biology of freshwater crayfish*. Blackwell Science Ltd. London, UK. 585-608.
23. Hänfling, B., Edwards, F., Gherardi, F. (2011): Invasive alien crustacea: dispersal, establishment, impact and control. *Bio Control.* 56 (4): 573–595.
24. Haubrock P. J., Turbelin A. J., Cuthber R. N., Novoa A., Taylor N. G., Angulo E., Ballesteros-Mejia L., Bodey T. W., Capinha C., Diagne C., Essl F., Golivets M., Kirichenko N., Kourantidou M., Leroy B., Renault D., Verbrugge L., Courchamp F. (2021): Economic costs of invasive alien species across Europe. *NeoBiota* 67: 153-190.
25. Havel, J. E., Katya E. Kovalenko, K. E., Thomaz, S. M., Amalfitano, S., Kats, L. B., (2015): Aquatic invasive species: challenges for the future. *Hydrobiologia.* 750:147–170.
26. Holdich D. M., Haffner P., Noël P. (2006): *Species files*. U: Souty-Grosset C., Holdich D.M., Noël P.Y., Reynolds J.D., Haffner P. (ur.), *Atlas of Crayfish in Europe*. Museum national d’Histoire naturelle Paris, str. 50–129.

27. 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.* 11: 394-395.
28. Holdich D., Black J. (2007): The spiny-cheek crayfish, *Orconectes limosus* (Rafinesque, 1817) [Crustacea: Decapoda: Cambaridae], digs into the UK. *Aquat. Invasions.* 2:1-15.
29. Holdich, D.M., Pöckl, M., (2007.): Invasive crustaceans in european inland waters. *Biological Invaders in Inland Waters: Profiles, Distribution, and Threats.* Springer, Dordrecht. 29–75.
30. Huang T. S., Cerenius L., Söderhäll K. (1994): Analysis of genetic diversity in the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*, by random amplification of polymorphic DNA. *Aquaculture.* 126: 1-10.
31. Hudina S., Faller M., Lucić A., Klobučar G., Maguire I. (2009): Distribution and dispersal of two invasive crayfish species in the Drava river basin, Croatia. *Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst.* 9: 394-395.
32. IUCN - International Union for Conservation of Nature (2017): The IUCN red list of threatened species. <https://www.iucnredlist.org/> (Pristupljeno: 24.06.2024.)
33. James J., Slater F. M., Vaughan I. P., Young K. A., Cable J. (2015): Comparing the ecological impacts of native and invasive crayfish: could native species' translocation do more harm than good?. *Oecologia.* 178: 309–316.
34. Jussila J., Edsman L., Maguire I., Uribeondo J.D., Theissinger K. (2021): Money Kills Native Ecosystems: European Crayfish as an Example. *Front. Ecol. Evol.* 9: 648495.
35. Kadri, K. (2019): Polymerase chain reaction (PCR): Principle and applications. U: Nagpal M. L., B. O.-M., Balta C., Enany S. (ur.) *Synthetic Biology-New Interdisciplinary Science.* str. 1-17.
36. Kouba A., Petrusek A., Kozák P. (2014): Continental-wide distribution of crayfish species in Europe: update and maps. *Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst.* 413: 05.

37. Kouba A., Tíkal 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.
38. Kozák P., Buřič M., Polícar T. (2006): The fecundity, time of egg development and juvenile production in spiny-cheek crayfish (*Orconectes limosus*) under controlled conditions. *Bull. fr. pêche piscic.* 380381: 1171–1182.
39. Kozák P., Ďuriš Z., Petrusek A., Buřič M., Horká I., Kouba A., Kozubíková- Balcarová E., Polícar T. (2015): Crayfish biology and culture. University of South Bohemia Czech Republic. 456.
40. Kozubíková E., Petrusek A., Ďuriš Z., Martín M.P., Diéguez-Uribeondo J., Oidtmann B. (2008): The old menace is back: Recent crayfish plague outbreaks in the Czech Republic. *Aquaculture.* 274: 208–217.
41. Kozubíková E., Viljamaa-Dirks S., Heinikainen S., Petrusek A. (2011): Spiny-cheek crayfish *Orconectes limosus* carry a novel genotype of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci*. *J. Invertebr. Pathol.* 108: 214-216.
42. Kozubíková-Balcarová E., Beran L., Ďuriš Z., Fischer D., Horká I., Svobodová J., Petrusek A. (2014): Status and recovery of indigenous crayfish populations after recent crayfish plague outbreaks in the Czech Republic. *Ethol. Ecol. Evol.* 26 (2–3): 299–319.
43. Lee P. Y., Costumbrado J., Hsu C. Y., Kim Y. H. (2012): Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J. Vis. Exp.* 62: 3923.
44. Lowe S., Browne S., Boudjela S. M., De Poorter M. (2004): 100 of the world's worst invasive alien species. A selection from the global invasive species database. The Invasive Species Specialist Group (ISSG) of the World Conservation Union (IUCN).
45. Maguire I. i Klobučar G. (2003): Appearance of *Orconectes limosus* in Croatia. *Crayfish News.* 3(25): 7.

46. Maguire I., Gottstein-Matočec S. (2004): The distribution pattern of freshwater crayfish in Croatia. *Crustaceana*. 77: 25-47.
47. Maguire I., Jelić M., Klobučar G. (2011): Update on the distribution of freshwater crayfish in Croatia. *Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst.* 401: 31.
48. Maguire I., Jelić M., Klobučar G., Delpy M., Delaunay C., Grandjean F. (2016): Prevalence of the pathogen *Aphanomyces astaci* in freshwater crayfish populations in Croatia. *Dis. Aquat. Organ.* Vol. 118: 45–53.
49. Maguire I., Klobučar G., Tiganec 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.
50. Makkonen J, Jussila J, Kokko H. (2012): The diversity of the pathogenic Oomycete (*Aphanomyces astaci*) chitinase genes within the genotypes indicate adaptation to its hosts. *Fungal Genet. Biol.* 49(8):635–42.
51. Makkonen J., Jussila J., Henttonen P., Kokko H. (2011): Genetic variation in the ribosomal internal transcribed spacers of *Aphanomyces astaci* Schikora from Finland. *Aquaculture*. 311: 48–53.
52. Makkonen J., Jussila J., Kortet R., Vainikka A., Kokko H. (2012): Differing virulence of *Aphanomyces astaci* isolates and elevated resistance of noble crayfish *Astacus astacus* against crayfish plague. *Dis. Aquat. Organisms*. 102: 129–136.
53. Minardi D., Studholme D. J., Giezen M., Pretto T., Oidtmann B. (2018): New genotyping method for the causative agent of crayfish plague (*Aphanomyces astaci*) based on whole genome data. *J. Invertebr. Pathol.* 156: 6-13.
54. Momot W. T. (1995). Redefining the role of crayfish in aquatic ecosystems. *Rev. Fish. Sci.* 3(1): 33–63.
55. Narodne novine (13/2024.): Pravilnik o crnoj i bijeloj listi stranih vrsta. Ministarstvo gospodarstva i održivog razvoja. <https://www.zakon.hr/cms.htm?id=59530> (Pristupljeno: 28.05.2024.)

56. Narodne novine (144/2013.): Pravilnik o strogo zaštićenim vrstama. Ministarstvo gospodarstva i održivog razvoja. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_12_144_3086.html (Pristupljeno: 24.06.2024.)
57. Narodne novine (80/2013., 15/2018.): Zakon o zaštiti prirode. Ministarstvo gospodarstva i održivog razvoja. <https://www.zakon.hr/z/403/Zakon-o-za%C5%A1titi-prirode> (Pristupljeno: 24.06.2024.)
58. Nentwig, W., Bacher, S., Kumschick, S., Pyšek, P., Vilà, M. (2018): More than “100 worst” alien species in Europe. *Biol. Invasions*. 20 (6): 1611–1621.
59. Nyhlen L., Unestam T. (1980): Wound reactions and *Aphanomyces astaci* growth in crayfish cuticle. *J. Invertebr. Pathol.* 36:187–197.
60. Oidtmann B., Bausewein S., Hölzle L., Hoffmann R., Wittenbrink M. (2002): Identification of the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci* by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *Vet. Microbio.* Vol 85: 183-194.
61. Oidtmann B., Geiger S., Steinbauer P., Culas A., Hoffmann R. W. (2006): Detection of *Aphanomyces astaci* in North America crayfish by polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Organ.* 72: 53-64.
62. Oidtmann B., Schaefers N., Cerenius L., Söderhäll K., Hoffmann R.W. (2004): Detection of genomic DNA of the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci* (Oomycete) in clinical samples by PCR. *Vet. Microbio.* 100: 269–282.
63. OIE – World Organisation for Animal Health (2019): Aquatic animal health code, poglavlje 9.2.: Infection with *Aphanomyces astaci* (crayfish plague). https://rr-europe.oie.int/wp-content/uploads/2020/08/oie-aqua-code_2019_en.pdf (Pristupljeno: 13.05.2024.)
64. Olden J. D., Poff N. L., Douglas M. R., Douglas M. E., Fausch K. D. (2004): Ecological and evolutionary consequences of biotic homogenization. *Trends Ecol. Evol.* 19: 18–24.

65. Patoka J., Buřič M., Kolář V., Bláha M., Petrtýl M., Franta P., Tropek R., Kalous L., Petrušek A., Kouba A. (2016): Predictions of marbled crayfish establishment in conurbations fulfilled: Evidences from the Czech Republic. *Biologia*. 71: 1380-1385.
66. Pavić D., Bielen A., Hudina S., Špoljarić I., Grandjean F., Jussila J., Maguire I. (2021): Distribution of *Aphanomyces astaci* Schikora, 1906, the causative agent of crayfish plague, in the Plitvice Lakes National Park, Croatia. *Bioinvasions Rec.* 10 (3): 654-668.
67. Pavić D., Čanković M., Petrić I., Makkonen J., Hudina S., Maguire I., Vladušić T., Šver L., Hrašćan R., Orlić K., Dragičević P., Bielen A. (2020): Non-destructive method for detecting *Aphanomyces astaci*, the causative agent of crayfish plague, on the individual level. *J. Invertebr. Pathol.* Vol. 169: 107274.
68. Pisano S. R. R., Steiner J., Cristina E., Delefortrie Z., Delalay G., Krieg R., Zenker A., Schmidt-Posthaus H. (2024): An old unknown: 40 years of crayfish plague monitoring in Switzerland, the water tower of Europe. *J. Invertebr. Pathol.* 108159.
69. Pöckl M., Holdich D. M., Pennerstorfer J., (2006): Identifying native and alien crayfish species in Europe. European Project CRAYNET.
70. Puky M., Schád P. (2006): *Orconectes limosus* colonises new areas fast along the Danube in Hungary. *Bull. fr. pêche piscic.* 380-381: 919-926.
71. Reynolds J., Souty-Grosset S., Richardson A. (2013.): Ecological roles of crayfish in freshwater and terrestrial habitats. *Freshw. Crayfish.* 19(2):197–218.
72. Reynolds J.D. (2002): Growth and reproduction. U: Holdich D.M. (ur.), *Biology of freshwater crayfish*. Blackwell Science Ltd. London, UK, str. 152–191.
73. Rezinciuc S., Galindo J., Montserrat J., Diéguez-Uribeondo J. (2014): AFLP-PCR and RAPD-PCR evidences of the transmission of the pathogen *Aphanomyces astaci* (Oomycetes) to wild populations of European crayfish from the invasive crayfish species, *Procambarus clarkii*. *Fungal Biol.* 118(7): 612-20.

74. Rezinciuc, S., Sandoval-Sierra, J.V., Oidtmann, B., Diéguez-Uribeondo, J. (2015): The biology of crayfish plague pathogen: current answers to most frequent questions. U: Kawai, T., Faulkes, Z., Scholtz, G. (ur.), *Freshwater Crayfish: A Global Overview*. CRC Press. Boca Raton, Florida, str. 182–204.
75. Söderhäll K., Cerenius L. (1992): Crustacean immunity. *Annu. Rew. Fish. Dis.* 2: 3-23.
76. Söderhäll K., Cerenius L. (1998) Role of the prophenoloxidase activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.*10: 23-28.
77. Söderhäll K., Cerenius L. (1999): The crayfish plague fungus: history and recent advances. *Freshw. Crayfish.* 12: 11-35.
78. Soto I., Ahmed D. A., Beidas A., Oficialdegui F. J., Tricarico e., Angeler D.G., Amatulli G., Briski E., Datry T., Dohet A., Domisch S., England J., Feio M. J., Forcellini M., Johnson R. K., Jones J. I., Larrañaga A., L'Hoste L., Murphy J. F., Schäfers R. B., Shen L. Q., Kouba A., Haubrock P.J. (2023): Long-term trends in crayfish invasions across European rivers. *Sci. Total Environ.* 867: 161537.
79. Souty-Grosset C., Holdich D. M., Noel P. Y., Reynolds J. D., (2006): Haffner P. (ur.) *Atlas of crayfish in Europe*. Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, str. 187. (Patrimoines naturels ; 64).
80. Strand D. A., Jinnerot T., Aspán A., Viljamaa-Dirks S., Heinikainen S., Rolén E., Vrålstad T. (2023): Molecular detection of *Aphanomyces astaci* - An improved species specific qPCR assay. *J. Invertebr. Pathol.* 201:108008.
81. Strayer D. L. (2012): Eight questions about invasions and ecosystem functioning. *Ecol. Lett.* 15: 1199–1210.
82. Svoboda J., Mrugała A., Kozubiková- Balcarová E., Petrusek A. (2017): Hosts and transmission of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci*: a review. *J. Fish Dis.* 40: 127–140.

83. Tuffs S., Oidtmann B. (2011): A comparative study of molecular diagnostic methods designed to detect the crayfish plague pathogen, *Aphanomyces astaci*. *Vet. Microbiol.* 153(3-4): 343–353.
84. Unestam T., Weiss D. W. (1970): The host-parasite Relationship between freshwater crayfish and the crayfish disease fungus *Aphanomyces astaci*: responses to infection by a susceptible and a resistant species. *J. Gen. Microbiol.* 60: 77-90.
85. Ungureanu E., Mojžišová M., Tangerman M., Ion M. C., Pârvulescu L., Petrussek A. (2020): The spatial distribution of *Aphanomyces astaci* genotypes across Europe: Introducing the first data from Ukraine. *Freshw. Crayfish.* 25 (1): 77-87.
86. Vojtkovská R., Horká I., Ďuriš Z. (2014): The diet of the spiny-cheek crayfish *Orconectes limosus* in the Czech Republic. *Cent. Eur. J. Bio.* 9(1): 58-69.
87. Vrålstad T., Knutsen A. K., Tengs T., Holst-Jensen A. (2009): A quantitative TaqMan® MGB real-time polymerase chain reaction based assay for detection of the causative agent of crayfish plague *Aphanomyces astaci*. *Vet. Microbiol.* 137 (1-2): 146–155.
88. Wages Jr. J.M. (2005): Polymerase chain reaction. *Encyclopedia of Analytical Science* (Second Edition), str. 243-250.
89. Weinländer M., Füreder L. (2016): Native and alien crayfish species: do their trophic roles differ? *Freshw. Sci.* 35(4): 1340–1353.
90. Wetzel R. G. (2013): Freshwater ecosystems. *Encyclopedia of Biodiversity* (Third Edition). Vol 1: 532-542.
91. WHO - World Health Organization (2023): Malaria <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria> (Pristupljeno: 29.05.2024.)
92. WWF - World Wide Fund for Nature (2020): Freshwater biodiversity https://wwf.panda.org/discover/our_focus/freshwater_practice/freshwater_biodiversity_22/ (Pristupljeno: 29.05.2024.)

93. Yilmaz M., Ozic C., Gok I. (2012.): Principles of Nucleic Acid Separation by Agarose Gel Electrophoresis. U: Magdeldin S. (ur.) Gel electrophoresis Principles and Basics. InTech. str. 33-40.

ŽIVOTOPIS

Mia Bednjanić, rođena u Varaždinu 04.03.1997. Osnovnoškolsko obrazovanje završila je u II. Osnovnoj školi Varaždin, a srednjoškolsko obrazovanje je stekla u Drugoj Gimnaziji Varaždin, opći smjer. Preddiplomski studij upisala je 2016. na Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel biologija. Akademski naziv prvostupnika stekla je 2021. godine izradom završnog rada „Utjecaj klimatskih promjena na ugroženost zelene morske kornjače (*Chelonia mydas* L.)“ pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Alme Mikuška. Te iste godine upisala je diplomski sveučilišni studij ekologije i zaštite prirode, modul Kopnene vode na Prirodoslovno - matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.