

# Molekularno-filogenetička i filogeografska analiza vrste *Ancylus fluviatilis* O.F. Müller, 1774 (Gastropoda: Planorbidae) u Hrvatskoj

---

Kocijan, Kristina

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:217:265112>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-07**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Kristina Kocijan

**Molekularno-filogenetička i filogeografska analiza vrste *Ancylus fluviatilis* O. F. Müller,  
1774 (Gastropoda: Planorbidae) u Hrvatskoj**

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

Ovaj rad je izrađen u DNA laboratoriju Hrvatskog prirodoslovnog muzeja u Zagrebu pod vodstvom dr. sc. Martine Podnar Lešić i u Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Jasne Lajtner. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre eksperimentalne biologije.

## ZAHVALA

---

Najveća hvala dragim mentoricama, dr. sc. Martini Podnar Lešić i doc. dr. sc. Jasni Lajtner, za svu pruženu pomoć tijekom izrade ovog diplomskog rada. Zahvaljujem Vam na uloženom trudu, strpljenju, savjetima i dragocjenom vremenu te na odgovorima na sva moja pitanja i nejasnoće.

Hvala i Leoni Lovrenčić na dobroj poduci i velikoj pomoći oko svih aspekata laboratorijskog rada.

Posebno sam zahvalna dragim roditeljima, sestri Kseniji, bratiću Tinu te dečku Petru na velikoj podršci i riječima ohrabrenja kada su mi bile najviše potrebne.

I za kraj velika hvala dragim prijateljicama, Ivani i Mireli, koje su mi studentske dane učinile nezaboravnima. Vaše prijateljstvo nešto je najljepše što sam stekla na ovom fakultetu.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno - matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

### **Molekularno-filogenetička i filogeografska analiza vrste *Ancylus fluviatilis* O. F. Müller, 1774 (Gastropoda: Planorbidae) u Hrvatskoj**

Kristina Kocijan

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

*Ancylus fluviatilis* O. F. Müller, 1774 slatkovodni je puž iz porodice Planorbidae široko rasprostranjen u Hrvatskoj. *A. fluviatilis* najvjerojatnije predstavlja kompleks četiri genetski i reproduktivno izolirane kriptične vrste koje zasad još nisu formalno opisane. Cilj ovog istraživanja bio je, na temelju analize dva genska biljega, mitohondrijskih gena za *COI* i *16S rRNA*, razotkriti koje su kriptične vrste *A. fluviatilis* kompleksa prisutne u Hrvatskoj i kakvo je njihovo rasprostranjenje u našim vodotocima te utvrditi molekularno-filogenetske odnose i genetske udaljenosti između populacija kao i filogeografski uzorak kompleksa na našem području. Utvrđeno je da Hrvatsku nastanjuju bar tri vrste *A. fluviatilis* kompleksa, široko rasprostranjen *Ancylus* sp. B, te lokalno prisutan *Ancylus* sp. C i *A. fluviatilis sensu stricto* čije rasprostranjenje je u skladu s općom filogeografskom slikom kompleksa. Filogeografski uzorak *Ancylus* sp. B u Hrvatskoj uglavnom se ne može objasniti prirodnim rasprostranjenjem i geografskim barijerama toku gena, nego pasivnim transportom i klimatskim značajkama područja koje nastanjuju.

(71 stranica, 15 slika, 15 tablica, 74 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

**Ključne riječi:** kriptične vrste, slatkovodni puževi, filogenija, filogeografija, *COI* i *16S rRNA*

**Voditelji:** dr. sc. Martina Podnar Lešić i doc. dr. sc. Jasna Lajtner

**Ocjenitelji:** doc. dr. sc. Jasna Lajtner

doc. dr. sc. Ana Galov

izv. prof. dr. sc. Sandra Radić Brkanac

**Rad prihvaćen:** 1. prosinca 2016.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation thesis

### **Molecular phylogenetic and phylogeographic analysis of population of *Ancylus fluviatilis* O. F. Müller, 1774 (Gastropoda: Planorbidae) in Croatia**

Kristina Kocijan

Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

*Ancylus fluviatilis* O. F. Müller, 1774 is a freshwater snail from family Planorbidae widespread in Croatia. *A. fluviatilis* most likely represents a complex of four genetically and reproductively isolated cryptic species that are not currently formally described. The aim of this study was, based on the analysis of two genetic markers, mitochondrial genes *COI* and *16S rRNA*, to determine which cryptic species of *A. fluviatilis* complex are present in Croatia, their distribution, molecular phylogenetic relationships and genetic distance between populations as well as phylogenetic pattern that complex exhibits in our area. It was found that Croatia is inhabited with at least three species of *A. fluviatilis* complex, the widespread *Ancylus* sp. B, and locally present *Ancylus* sp. C and *A. fluviatilis sensu stricto* whose distribution is in accordance with the general phylogeographic picture of the complex. Observed phylogenetic pattern of *Ancylus* sp. B in Croatia mostly can not be explained by natural distribution and geographical barriers to gene flow, but rather to passive transport and climatic features of the area they inhabit.

(71 pages, 15 figures, 15 tables, 74 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

**Key words:** cryptic species, freshwater snails, phylogeny, phylogeography, *COI* i *16S rRNA*

**Supervisors:** Dr. Martina Podnar Lešić and Dr. Jasna Lajtner, Asst. Prof.

**Reviewers:** Dr. Jasna Lajtner, Asst. Prof.

Dr. Ana Galov, Asst. Prof.

Dr. Sandra Radić Brkanac, Assoc. Prof.

**Thesis accepted:** 1<sup>st</sup> December, 2016

## SADRŽAJ

---

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Osnovne značajke mekušaca .....	1
1.2. Puževi (Gastropoda) .....	2
1.2.1. Slatkovodni puževi .....	5
1.2.2. <i>Ancylus fluviatilis</i> O. F. Müller, 1774 .....	9
1.3. Filogenija .....	13
1.3.1. Molekularna filogenija .....	14
1.3.2. Filogenetsko stablo .....	15
1.3.3. Metode za konstrukciju filogenetskog stabla .....	17
1.3.4. Filogenetske mreže .....	18
1.4. Mitohondrijska DNA .....	19
1.4.1. DNA barkodiranje .....	20
1.5. Filogeografija .....	21
<b>2. CILJEVI</b> .....	23
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	24
3.1. Materijali .....	24
3.1.1. Životinjski materijal .....	24
3.1.2. Popis korištenih kemikalija .....	26
3.1.3. Kit za izolaciju DNA .....	26
3.1.4. Oligonukleotidne početnice .....	26
3.2. Metode .....	27
3.2.1. Izolacija genomske DNA .....	27
3.2.2. PCR – lančana reakcija polimerazom .....	27
3.2.3. Elektroforeza DNA u gelu agaroze .....	28
3.2.4. Pročišćavanje i sekvenciranje .....	28

3.2.5. Računalne analize nukleotidnih sekvenci.....	29
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>38</b>
4.1. Srađnjivanje nukleotidnih sekvenci.....	38
4.2. Filogenetičke i filogeografske analize sekvenci.....	42
4.2.1. Analiza <i>COI</i> gena .....	43
4.2.2. Analiza <i>16S rRNA</i> gena.....	49
4.2.3. Analiza konkateneranog seta <i>COI+16S rRNA</i> .....	51
4.3. Procjena vremena divergencije .....	53
4.4. ABDG analiza .....	55
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>57</b>
<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>63</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>64</b>
<b>8. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>71</b>



# 1. UVOD

---

## 1.1. Osnovne značajke mekušaca

Mekušci (Mollusca) su koljeno beskralježnjaka, jedno od devet unutar natkoljena Lophotrochozoa. To je jedna od najbolje istraženih skupina beskralježnjaka, a znanost koja ih proučava naziva se malakologija. Ime potječe od latinske riječi "mollis" što znači nježan, mekan, gibak, a odnosi se na mekano tijelo koje je odlika svih mekušaca (Habdija i sur. 2011).

Fosilno su jako dobro očuvani pa njihovu pojavu možemo pratiti sve do ranog kambrija od prije 543 milijuna godina, iako se pretpostavlja da su neki mekušci nađeni i u ranim prekambrijskim stijinama (Ponder i Lindberg 2008). To je stara polifiletska skupina čija je evolucijska prošlost veoma dugačka. Pomoću brojnih fosilnih nalaza opisano je oko 35 000 izumrlih vrsta (Habdija i sur. 2011).

Prema brojnosti mekušci su druga najveća skupina životinja, odmah iza člankonožaca, s 81 000 opisanih recentnih vrsta. Od toga 55 000 su morske vrste, 6 000 je slatkovodnih, a kopnenih ima 20 000. Pretpostavlja se da je stvaran broj vrsta mnogo veći, između 150 000 i 200 000 (Bouchet 2007). Sistematski su razdijeljeni u sedam razreda: bezljušturaši (Aplacophora), mnogoljušturaši (Polyplacophora), jednoljušturaši (Monoplacophora), glavonošci (Cephalopoda), puževi (Gastropoda), koponošci (Scaphopoda) i školjkaši (Bivalvia). Mekušci su uglavnom morske životinje, dio školjkaša i puževa nastanio je slatke vode, a samo neke vrste puževa prilagodile su se životu na kopnu. Svaka od skupina različitog je izgleda i specifičnosti građe, ali međusobno dijele mnogo zajedničkih karakteristika. Opći plan građe sastoji se od mekanog tijela, slabo diferencirane glave, visceralne vreće s unutarnjim organima koja je smještena dorzalno te plosnatog stopala s ventralne strane. S leđne strane tijelo štiti vapnenačka ljuštura koju izlučuje epitel plašta, a ona može biti jednodijelna, dvodijelna ili višedijelna no neki mekušci je ni nemaju (Habdija i sur. 2011).

Mekušci pokazuju veliku varijabilnost u veličini tijela, obliku, ponašanju i životnom prostoru. Rasprostranjeni su gotovo posvuda, od velikih oceanskih dubina do vrhova planina. Dobri su bioindikator, pogotovo u rijekama gdje ukazuju na stanje i kakvoću vode. Imaju ključnu ulogu u kruženju hranjivih tvari, filtraciji vode i obnovi tla. Bitni su u hranidbenom lancu kao važan izvor hrane za mnoge beskralježnjake, ribe, ptice, sisavce pa i čovjeka (Cuttelod i sur. 2011). Ljudi su od davnina koristili mekušce u prehrani, ali i kao sredstvo

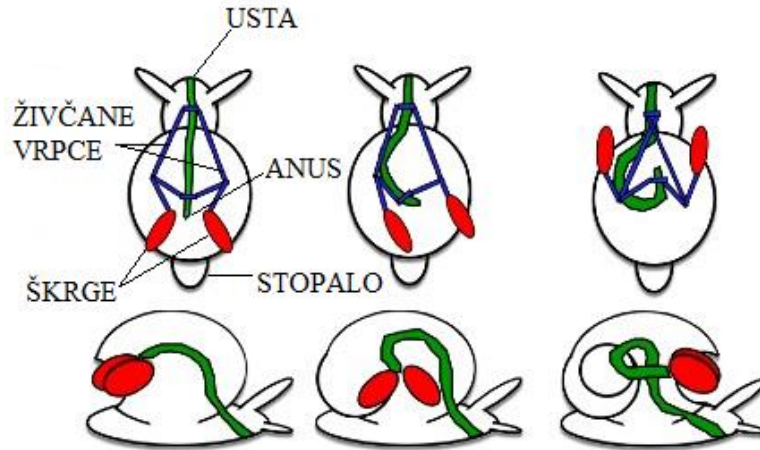
robne razmjene, ljuštore su služile kao posude za kuhanje ili čuvanje hrane, pigmenti za bojanje tkanina, a njihova ljepota i raznolikost inspiracija je u umjetnosti i arhitekturi.

Što se tiče ugroženosti mekušaca na europskoj, ali i svjetskoj razini najveća prijetnja je degradacija i nestanak staništa. Upravo zbog toga od 1880-ih brojnost mnogih široko rasprostranjenih vrsta je u padu što je zabrinjavajuća činjenica pošto su više od 90 % europskih mekušaca endemični. Jedan od glavnih centara bioraznolikosti i endemizma je područje Mediterana, a tu spada i Hrvatska (Cuttelod i sur. 2011). Prema Pravilniku o strogo zaštićenim vrstama (Narodne novine 80/2013) u Hrvatskoj je ukupno 168 vrsta mekušaca na popisu strogo zaštićenih zavičajnih divljih svojti, od čega 9 vrsta školjkaša i 159 vrsta puževa.

## **1.2. Puževi (Gastropoda)**

Puževi su najbrojniji i faunistički najraznovrsniji razred mekušaca. Procjenjuje se da danas postoji oko 100 000 vrsta puževa što čini 80 % brojnosti recentnih mekušaca (Ponder i Lindberg 2008). Javljaju se krajem kambrija, a tokom ordovijcija i silura kao rezultat adaptivne radijacije nastaje veliki broj linija, iako raznovrsnost kakva je danas dosežu u kasnom mezozoiku (Palaeos 2002). Primarno su to morske životinje koje su se prilagodile svim tipovima morskoga dna. Široki spektar morfoloških, anatomskih i etoloških prilagodbi na različite životne uvjete tijekom evolucije omogućio je naseljavanje slatkovodnih i kopnenih staništa zbog čega su puževi najuspješniji razred mekušaca. U Hrvatskoj živi oko 600 morskih, 200 slatkovodnih i 300 kopnenih vrsta (Habdija i sur. 2011).

Prema Ponderu i Lindbergu (2008) recentni puževi dijele se u dva podrazreda: Eogastropoda i Orthogastropoda. Habdija i suradnici (2011) dijele puževe ovisno o stupnju torzije na tri podrazreda: prednjoškržnjaci (Prosobranchia), stražnjoškržnjaci (Opistobranchia) i plućnjaci (Pulmonata). Torzija, odnosno zakretanje plaštanog kompleksa i utrobne vreće za 180° tijekom embrionalnog razvoja glavno je zajedničko obilježje svih puževa (Slika 1). Taj jedinstveni proces zbiva se tijekom kasnijeg stadija razvitka veliger ličinke i to u dvije faze. Posljedice torzije nisu iste kod svih skupina puževa, a razlike su vidljive u morfološkim i anatomskim karakteristikama. Važnost torzije je u tome što zbog anteriornog položaja organa plaštane šupljine životinja dobiva čistu vodu za disanje, a dolazi i do koncentracije osjetljivih organa u prednjem dijelu tijela (Habdija i sur. 2011).



**Slika 1.** Torzija kod puževa (preuzeto i prilagođeno iz: Gold 2010).

Promatrajući vanjski izgled može se uočiti kako su puževi asimetrične životinje. Tri su glavne cjeline tijela: glava, stopalo i utrobna vreća zaštićena ljušturicom. Glava je na prednjem dijelu tijela, a na njoj se nalaze oči, jedan ili dva para ticala te usta. Na ventralnoj strani nalazi se veliko i mišićavo stopalo koje služi za puzanje, hvatanje plijena, obranu od predatora i za razmnožavanje. Prema potrebi stopalo se može izmijeniti pa se ono kod pelagičkih vrsta prilagodilo za plivanje, kod sjedilačkih se znatno reduciralo, a kod vrsta koje se ukopavaju u podlogu se povećalo. S dorzalne strane nalazi se utrobna vreća zaštićena vapnenačkom ljušturicom koja se kod puževa naziva kućicom. Kućica je jednodijelna, asimetrično savijena, a orijentira se tako da je vrh (*apex*) postavljen okomito prema gore, a ušće (*apertura*) prema dolje. Ako se kod tako položene kućice ušće nalazi na desnoj strani tada je kućica dekstrozna ili dešnjakinja, a ako se nalazi s lijeve strane tada je sinistrozna ili ljevakinja. Kućicu oblikuju zavoji koji se spiralno savijaju oko kolumele, središnjeg potpornja. Broj zavoja varira ovisno o vrsti, od dva do šesnaest. Vremenski gledajući najstariji dio kućice je njezin vrh, a najmlađi dio posljednji zavoj. Sva morfometrijska obilježja kućice poput njezine visine, širine, oblik ušća, širina posljednjeg zavoja i dr. bitna su kod determinacije puževa (Habdija i sur. 2011).

Tijelo puža prekriva jednoslojna epiderma, plašt i mišićni sloj. Epidermu čine trepetljikave stanice između kojih se nalaze brojne žljezdane stanice čija je funkcija izlučivanje sluzi. Plašt je epidermalno udvostručenje koje obavija tijelo puža. Sam rub posebno je bogat žljezdanim stanicama te je upravo on odgovoran za nastanak kućice. Kućica se sastoji od tri sloja: vanjski sloj (*periostracum*) građen od konhiolina, srednji sloj (*oostracum*) kojeg zapravo čine prizmatični i pločasti sloj, ovisno o orijentaciji kristala

kalcijevog karbonata te listasti sedefasti unutarnji sloj (*hypostracum*). Plašt nije na svim mjestima srastao s tijelom već između njega i utrobne vreće postoji plaštana šupljina u kojoj su smještene škrge. Mišićni sloj izgrađuje mišićno tkivo uronjeno u nakupinu vezivnog tkiva. Tkivo se sastoji od prstenastih, dijagonalnih i uzdužnih mišićnih snopova. Unutar mišićnog sloja nalaze se lakune ispunjene tjelesnom tekućinom koje mišićima pružaju mehanički oslonac (Habdija i sur. 2011).

Živčani sustav kod puževa je tetraneuralan, a sastoji se od dva para živčanih vrpca, visceralne i pedalne te šest parova ganglija od kojih je svaki zadužen za inervaciju određenog dijela tijela. Cerebralni gangliji primaju osjetne živce iz očiju, ticala i statocista, bukalni gangliji inerviraju mišiće radule i odontofora, pleuralni inerviraju plašt, visceralni inerviraju organe utrobne vreće, parijetalni inerviraju škrge, osfradije i plašt, a pedalni gangliji inerviraju mišiće stopala (Habdija i sur. 2011).

U koži puževa nalaze se brojna osjetila, koncentrirana najviše na području stopala i na ticalima. Na osnovi ticala smještene su oči koje mogu biti jednostavne jamičaste ili složnije mjehuraste. Kod nekih kopnenih vrsta oči se nalaze na vršcima drugog para ticala. Statocisti, organi za ravnotežu, smješteni su na stopalu. Vodene vrste blizu osnovice škrge ili na rubu plašta imaju smještene osfradije, kemoreceptore pomoću kojih nadziru kvalitetu vode (Habdija i sur. 2011).

Građa probavnog sustava ovisi o tome čime se puž hrani, da li je biljojed, grabežljivac, svejed, strvinar ili konzumira organski detritus. Probava počinje u ustima unutar kojih su kutikularizirane čeljusti te jedan ili više pari slinskih žlijezda. Slijedi ždrijelo na čijem se donjem dijelu nalazi radula ili trenica. Prema rasporedu i izgledu zubića razlikuje se pet osnovnih tipova radule što omogućava i determinaciju puževa. Usitnjena hrana iz ždrijela dalje putuje u jednjak koji je kod mnogih vrsta proširen u volju. Tu hrana biva djelomično razgrađena pa kao takva dospijeva u želudac koji je povezan s jednom ili s parom probavnih žlijezda koje sudjeluju u ekstracelularnoj i intracelularnoj probavi. Ono što se ne može probaviti prolazi kroz crijevo te se kroz analni otvor izbacuje van (Habdija i sur. 2011).

Optjecajni sustav je otvoren i sastoji se od srca, aorte, krvnih žila te sustava sinusa i lakuna koji zajedno čine hemocel. Tijelom struji hemolimfa, mješavina izvanstanične i tjelesne tekućine koja prenosi hranjive tvari, metaboličke plinove i ekskrete. Osim toga važnu ulogu ima i kod izvlačenja i uvlačenja tijela puža u kućicu jer svojim turgorom djeluje kao hidroskelet. Respiratorni pigment je kod većine puževa hemocijanin no neki imaju

hemoglobin. Srce se nalazi u šupljini koju obavija perikard, a smješteno je u blizini dišnog i ekskretornog sustava. Sastoji se od jedne mišićave klijetke i jedne ili dvije pretklijetke, ovisno o stupnju torzije (Habdija i sur. 2011).

Izmjena plinova kod vodenih puževa moguća je preko kože, ali i preko ktenidija ili perastih škrge koje strše u plaštanu šupljinu. Škrge kod mnogih puževa nestaju, a njihovu funkciju preuzimaju kožni nabori i krpasti nastavci. Tako kod puževa plućnjaka za disanje služi prokrvljeni plašt. Zrak u plaštanu šupljinu ulazi kroz pneumostom, dišni otvor na rubu plašta (Habdija i sur. 2011).

Ekskrecija kod najprimitivnijih puževa odvija se preko parnih metanefridija, a u ostalih samo preko jednog metanefridija. On se otvara u perikardijalnoj šupljini, a na njega se nastavlja renoperikardijalna cijev koja se proširuje u vrećastu tvorevinu i tvori žljezdani dio metanefridija. Iz šupljine metanefridija metabolite izvodi mokraćovod koji se nefridioporom otvara u plaštanu šupljini ili blizu dišnog otvora. Dušični ostaci se kod vodenih puževa izlučuju u obliku amonijaka, a kod kopnenih puževa u obliku mokraćne kiseline (Habdija i sur. 2011).

Plućnjaci i stražnoškržnjaci su dvospolci, a prednoškržnjaci većinom razdvojena spola s tri razine složenosti spolne organizacije. Oplodnja može biti vanjska ili unutarnja. Oplodjena jaja spiralno se brazdaju, a nakon gastrulacije razvija se plivajuća ličinka trohofora. Nakon nje u razvoju slijedi veliger ličinka koja na leđnoj strani ima začetke ljušture, a na trbušnoj strani začetak stopala (Habdija i sur. 2011).

### **1.2.1. Slatkovodni puževi**

Slatkovodni puževi prisutni su u vodenim staništima diljem cijelog svijeta, osim na Antarktici. Nastanjuju rijeke, jezera, močvare, izvore, podzemne vode, povremene lokve te druga slična staništa. Žive ispod površine vode pričvršćeni za vodenu vegetaciju, kamenje, drvo i druge čvrste površine ili na mekanom sedimentu. Neke vrste žive i u vodi i na kopnu, a dio njih može izdržati duži period na suhom. Nekoliko skupina puževa prilagodilo se vrlo slanim staništima pa ih tako nalazimo u Kaspijskom moru te slanim jezerima Azije, Afrike i Australije. Za sad nije pronađena ni jedna pelagička, nektonska ili parazitska vrsta (Strong i sur. 2008).

Većina slatkovodnih puževa su mikroherbivorni ili mikroomnivorni strugači, a hrane se dijatomejama, algama i bakterijskim naslagama. Ipak postoje i neke iznimke, npr.

pripadnici porodice Glacidorbidae su predatori, Viviparidae i Bithyniidae se hrane pomoću ktenidija suspendiranom hranom, a Ampullariidae, koje su primarno makroherbivori, hrane se jajima mahovnjaka i drugih vrsta puževa (Strong i sur. 2008). Slatkovodni puževi bitna su karika u hranidbenom lancu jer često kontroliraju količinu i sastav perifitona na lentičkim i lotičkim staništima (Thorp i Covich 2009), a oni sami su hrana kuni, vidri, rakunima, miševima i drugim sisavcima (Dillon 2004).

Brojnost slatkovodnih puževa procjenjuje se na oko 4 000 vrsta što je skoro 5 % od ukupnog broja vrsta puževa (Strong i sur. 2008). U Europi je prisutno 808 slatkovodnih vrsta što je 94 % od svih slatkovodnih mekušaca. Na slatke vode prilagodio se dio prednjoškrznjaka i dio plućnjaka (Cuttelod i sur. 2011). U fosilnom zapisu slatkovodne vrste puževa čine gotovo 20 % od ukupnog broja nađenih mekušaca. Prezervacijski potencijal je malen zbog toga što su kućice tanke i lagane, a i zbog kiselog okoliša u kojem se nalaze. Fosilizacija se u slatkovodnim staništima većinom odvija u nizinskim dijelovima i u jezerima. Zbog toga je teško procijeniti kada se točno javljaju slatkovodne vrste, ali većina modernih grupa javlja se tijekom jure ili krede. Puževi su zapravo više puta kolonizirali slatke vode, prema nekim procjenama 33 do 38 nezavisnih linija uspješno je nastanilo slatkovodna staništa. Danas se nove vrste još uvijek otkrivaju, u prosjeku 45 novih vrsta se opiše na godišnjoj razini (Strong i sur. 2008).

Iako nastanjuju gotovo sva vodena staništa, globalno gledajući njihova distribucija je nejednolika. Najveća raznolikost kao i najveći stupanj endemizma je na području tropa, a idući prema višim geografskim širinama raznolikost se smanjuje. Neka područja posebno se ističu raznolikošću vrsta i endemizmom slatkovodnih mekušaca te su kao takva prozvana vrućim točkama (Slika 2). Prema Strongu i sur. (2008) vruće točke raznolikosti slatkovodnih puževa mogu se klasificirati u 4 glavne kategorije:

- izvori i podzemna voda,
- velike rijeke i njihovi pritoci prvog i drugog reda,
- stara oligotrofna jezera
- monsunske močvare i s njima povezane rijeke i pritoci

Za takvu današnju distribuciju vrsta zaslužne su vikarijanca i širenje uz pomoć životinja, putem zraka, plutajući na vegetaciji niz rijeku te raspršenje u ličinačkom stadiju. Područje koje će određena vrsta zauzeti tim mehanizmima ovisi naravno o načinu života,

načinu disanja, pokretljivosti, načinu reprodukcije, sposobnosti preživljavanja sušnog razdoblja i sl. (Strong i sur. 2008).



**Slika 2.** Vruće točke raznolikosti slatkovodnih puževa. A-H: izvori i podzemna voda; I-Q: jezera; R-X: rijeke; Y: monsunske močvare (preuzeto iz: Strong i sur. 2008).

Kako svi mekušci evolucijski potječu iz mora, oni puževi koji su prešli u slatke vode morali su se prilagoditi sasvim drugačijem okolišu. Za razliku od mora koje je stabilno po fizičkim i kemijskim parametrima i gdje su fluktuacije male, slatke vode nestabilan su životni okoliš gdje promjene nastupaju brzo i mogu biti drastične. Puževi su tako prilikom prelaska u slatke vode morali najprije riješiti problem osmoregulacije pošto je koncentracija iona puno manja u slatkoj vodi nego u moru. Taj proces adaptacije čini se da je ireverzibilan jer do sada nije pronađena ni jedna slatkovodna vrsta koja bi ponovo kolonizirala more. Temperatura također predstavlja izazov jer slatka voda ima puno veća temperaturna kolebanja nego more, a postoji i mogućnost zaleđivanja. Za uspješno naseljavanje voda na kopnu potrebno je bilo i prilagoditi se na promjenjivi nivo vode, količinu i jačinu strujanja (Dillon 2004).

Prednjoškržnjaci su u više navrata kolonizirali slatke vode, a većina porodica proširila se po cijelom svijetu. Većinom su spolovi razdvojeni no ponekad se javljaju partenogenetske, a rijetko i hermafrodističke vrste. Partenogeneza je evoluirala najmanje tri puta, a hermafroditizam jednom. Prednjoškržnjaci dišu pomoću škrga te tako uzimaju otopljeni kisik iz okolne vode. Kako im je kisik važan čimbenik njih se većinom može naći u lotičkim staništima u kojima su koncentracije kisika dovoljno visoke. Plućnjaci su u vrijeme jure, u jednom navratu, nastanili slatke vode. Oni su izgubili škrgu te dišu pomoću pluća. Vrste koje žive u vodi uzimaju atmosferski kisik u obliku mjehurića zraka koji je smješten u plaštanoj

šupljini. Njega periodički zamjenjuju na površini, a osim za disanje on im služi i kao pomoć prilikom plutanja u vodi. Zbog takvog načina disanja plućnjaci su prilagođeni na stajaće ili slabo tekuće vode u kojima nije bitna količina otopljenog kisika. Ne postoje odvojeni spolovi nego su jedinke hermafroditi. Obično jedinke međusobno izmjenjuju spolne stanice no postoji i mogućnost samooplodnje. Takav način reprodukcije dobro je adaptiran za širenje i naseljavanje novih staništa ili za obnovu populacije nakon pada brojnosti iz nekog razloga (Dillon 2004).

Slatkovodni mekušci jedna su od ugroženijih životinjskih skupina (Lydeard i sur. 2004). Dva su glavna razloga tome: njihov način života i negativni ljudski utjecaj. Osjetljive vrste slabo su pokretne, većinom su vezane za određeni tip staništa, obitavanju na užem geografskom području, relativno dugo žive te im je potrebno dosta vremena da spolno sazriju, a fekunditet im je nizak. Zbog toga se teško prilagođavaju na promjene u vodnom režimu, onečišćenje, siltaciju te ne mogu konkurirati unesenim vrstama. Na mnogim područjima dešava se pad brojnosti puževa zbog izgradnje hidroelektrana i brana za kontrolu poplava (Strong i sur. 2008). Glavna prijetnja slatkovodnim mekušcima je pad kvalitete vode u rijekama i jezerima. Do onečišćenja dolazi prvenstveno zbog intenzivne poljoprivrede i urbanizacije što pogađa 36 % vrsta. Veliki problem predstavlja i pretjerano korištenje voda što utječe na 33 % vrsta te loša odvodnja otpadnih voda koja pogađa 29 % vrsta. Drugi razlozi ugroženosti su prekomjerna upotreba pesticida, promjene vodnog režima, širenje invazivnih vrsta, rekreacijske aktivnosti i turizam. Zbog klimatskih promjena češće se javljaju i suše koje postaju sve ozbiljniji problem. Na razini Europe prema IUCN Crvenoj listi 373 vrste spadaju u neku kategoriju ugroženosti. Kritično ugroženih vrsta ima 109, ugroženih 90, a osjetljivih 174. Većina ugroženih vrsta ujedno je i endemična za Europu, a najviše takvih vrsta nalazi se na području Mediterana (Cuttelod i sur. 2011).

Slatkovodni mekušci imaju odličnu primjenu u biomonitoringu jer su izvrsni indikatori promjena. Pogodni su zbog toga što je njihova brojnost velika, slabo su pokretljivi, prikladne su veličine, lako ih je sakupiti i odrediti o kojoj je točno vrsti riječ. Slatkovodni puževi često se koriste kao indikatori zagađenja, u procjeni efekata kojeg imaju endokrini disruptori, u monitoringu teških metala, a pogodni su i za neurotoksikološka istraživanja. U neka područja unose se namjerno da bi se uzgajali za hranu ili pak koristili kao sredstva biološke kontrole. Nenamjerni unos također se dešava bilo putem trgovine, brodovima, balastnim vodama ili preko kanala. Obično takav nekontrolirani unos predstavlja problem jer mnoge vrste postaju invazivne te potiskuju one nativne. Drugi problem je taj što su neke vrste puževa vektori



bolesti te služe kao posrednici u razvoju nametnika na čovjeku ili životinjama (Strong i sur. 2008).

Sistematika mekušaca obuhvaća tri znanstvene discipline: klasifikaciju, taksonomiju i nomenklaturu (Ponder i Lindberg 2008). Zadnjih desetaka godina klasifikacija slatkovodnih puževa drastično se mijenjala (Thorp i Covich 2009). Promjene se dešavaju i u filogeniji koja se nekada zasnivala na morfologiji i anatomiji, paleontologiji te embriologiji i ontogenezi. Krajem 20. st. u filogeniju se uvode nove metode i tehnologije poput TEM i SEM mikroskopa, geometrijske morfometrije, uključuju se razne molekularne metode i računalne analize čime se postižu nova saznanja i dobivaju preciznija filogenetska stabla (Ponder i Lindberg 2008). Prema današnjoj klasifikaciji puževa postoji šest dobro podržanih klada: Patellogastropoda, Vetigastropoda, Cocculiniformia, Neritimorpha, Caenogastropoda i Heterobranchia (Bouchet i Rocroi 2005). U slatkim vodama dominiraju puževi iz klade Caenogastropoda i plućnjaci iz klade Heterobranchia (Strong i sur. 2008).

### **1.2.2. *Ancylus fluviatilis* O. F. Müller, 1774**

Riječna zdjelica, *Ancylus fluviatilis*, slatkovodni je puž koji taksonomski (<http://www.fauna-eu.org/>) spada u:

CARSTVO: Animalia

KOLJENO: Mollusca

RAZRED: Gastropoda

PODRAZRED: Pulmonata

RED: Basommatophora

PORODICA: Planorbidae

ROD: *Ancylus*

VRSTA: *Ancylus fluviatilis* O. F. Müller, 1774 – riječna zdjelica

*A. fluviatilis* (Slika 3) maleni je puž visine kućice 5 do 8 milimetara. Vrh kućice konusnog je oblika, usmjeren prema natrag te blago nagnut u desnu stranu. Gledajući ga odozgo djeluje tupo, a sa strane malo zašiljeno. Sama kućica je tanka i blago providna s dobro vidljivim linijama prirasta. Može biti žućkaste, crvenosmeđe ili blijedo smeđe boje. Skoro u cijelosti pokriva tijelo puža koje je sivkasto s crnim točkicama blizu glave. Ticala su

trokutastog oblika, a na njihovoj bazi smještene su oči. S desne strane tijela nalaze se dišni otvor i genitalna pora (Encyclopedia of Life 2014).



**Slika 3.** *Ancyclus fluviatilis* (preuzeto iz: <http://www.rhoen.quellen-grundwasser.de/en/fauna.html>).

Ova vrsta je reofilna te je kao takvu možemo pronaći u brzo tekućim rijekama gdje živi pričvršćena na kamenitu podlogu. Može nastaniti i litoral jezera u kojima prevladava visoka energija valova. Prilagođena je životu u hladnoj vodi u kojoj ima puno otopljenog kisika te ne podnosi dobro promjene u temperaturi ili kemijskom sastavu vode (Seddon i sur. 2012).

*A. fluviatilis* je herbivor koja se hrani perifitonom, a u prehrani najviše dominiraju dijatomeje, posebice rod *Gomphonema* (Calow 1973). Životni ciklus je godišnji s razmnožavanjem u proljeće nakon čega većina jedinki ugiba (Pfenninger i sur. 2003a). Jedna jedinka za života položi oko 50 jaja. Mortalitet je visok samo kad su jedinke male, a kasnije opada. Ispod kućice, između plašta i stopala, često se nalaze ličinke maločetinaša (Oligochaetae) i trzalaca (Chironomidae) koje su najvjerojatnije komenzali. Izvana kućicu nastanjuju različite alge, a gotovo uvijek prisutna je i *Vorticella*, cilijatni protozoa (Geldiay 1956).

Vrsta je široko rasprostranjena na području Europe, sjeverne i sjeverno-istočne Afrike, Saudijske Arabije, Jemena, Armenije i na području Kavkaza (Slika 4). Populacije su većinom malene i lokalizirane, a njihov trend je nepoznat. Europske populacije nisu pod ozbiljnijom prijetnjom, a afričke ne bilježe pad brojnosti unatoč zagađenju i degradaciji staništa te je vrsta ocijenjena kao najmanje zabrinjavajuća (LC) (Seddon i sur. 2012).

Dva recentna molekularno-genetska istraživanja temeljena na mitohondrijskim i jezgrinim DNA biljezima ukazuju da *A. fluviatilis* zapravo predstavlja kompleks četiri genetski i reproduktivno izolirane kriptične vrste. Pfenninger i suradnici (2003a) prvi su na temelju morfologije, ekologije, mitohondrijske i nuklearne DNA zaključili da je *Ancylus* zapravo kompleks kriptičnih vrsta te da su navedeni taksoni genetski i reproduktivno izolirani. To se razdvajanje prema molekularnom satu dogodilo u kasnom pliocenu (Albrecht i sur. 2006).

Seddon i suradnici (2012) za te četiri potencijalne vrste daju područje rasprostranjenja te stupanj ugroženosti:

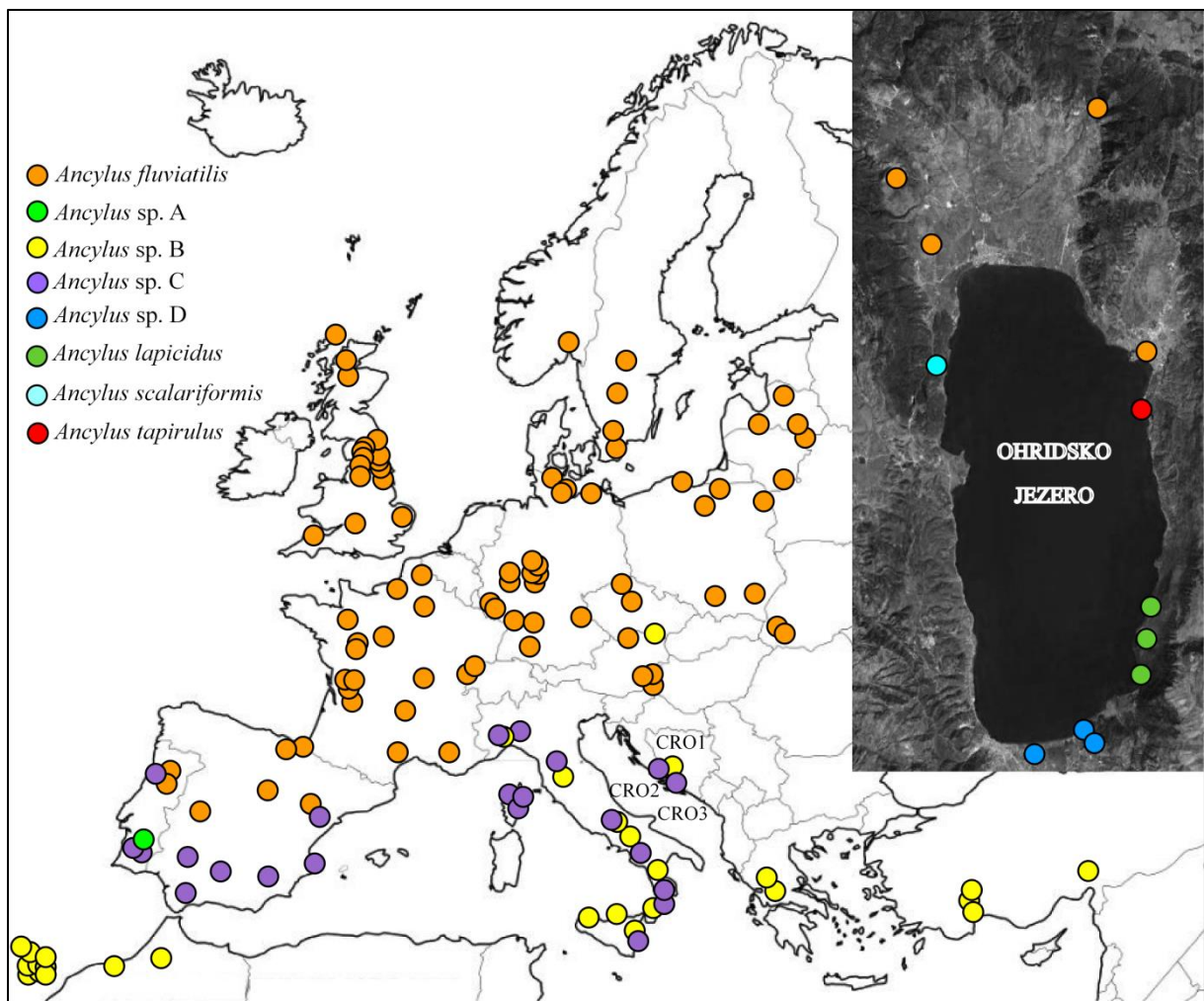
- *Ancylus fluviatilis (sensu stricto)* - živi na području sjeverne Europe, a na jugu se rasprostire sve do Španjolske, Francuske, sjeverne Italije i Slovenije. Populacije koje nastanjuju mediteransku zonu mogle bi doživjeti pad brojnosti kao rezultat klimatskih promjena i prekomjerne eksploatacije rijeka. Ova je vrsta kategorizirana kao najmanje zabrinjavajuća (LC).
- *Ancylus* sp. A - ograničen je na samo malo područje u južnom Portugalu prema čemu bi ova vrsta bila ugrožena (EN). Kako se točna rasprostranjenost nije do kraja utvrdila bolje je prepisati status nedovoljno poznate vrste (DD).
- *Ancylus* sp. B - rasprostranjen je na području Mediterana, od Kanarskih otoka, Maroka, Italije sve do Grčke i Turske. Njega bi mogli kategorizirati kao najmanje zabrinjavajuću vrstu (LC) zbog širokog raspona mediteranskom zonom no brojna staništa su pod pritiskom zbog iskorištavanja voda te su neke populacije lokalno ugrožene (EN).
- *Ancylus* sp. C - obitava na zapadu Mediterana, od Portugala i Španjolske do Italije. Isto kao i *Ancylus* sp B vrsta je najmanje zabrinjavajuća (LC), a neke populacije su iz istih razloga lokalno ugrožene (EN)

Glavna prijetnja svim populacijama je zagađenje vode. Afričke populacije dodatno ugrožava degradacija staništa i sedimentacija kao rezultat deforestacije. Pošto se radi o osjetljivoj vrsti buduća zagađenja i klimatske promjene imat će negativan odraz na njezinu brojnost. Mjere konzervacije još uvijek ne postoje. Potreban je daljnji rad na taksonomiji i populacijskom trendu ove vrste kao i rad na strategiji kojom bi se smanjilo zagađenje i deforestacija (Seddon i sur. 2012).

Prema literaturnim podacima *A. fluviatilis* je široko rasprostranjena vrsta u Hrvatskoj i prisutan je u brojnim tekućicama Jadranskog i Crnomorskog slijeva (Srkoč 2015).

U jezeru Ohrid pronađene su tri endemske vrste monofiletskog podrijetla: *Ancylus scalariformis*, *Ancylus lapicidus* i *Ancylus tapirulus*. Oni su nastali kao rezultat intralakuštričke specijacije u relativno kratkom vremenu. Pritoke koji se ulijevaju u jezero nastanjuje još jedan endemski, zasad formalno neopisani takson, *Ancylus* sp. D (Albrecht i sur. 2006).

Rasprostranjenost *Ancylus fluviatilis* kompleksa i ohridskih endemskih vrsta na području Europe, dijela Azije i Afrike prikazana je na Slici 4.



**Slika 4.** Karta rasprostranjenosti *Ancylus fluviatilis* kompleksa i ohridskih endemskih vrsta na temelju analiziranih sekvenci za *COI*, *16S rRNA* i *ITS* gen ili RFLP analize *COI* gena (prilagođeno prema Pfenninger i sur. 2003a, Albrecht i sur. 2006 i Cordellier i Pfenninger 2008).

### 1.3. Filogenija

Filogenija je znanstvena disciplina koja se bavi proučavanjem evolucijske prošlosti različitih taksonomskih kategorija koristeći se pri tom morfološkim, anatomskim, embriološkim, fiziološkim, genetskim, molekularnim, fosilnim i geografskim homologijama (Xiong 2006; Dowell 2008). Homologije su sličnosti između dva organizma koje su posljedice nasljeđivanja neke značajke od njihovog zajedničkog pretka. Ancenstralno karakterno stanje prisutno kod zajedničkog pretka koji se istražuje naziva se pleziomorfija dok je apomorfija izvedeno stanje koje nije prisutno kod zajedničkog pretka. Autapomorfija predstavlja izvedeno karakterno stanje specifično samo za jedan takson. Sinapomorfija je izvedeno karakterno stanje kojeg dijele dva ili više taksona kao rezultat nasljeđivanja od neposrednog zajedničkog pretka te se takvo stanje ne dijeli s nijednom drugom vrstom. Simpleziomorfija je ancenstralno karakterno stanje kojeg dijele dva ili više taksona kao rezultat nasljeđivanja od dalekog zajedničkog pretka te se takvo stanje dijeli s drugim vrstama koje su imale istog zajedničkog pretka. Ponekad sličnosti između taksona nisu rezultat nasljeđivanja od zajedničkog pretka nego se javljaju kao rezultat konvergentne, paralelne ili reverzne evolucije. Takve sličnosti nazivaju se homoplazije i one mogu zavarati o eventualnoj srodnosti taksona (Page i Holmes 1998; Xiong 2006).

U filogenetskim istraživanjima često se koriste fosilni ostaci iz kojih se dobivaju podaci o morfologiji predaka neke vrste te okvirno vrijeme divergencije. Ti ostaci imaju svoje nedostatke i ograničenja te kao takvi mogu dati krivu sliku o filogenetskim odnosima. Za neke vrste fosili ni ne postoje, a za vrste koje jesu očuvane fosilni zapis može biti fragmentiran ili limitiran u pogledu brojnosti ili geografske rasprostranjenosti (Xiong 2006). Danas su u filogenetskim analizama morfološke karakteristike u drugom planu, a prevladava proučavanje makromolekula, nukleinskih kiselina i proteina (Baxevanis i Oullette 2001). Svaka promjena u fenotipu rezultat je akumuliranih mutacija u genetskom materijalu zbog čega nam geni mogu poslužiti kao molekularni fosili (Xiong 2006). Oni geni koji potječu od zajedničkog pretka, imaju slične sekvence te mogu, ali i ne moraju imati istu funkciju nazivaju se homolognim genima. Homolozi mogu biti paralozni, ortolozi ili ksenolozi. Paralozni su homologne sekvence nastale genskom duplikacijom koji u različitim organizmima imaju različite funkcije. Ortolozi nastaju specijacijskim događajima te u različitim organizmima imaju istu ili sličnu funkciju. Horizontalnim transferom gena između dva organizma nastaju ksenolozi. Njihova funkcija je varijabilna, ovisno o promjeni koju gen doživi no obično bude slična (Baxevanis i Oullette 2001). Molekularni podaci otkrivaju puno više nego fosilni

zapisi, brojniji su, lakše ih je prikupiti i dalju bolje rezultate prilikom izrade filogenetskog stabla (Xiong 2006). Sredinom 20. st. razvitkom znanosti, novih molekularnih tehnika, te ubrzanim razvojem tehnologije i računala počela se javljati nova grana u filogeniji, molekularna filogenija (Dowell 2008).

### **1.3.1. Molekularna filogenija**

Sličnost bioloških funkcija i molekularnih mehanizama kod svih živih organizama ukazuje na činjenicu da su se vrste razvile od zajedničkog pretka. Molekularna filogenija proučava srodstvene odnose između i unutar pojedinih taksona na razini makromolekula, tj. DNA, RNA i proteina. Primjenjuje kombinaciju molekularnih i statističkih metoda kako bi zaključila kakvi su evolucijski odnosi između organizama ili gena (Dowell 2008). Bitno je naglasiti kako evolucija gena ne mora nužno korelirati s evolucijom vrste. Neki gen može evoluirati brže ili sporije od ostalih gena u genomu ili imati svoj vlastiti evolucijski put pogotovo ako je bio uključen u horizontalni transfer gena. Evolucija vrste rezultat je evolucije više gena u genomu. Ako se promatra filogenetsko stablo nekog gena tada grananje unutarnjeg čvora predstavlja duplikaciju gena, a kod stabla vrste grananje ukazuje na specijaciju. Ta se dva događaja mogu, ali i ne moraju podudarati (Xiong 2006).

Konstruiranje molekularno-filogenetskog stabla sastoji se od pet koraka (Xiong 2006):

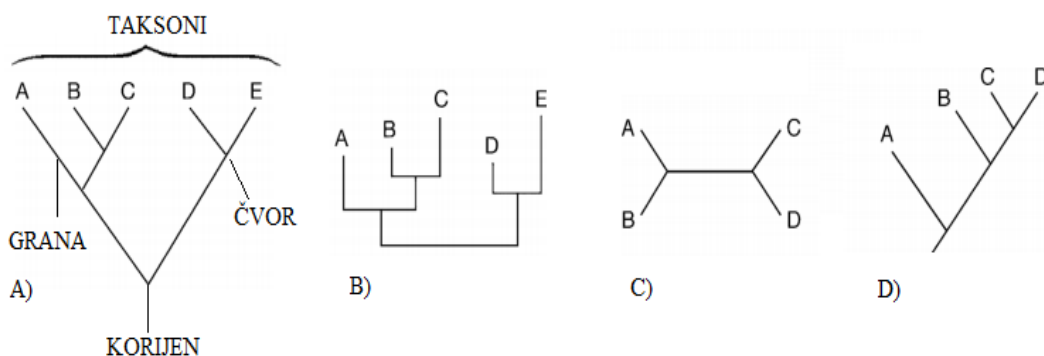
- Odabir prikladnog molekularnog biljega
- Višestruko sravnjivanje sekvenci
- Odabir evolucijskog modela
- Odabir metode za konstrukciju stabla
- Procjena pouzdanosti dobivenog stabla

Nisu svi geni ili makromolekule pogodne da budu molekularni biljezi niti su svi biljezi korisni za analizu određene grupe organizama (Patwardhan i sur. 2014). Odabir molekularnog biljega bitna je stvar jer ovisno o tome što želimo istražiti možemo koristiti nukleotidne ili proteinske sekvence. Za proučavanje blisko srodnih vrsta pogodnije su nukleotidne sekvence pošto one evoluiraju brže nego proteini. Ako pak istražujemo udaljenije grupe organizama bolje je koristiti proteinske sekvence ili sporo evoluirajuće nukleotidne sekvence poput ribosomske RNA (Xiong 2006). Visoko konzervirani molekularni biljezi korisni su za proučavanje filogenetskih odnosa na višim sistematskim razinama dok su za rješavanje filogenetskih odnosa na nižim sistematskim razinama korisni hipervarijabilni biljezi. U

istraživanjima najčešće se koristi nuklearna ribosomalna DNA (rDNA) i mitohondrijska DNA (mtDNA) (Hwang i Kim 1999). Kao molekularni biljezi u dosadašnjim istraživanjima najčešće su korišteni nuklearni ribosomalni geni (*16S rRNA*, *5S rRNA*, *28S rRNA*), mitohondrijski geni (citokrom oksidaza I, citokrom oksidaza II, mitohondrijski 12S, citokrom-b) ili kloroplastni geni (*rbcL*, *matK*, *ndhF*, *rpl16*) (Patwardhan i sur. 2014).

### 1.3.2. Filogenetsko stablo

Krajnji rezultat svake filogenetske analize jest filogenetsko stablo. Filogenetsko stablo grafički je prikaz evolucijskih odnosa između gena ili organizama (Slika 5). Svako se stablo sastoji do grana i čvorova koji mogu biti vanjski ili unutarnji. Čvorovi predstavljaju taskonomske jedinice (gen, jedinka, vrsta ili dr.). Vanjski čvorovi predstavljaju taksonomske jedinice koje se proučavaju, a unutarnji čvorovi predstavljaju hipotetske zajedničke pretke proučavanih taksonomskih jedinica. Na vrhovima vanjskih grana nalaze se proučavani taksoni dok unutarnje grane povezuju hipotetske pretke (Lemey i sur. 2009). Način grananja grana određuje topologiju stabla. Filogenetska stabla najčešće su bifurkalna što znači da od jednog pretka nastaju dvije linije potomaka. Filogenija s takvim bifurkalnim grananjem naziva se dihotomija. Ponekad od jednog pretka nastaje više potomaka što rezultira multifurkalnim grananjem. Takva se filogenija naziva politomija. Politomija može biti rezultat brze radijacije ili nerazriješene filogenije (Xiong 2006).



**Slika 5.** A) Dijelovi filogenetskog stabla i prikaz kladograma. B) Filogram. C) Neukorijenjeno stablo. D) Ukorijenjeno stablo (preuzeto i prilagođeno iz: Xiong 2006).

Filogenetsko stablo može biti ukorijenjeno ili neukorijenjeno (Slika 5 C i D). Kod neukorijenjenih stabala poznati su samo relativni odnosi između taksona no ne i njihov

zajednički predak i evolucijski put. Takvo stablo može poslužiti kada se uspoređuju evolucijski bliske grupe ili kada nas zanimaju samo odnosi među grupama. Kada se želi prikazati put kojim je evolucija tekla do proučavanih taksona tada stablo mora biti ukorijenjeno. Korijen predstavlja zadnjeg hipotetskog zajedničkog pretka svih taksona koji se nalaze na stablu i od njega kreće grananje (Kinene i sur. 2016). Ukorjenjivanje stabla jedan je od težih i ključnih koraka u filogenetskoj analizi (Boykin i sur. 2009). Postoji nekoliko metoda kojima se stablo ukorijenjuje poput upotrebe vanjske grupe, srednje točke, molekularnog sata ili Bayesian molekularnog sata. Najčešće se koristi vanjska grupa, taksonomska jedinica koja je blisko srodna s proučavanim taksonima, ne nužno sestrinska (Kinene i sur. 2016; Boykin i sur. 2009).

Filogenetsko stablo može biti prikazano kao filogram ili kladogram (Slika 5 A i B). Filogram je prikaz kod kojeg se evolucijska udaljenost odražava u duljini grana. Što je grana dulja to je više vremena prošlo od odvajanja od zajedničkog pretka i obrnuto. Kladogram ne sadrži informacije o evolucijskoj udaljenosti, kod njega su sve grane jednake duljine. Bitna je samo topologija stabla koja prikazuje relativne odnose između taksona (Xiong 2006). Vrijeme divergencije taksona može se odrediti pomoću molekularnog sata prema kojemu DNA molekule nakupljaju promjene konstantnom brzinom tijekom vremena (Zuckerandl i Pauling 1965). Ta brzina razlikuje se kod različitih vrsta organizama i ovisi o veličini populacije, generacijskom vremenu, veličini i temperaturi tijela organizma, metabolizmu, promjenama u funkciji proteina s vremenom, načinu života (osobito reprodukcije), učinku uskog grla i brojnim selektivnim pritiscima. Prema tome apsolutno točan molekularni sat ne postoji (Wilke i sur. 2009).

Proučavani taksoni mogu tvoriti monofiletsku, parafiletsku ili polifiletsku grupu. Monofiletska grupa ili kladij sastoji se od svih potomaka jednog zajedničkog pretka koji nije predak ni jednoj drugoj grupi izvan opisane. Svi su potomci naslijedili set jedinstvenih zajedničkih osobina pa je tako sinapomorfija vezana uz monofiliju. Parafiletska grupa uključuje zajedničkog pretka i samo neke njegove potomke, a druge isključuje. Temelji se na sinpleziomorfiji i zato ne uključuje taksona kod kojih se javlja autapomorfija. Polifiletsku grupu sačinjava skupina taksona koji nisu porijeklom od jednog zajedničkog pretka već od više njih. Taksoni su grupirani zajedno na temelju nekih zajedničkih karakteristika koje su rezultat homoplazije, a ne nasljeđivanja (Page i Holmes 1998; Xiong 2006; Dowell 2008).



### 1.3.3. Metode za konstrukciju filogenetskog stabla

Metode za konstrukciju filogenetskog stabla mogu se podijeliti u dvije glavne kategorije: metode bazirane na matrici udaljenosti i metode bazirane na stanju karaktera. Metode bazirane na matrici udaljenosti izračunavaju set udaljenosti između parova sekvenci i koriste te fiksne udaljenosti prilikom izrade stabla. U tu grupu spada UPGMA metoda, metoda susjednog sparivanja (NJ, eng. neighbor joining), generaliziranog susjednog sparivanja, minimalne evolucije (ME, eng. minimum evolution) te Fitch-Margoliash metoda (FM). Metode bazirane na stanju karaktera proučavaju nukleotide i aminokiseline (stanja) na pojedinoj poziciji u sravnjanju (značajke) te pojavu insercija i delecija. Tu spada metoda najveće štedljivosti (MP, eng. maximum parsimony), metoda najveće vjerojatnosti (ML, eng. maximum likelihood) i Bayesian metoda. Prema primijenjenoj strategiji za konstrukciju stabla metode se dijele na one koje koriste strategiju iscrpnog pretraživanja (eng. exhaustive research) (FM, MP i ML) ili strategiju postupnog klasteriranja (eng. stepwise clustering) (UPGMA i NJ) (Baxevanis i Oullette 2001; Xiong 2006).

Najčešće se koriste četiri metode (Baxevanis i Oullette 2001; Nei i Kumar 2000; Xiong 2006):

- Metoda susjednog sparivanja (Saitou i Nei 1987) – temelji se na stanjima karaktera i koristi strategiju postupnog klasteriranja. Počinje od pretpostavke o grmolikom stablu bez unutarnjih grana te se postepeno nalaze "susjedni parovi" koji su zapravo parovi taksonomskih jedinica povezani jednim unutarnjim čvorom. Algoritam u konačnici spaja taksonomske jedinice koje daju najkraće stablo. Dobiveno stablo je neukorijenjeno, a ako se želi ukorijeniti tada se vanjska grupa bira proizvoljno, ovisno o grupi organizama koji se istražuju. Prednost ove metode je što je računalno brza i može obraditi veliku količinu podataka no nedostatak je taj što često ne daje najbolje stablo.
- Metoda najveće štedljivosti (Swofford 2001) - temelji se na stanjima karaktera i koristi strategiju iscrpnog pretraživanja. Bazira se na principu Okamove oštrice prema kojemu se najjednostavnija hipoteza uzima kao najbolja. Prema tom principu nastoji pronaći filogenetsko stablo za čiju je topologiju potreban najmanji mogući broj promjena karaktera. Takvo stablo smanjuje broj homoplazijskih događaja.
- Metoda najveće vjerojatnosti (Felsenstein 1973, 1981) - temelji se na stanjima karaktera i koristi strategiju iscrpnog pretraživanja. Proračunava vjerojatnost

očekivanja svake moguće nukleotidne ili aminokiselinske pozicije u aneutralnom čvoru te iz tih vjerojatnosti rekonstruira vjerojatnost strukture stabala. Ova metoda računalno je jako zahtjevna.

- Bayesian metoda (Mau i sur. 1999) – relativno nova metoda koja se danas često koristi. Temelji se na spoznaji o naknadnim vjerojatnostima (eng. posterior probabilities), vjerojatnostima koje su procijenjene na osnovi nekog modela koji se naziva prethodno očekivanje (eng. prior expectation). Prednost ove metode nad ostalima je ta što algoritam traži grupe najboljih stabala, a ne jedno najbolje stablo. Također tijekom analize između više neovisnih potraga za najboljom grupom stabala postoji mogućnost izmjene informacija.

Konstrukcija filogenetskog stabla komplicirani je proces u kojemu su točnost, pouzdanost i računalna brzina bitni faktori. Ni jedna metoda neće dati točno stablo već najbolje moguće na osnovu unesenih podataka i u skladu sa svojim ograničenjima. Preporuka je da se koriste najmanje dvije metode za bilo kakvu filogenetsku analizu kako bi se provjerila dosljednost dobivenih rezultata (Xiong 2006).

#### **1.3.4. Filogenetske mreže**

Ranije navedene tradicionalne filogenetske metode dobre su za rješavanje interspecifičnih evolucijskih odnosa koji su hijerarhijski što znači da iz jedne ancestralne vrste nastaju dvije nove vrste. Takvi odnosi rezultat su dugotrajne reproduktivne izolacije i razdvajanja populacija. Tijekom tog dugog vremena mutacije u kombinaciji s divergencijom populacija dovode do fiksacije određenih alela i nepreklapajućih “zaliha” gena. Problem nastaje kada se tradicionalnim metodama pokušavaju riješiti intraspecifični evolucijski odnosi koji nisu hijerarhijski zato što su rezultat seksualne reprodukcije, malog broja relativno nedavnih mutacija te čestih rekombinacija. Tradicionalne metode zakazuju na razini populacija jer ne uzimaju u obzir nekoliko fenomena koji se ne uklapaju u njihove pretpostavke. Ti fenomeni intraspecifičnog seta podataka su nizak stupanj različitosti, odnosno mali broj značajki za filogenetske analize što smanjuje statističku snagu tradicionalnih metoda, prisutnost ancestralnih haplotipova koji koegzistiraju s haplotipovima koji su iz njih nastali, pojava stvarne politomije, prisutnost retikulacije i veliki set podataka koji obuhvaća veliki broj populacija i više predstavnika za svaku populaciju. Zbog ovih razloga filogenetske mreže bolje su za rješavanje intraspecifičnih odnosa od filogenetskih stabla. Prilikom rekonstrukcije filogenetske mreže uzimaju se u obzir frekvencije haplotipova

te njihova geografska distribucija. Upotrebom mreže haplotipova izbjegava se prisilno uklapanje podataka u dihotomsku strukturu te se dobiva uvid u izumrle aneutralne ili neuzorkovane haplotipove. Intraspecifična filogenija primjenjuje se za otkrivanje rekombinacija, razgraničavanje vrsta, zaključivanje o načinima specijacije te u epidemiološkim studijama (Posada i Crandall 2001).

#### **1.4. Mitohondrijska DNA**

Mitohondrijska DNA smještena je unutar matriksa mitohondrija, poluautonomnog organela koji se nalazi unutar svake eukariotske stanice. Oblikom je to kružna dvolančana molekula osim u nekih žarnjaka kod kojih je linearna. Veličine je 14 000 do 17 000 parova baza, no može sadržavati sve do 40 000 parova baza. Unatoč takvim varijacijama u veličini, varijacije u sastavu gena vrlo su malene. MtDNA sadrži 36 ili 37 gena koji kodiraju za 2 ribosomalne RNA, 22 molekule tRNA te 12 ili 13 molekula proteina. Uz ovaj kodirajući dio postoji i nekodirajući dio molekule, tzv. kontrolna regija ili D-petlja. Kontrolna regija varijabilne je dužine, sadrži tandemska ponavljanja te je bogata bazama adenina i timina. Važna je jer sadrži elemente koji iniciraju i reguliraju replikaciju i transkripciju mitohondrijske DNA (Hwang i Kim 1999).

Za istraživanja na nivou porodice, roda, vrste ili populacije koriste se geni koji kodiraju za proteine kao i geni za *12* i *16S rRNA*. DNA sekvence gena koji kodiraju za proteine često se koriste za rješavanje filogenetskih odnosa na razini vrste ili populacije. Aminokiselinske sekvence zbog toga što su konzerviranije od nukleotidnih služe za istraživanje viših taksonomskih jedinica, najčešće porodica. Kontrolna regija također može služiti kao molekularni biljeg, a pošto je hipervarijabilna koristi se za istraživanja na nivou vrsta, podvrsta i populacija (Hwang i Kim 1999).

Mitohondrijska DNA nakuplja mutacije i evoluiraju brže od jezgrine DNA. Nasljeđuje se samo po majčinskoj liniji čime je efektivna veličina populacije manja te ne dolazi do rekombinacije DNA tijekom spolnog razmnožavanja. Genetička struktura mtDNA je jednostavna, uglavnom bez introna, transpozona, pseudogena i ponavljajuće DNA. Uz to lako se izolira i dolazi u velikom broju kopija. Sve te karakteristike čine mitohondrijsku DNA pogodnom za različite analize (Avice i sur. 1987).

Preferencijalno korištenje mitohondrijskih DNA biljega u filogenetskim istraživanjima posljedica je razvoja raznih metoda za njezinu izolaciju, upotrebi restrikcijskih enzima kako

bi se otkrile nukleotidne razlike, razvoju PCR metoda i primjenjivosti univerzalnih početnica za umnažanje DNA (Patwardhan i sur. 2014).

Dijelovi mitohondrijske DNA mogu se ugraditi u genom jezgre čime nastaju nuklearne mitohondrijske sekvence (eng. numts). Nakon ugrađivanja tih sekvenci one postaju pseudogeni te brzina njihove evolucije postaje slična brzini evolucije okolnih jezgrinih sekvenci. Prilikom umnažanja mtDNA može doći i do umnažanja nuklearnih mitohondrijskih sekvenci što rezultira u konačnici pogrešnim zaključcima o filogenetskim odnosima. Kako bi se to izbjeglo preporučljivo je koristiti pročišćenu mtDNA, PCR amplifikaciju provoditi duže vremena ili koristiti tkivo koje ima više mtDNA naspram nuklearne DNA (Bensasson i sur. 2001).

#### **1.4.1. DNA barkodiranje**

Metodologija DNA barkodiranja predložena je 2003. godine kao univerzalni sistem za determinaciju biološkog materijala. Za životinje je odabran 5' kraj mitohondrijskog gena za podjedinicu jedan citokrom c oksidaze (*COI*) dužine oko 650 pb (Hebert i sur. 2003a,b).

Interspecifične razlike između *COI* sekvenci kod dosad istraživanih vrsta veće su od 2 %, s izuzetkom žarnjaka, a između pripadnika iste vrste manje od 2 % zbog čega je ovaj sistem identifikacije životinjskih vrsta na temelju *COI* gena vrlo učinkovit (Herbert i sur. 2003b).

DNA barkodiranje uspješno rješava nedoumice kada se na temelju morfoloških karakteristika jedinke ne može odrediti o kojoj je vrsti riječ bilo zbog fenotipske plastičnosti ili pojave kriptične vrste (Hajibabaei i sur. 2007).

DNA barkodiranje nije zamjena za taksonomska i molekularno-filogenetička istraživanja te istraživanja populacijske genetike, naprotiv, ono ih nadopunjuje. U taksonomiji barkodiranje može služiti za rutinsku identifikaciju uzoraka, a može i ukazati na pojavu atipičnog uzorka prilikom taksonomskog istraživanja te ga označiti za daljnje detaljnije analize. DNA barkodiranje u filogenetskim istraživanjima može poslužiti kao polazna točka za optimalan izbor taksona te barkod sekvence mogu biti uključene u filogenetsku analizu. U istraživanjima populacijske genetike DNA barkodiranje olakšava komparativne analize raznolikosti populacija kod mnogih vrsta (Hajibabaei i sur. 2007).

Međunarodna inicijativa "Barkod života" ("Barcode of Life"), pokrenuta 2004. godine, ima za krajnji cilj pomoću DNA barkodova opisati sve vrste koje postoje na Zemlji. U Hrvatskoj je još uvijek nepoznanica koliki je ukupan broj životinjskih vrsta koje dolaze na našem prostoru, a pošto je Hrvatska jedna od vrućih točaka biološke raznolikosti inventarizacija svih vrsta ima visoki prioritet (<http://www.hpm.hr/Znanost/CroBOL%20-%20Hrvatska%20inicijativa%20za%20barkodiranje%20života>).

## 1.5. Filogeografija

Filogeografija je poddisciplina biogeografije koja istražuje principe i procese koji upravljaju geografskom raspodjelom genealoških linija između usko srodnih vrsta, a osobito unutar pojedine vrste. Ona je poveznica između mikroevolucijskih i makroevolucijskih disciplina poput populacijske genetike, demografije, etologije, historijske geografije, paleontologije i molekularne genetike (Avice 2000). Prilikom istraživanja animalne filogeografije najviše se koristiti mitohondrijska DNA dok kod istraživanja filogeografije flore dominira korištenje kloroplastne DNA. Što se više različitih sekvenci koristi, poput nuklearne, citoplazmatske, spolno vezane, konzervirane i neutralne, to su bolji i pouzdaniji rezultati o evolucijskoj povijesti neke vrste (Emerson i Hewitt 2005).

John C. Avice je 1987. godine postavio tri osnovne hipoteze filogeografije (Avice 1987):

- "Većina vrsta sastoji se od geografskih populacija čiji članovi zauzimaju različite grane na intraspecifičnom filogenetskom stablu."
- "Povijesnu pozadinu vrsta s ograničenom ili plitkom filogeografskom strukturom čine uvjeti koji su pogodovali rasprostranjivanju te naseljavanje regija u kojima nije bilo čvrstih, dugotrajnih zapreka toku gena"
- "Monofiletičke grupe izdvojene velikim filogenetskim jazovima obično nastaju zbog dugotrajne vanjske (zoogeografske) barijere toku gena."

Komparativna filogeografija pokušava razjasniti utjecaj prošlih događaja na Zemlji na sadašnji raspored bioraznolikosti uspoređujući povijesne obrasce protoka gena i divergencije između vrsta koje istovremeno obitavaju na istom prostoru u isto vrijeme (Hickerson i sur. 2009). Također proučava povijest i geografiju nekog prostora te analizira kakav to efekt ima na strukturu zajednice organizama kako na lokalnom tako i na regionalnom nivou (Bermingham i Moritz 1998). Glavni izazov komparativne filogeografije jest razvoj

analitičkih alata koji bi mogli procijeniti kolika je prostorna i vremenska podudarnost filogeografskih uzoraka temeljem proučavanja više vrsta (Hickerson i sur. 2009).

## 2. CILJEVI

---

- Utvrditi koje su kriptične vrste *Ancylus fluviatilis sensu lato* prisutne u Hrvatskoj.
- Utvrditi filogeografski uzorak vrste *Ancylus fluviatilis sensu lato* u Hrvatskoj te njegova usporedba s filogeografskim uzorcima dosad analiziranih slatkovodnih vrsta na istom području.
- Utvrditi molekularno-filogenetske odnose između populacija vrste *Ancylus fluviatilis sensu lato* analizom nukleotidnih sekvenci mitohondrijskih gena za *COI* i *16S rRNA*.
- Utvrditi genetske udaljenosti između različitih populacija vrste *Ancylus fluviatilis sensu lato*.
- Metodom molekularnog datiranja procijeniti vremena međusobnog odvajanja populacija vrste *Ancylus fluviatilis sensu lato* u evolucijskoj prošlosti.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Životinjski materijal

Molekularno-filogenetičke analize provedene su na uzorcima vrste *Ancylus fluviatilis*. Ukupno su analizirane 32 jedinke iz 10 različitih populacija sakupljenih tijekom 2014., 2015. i 2016. godine (Tablica 1, Slika 6). Svakoj jedinki izolirano je tkivo stopala te je ono pohranjeno u epruvetu s 96%-tnim etanolom na temperaturi od +4 °C. Pojedinom uzorku dodijeljena je jedinstvena oznaka u vidu slova i broja. Polovica tkiva korištena je u analizi, a druga polovica pohranjena je na temperaturi od -20 °C u "Zbirku tkiva za genetičke analize" Hrvatskog prirodoslovnog muzeja.

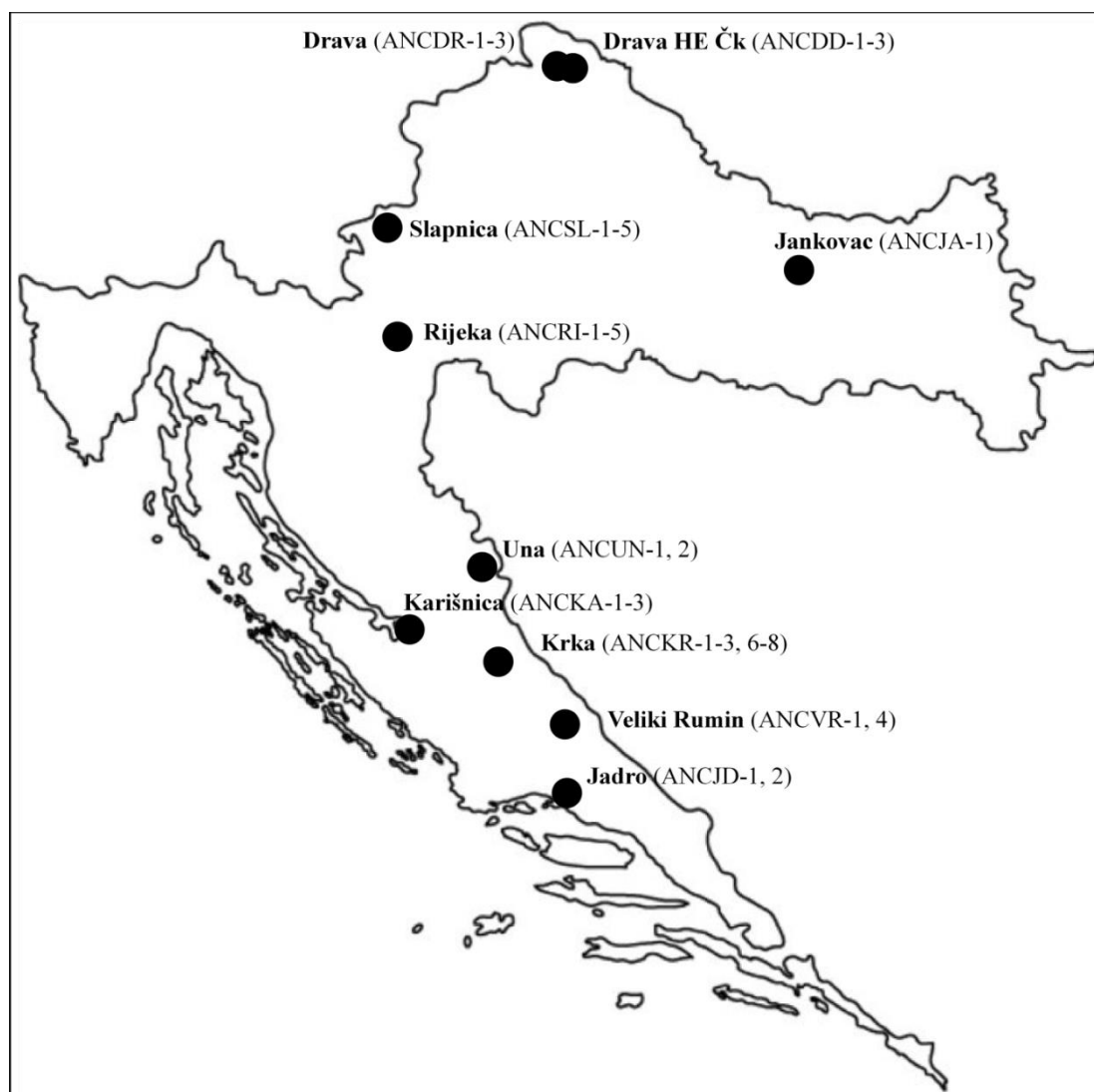
**Tablica 1.** Popis populacija i uzoraka vrste *Ancylus fluviatilis* koji su korišteni u istraživanju.

	VODOTOK	MJESTO	GEOGRAFSKE KOORDINATE		DNA KOD
1	Una	Donja Suvaja (izvor Une), Lika	44°24'9,7" N	16°6'47,2" E	ANCUN-1
					ANCUN-2
2	Jankovac	Papuk, Slavonija	45°31'6.96" N	17°54'32,3" E	ANCJA-1
3	Veliki Rumin	Bitelić, Sinj, sjeverna Dalmacija	43°46'47,66"N	16°39'25,92" E	ANCVR-1
					ANCVR-4
4	Slapnica	Medven Draga, Žumberak	45°42'44,2" N	15°30'21,2" E	ANCSL-1
					ANCSL-2
					ANCSL-3
					ANCSL-4
					ANCSL-5
5	Rijeka	Brebarnica, Kordun	45°18'11,63" N	15°36'30,73" E	ANCRI-1
					ANCRI-2
					ANCRI-3
					ANCRI-4
					ANCRI-5
6	Krka	Knin, sjeverna Dalmacija	44°2'28,02" N	16°14'13,40" E	ANCKR-1
					ANCKR-2
					ANCKR-3
					ANCKR-6
					ANCKR-7
					ANCKR-8
7	Karišnica	Karin, Dalmacija	44°9'23,36" N	15°37'31,90" E	ANCKA-1
					ANCKA-2
					ANCKA-3



**Nastavak Tablice 1.**

8	Jadro	Solun, Dalmacija	43°32'26,05" N	16°59'51,61" E	ANCJD-1
					ANCJD-2
9	Drava HE Čk	Čakovec, Međimurje	46°18'47,39" N	16°30'27,00" E	ANCDD-1
					ANCDD-2
					ANCDD-3
10	Drava	Gornji Kuršanec, Međimurje	46°19'19,8" N	16°21'36,3" E	ANCDR-1
					ANCDR-2
					ANCDR-3



**Slika 6.** Karta s označenim lokalitetima na kojima je provedeno skupljanje uzoraka.

### 3.1.2. Popis korištenih kemikalija

- 1 X GoTaq pufer (Promega)
- dNTP mixture (10mM) (Biobasic)
- Taq DNA polimeraza (Promega)
- agaroz: SeaKem LE agarose (Biozym)
- etidijev bromid (EtBr) (Amersham)
- TBE pufer (0.089M Tris-HCl, 0.098 borna kiselina, 2 mM EDTA, pH 8.4)
- DNA standard za duljinu odsječaka DNA: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, ready-to-use (Thermo Fischer Scientific)
- DNA standard za duljinu odsječaka DNA: GeneRuler™ 100 pb Plus DNA Ladder (Thermo Fischer Scientific)
- pufer za nanošenje uzoraka na gel: Gel Loading Miniprep Kit (Sigma-Aldrich)

### 3.1.3. Kit za izolaciju DNA

- GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich)

### 3.1.4. Oligonukleotidne početnice

Za umnažanje mitohondrijskog gena *COI* korištene su univerzalne početnice LCO1490 i HCO2918 (Folmer i sur. 1994) koje se koriste i za umnažanje DNA barkod regije, a za umnažanje *16S rRNA* korištene su LR-N-13398 i LR-J-12887 univerzalne početnice (Simon i sur. 1994) (Tablica 2).

**Tablica 2.** Početnice korištene za amplifikaciju gena *COI* i *16S rRNA*.

GEN	IME POČETNICE	SEKVENCA POČETNICE (5' → 3')	T <sub>m</sub> / °C	LITERATURA
<i>COI</i>	LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	55.4	Folmer i sur. 1994
	HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA	57.3	
<i>16S rRNA</i>	LR-N-13398	CGCCTGTTTATCAAAAACAT	52.3	Simon i sur. 1994
	LR-J-12887	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT	64	

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Izolacija genomske DNA

Ukupna genomska DNA izolirana je iz tkiva stopala 32 jedinke puža korištenjem GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) prema uputama proizvođača te je eluirana u 100 µL elucijskog pufera. Količina i kvaliteta izolirane DNA provjerena je elektroforezom na gelu.

### 3.2.2. PCR – lančana reakcija polimerazom

Lančana reakcija polimerazom je molekularno-biološka tehnika koja omogućava umnožavanje određene regije DNA lanca u *in vitro* uvjetima. Reakcijska smjesa podvrgava se cikličkim ponavljanjima grijanja i hlađenja, a svakim novim ciklusom količina željenog produkta se eksponencijalno povećava (Saiki i sur. 1988).

Reakcijska smjesa ukupnog volumena 25 µL sadržava je 5 µL GoTaq® reakcijskog pufera, 0,5 µL dNTP-ova, 1 µL uzvodne početnice, 1 µL nizvodne početnice, 0,125 µL *Taq* DNA polimeraze, 1-5 µL eluata te je ostatak volumena do 25 µL nadopunjen destiliranom vodom. Prilikom svake reakcije korištena je i negativna kontrola kao provjera potencijalne kontaminacije pojedinih kemikalija ili pribora zbog čega u tu reakcijsku smjesu nije dodavan eluat već u istoj količini destilirana voda.

PCR reakcija odvijala se u 35 ciklusa, a temperaturni koraci i vrijeme trajanja prikazani su u Tablici 3.

**Tablica 3.** PCR uvjeti za amplifikaciju *COI* i *16S rRNA* gena.

KORACI PCR REAKCIJE	TEMPERATURA / °C	TRAJANJE (min)
Preddenaturacija	95	2:00
Denaturacija	95	0:30
Prijanjanje početnica	50	0:30
Produljenje lanca DNA	72	1:30
Finalno produljenje lanca DNA	72	7:00
Hlađenje	4	∞

### 3.2.3. Elektroforeza DNA u gelu agaroze

Gel-elektroforeza je metoda razdvajanja molekula DNA, RNA ili proteina koristeći električno polje i gel agarozu. Kako je većina bioloških makromolekula električki nabijena, u električnom polju one se gibaju prema anodi (+) ako su negativnog naboja ili prema katodi (-) ako su pozitivnog naboja. DNA molekula negativno je nabijena zbog fosfata stoga putuje prema pozitivnoj anodi. Na njezinu pokretljivost u gelu utječe molekularna masa, konformacija, koncentracija agaroze u gelu, sastav pufera za elektroforezu, jačina i smjer električnog polja te prisutnost interkalirajućih boja.

Provjera uspješnosti izolacije genomske DNA, PCR reakcije i veličine dobivenih fragmenata provjerena je elektroforezom na 1 %-tnom gelu agaroze pripremljenom otapanjem 0,5 g agaroze u 50 mL TBA pufera uz dodatak 50  $\mu$ L etidij bromida koncentracije 0,5  $\mu$ g/mL. Etidij bromid je boja koja ima karakteristiku da interkalira između dva lanca DNA gdje se fiksira snažnim vezama i samim time mijenja fizičke karakteristike molekule. Kada je izložen UV svjetlosti fluorescira narančastom bojom što omogućuje vizualizaciju fragmenata DNA.

Najprije se provjeravala uspješnost izolacije genomske DNA prilikom čega se na gel nanosilo 5  $\mu$ L DNA pojedinog uzorka prethodno pomješanog s 1  $\mu$ L pufera za nanošenje uzoraka na gel radi praćenja tijekom elektroforeze. Za provjeru uspješnosti PCR reakcije također se na gel nanosilo 5  $\mu$ L pojedinog uzorka. U oba slučaja elektroforeza se provodila u 1 X TBE puferu pri 110 V, u trajanju 30 od minuta. Nakon toga sljedila je vizualizacije gela na UV transiluminatoru te njegovo fotografiranje. Veličina dobivenih fragmenata genomske DNA određivana je pomoću standarda za duljinu odsječaka DNA: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, ready-to-use (Thermo Fischer Scientific), a PCR produkata pomoću standarda za duljinu odsječaka DNA: GeneRuler™ 100 pb Plus DNA Ladder (Thermo Fischer Scientific).

### 3.2.4. Pročišćavanje i sekvenciranje

U komercijalni servis MacroGen Inc. (Amsterdam, Nizozemska) poslana su ukupno 43 PCR produkta na pročišćavanje i sekvenciranje zajedno s početnicama koje su se koristile prilikom amplifikacije gena, LCO-1490 i LR-N-13398. Od toga 32 PCR produkta bili su za *COI* gen, a 11 za *16S rRNA* gen. Svakom PCR produktu prije slanja dodijeljena je jedinstvena oznaka. Rezultati analize učitani su s MacroGenovih korisničkih stranica.

### 3.2.5. Računalne analize nukleotidnih sekvenci

#### 3.2.5.1. Uređivanje i sravnjivanje nukleotidnih sekvenci

Sve eksperimentalno dobivene nukleotidne sekvence najprije su provjerene u BLAST-u (eng. *Basic Local Alignment Tool*) (Altschul i sur. 1999), programu za lokalno sravnjenje. BLAST uspoređuje eksperimentalno dobivenu sekvencu s već postojećim sekvencama dostupnima u bazi NCBI (National Center for Biotechnology Information). Na taj se način provjerava autentičnost dobivenih sekvenci, tj. utvrđuje se pripadaju li one vrsti *Ancylus fluviatilis*.

Osim eksperimentalno dobivenih sekvenci, u molekularno-filogenetskoj analizi korištene su i sve homologne sekvence vrste *Ancylus fluviatilis* dostupne u banci gena ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Ukupno su dostupne 73 sekvence za *COI* gen (Pfenninger i sur. 2003a; Albrecht i sur. 2004; Albrecht i sur. 2006; Walther i sur. 2006; Corellier i Pfenninger 2008) i 150 sekvenci za *16S rRNA* gen (Pfenninger i Bugert 2001; Pfenninger i sur. 2003a; Jørgensen i sur. 2004; Albrecht i sur. 2006; Corellier i Pfenninger 2008; Klusmann-Kolb i sur. 2008). Kao vanjske grupe korištene su sekvence vrsta *Planorbarius corneus*, *Planorbis planorbis* i *Ferrissia fragilis* koje pripadaju porodici Planorbidae, isto kao i *Ancylus fluviatilis* (Tablica 4 i 5).

**Tablica 4.** Popis ranije objavljenih sekvenci za *COI* gen korištenih u molekularno-filogenetskim analizama s pristupnim brojem iz banke gena i skraćenim originalnim nazivom (Pfenninger i sur. 2003a; Albrecht i sur. 2004; Albrecht i sur. 2006; Walther i sur. 2006; Corellier i Pfenninger 2008).

	PRISTUPNI BROJ	IME SEKVENCE		PRISTUPNI BROJ	IME SEKVENCE		PRISTUPNI BROJ	IME SEKVENCE
1	AY350509	Anc sp H2	12	AY350520	Anc sp H28	23	DQ301838	Anc sp 518
2	AY350510	Anc sp H5	13	AY350521	Anc sp H56	24	DQ301840	Anc sp 519
3	AY350511	Anc sp H6	14	AY350522	Anc sp H36	25	DQ301835	Anc sp 520
4	AY350512	Anc sp H15	15	AY350523	Anc sp H39	26	DQ301841	Anc sp 521
5	AY350513	Anc sp H24	16	DQ301830	Anc sp 511	27	DQ301825	Anc sca 524
6	AY350515	Anc sp H23	17	DQ301834	Anc sp 512	28	DQ301826	Anc sca 525
7	AY350515	Anc sp H22	18	DQ301833	Anc sp 513	29	DQ301839	Anc sca 526
8	AY350516	Anc sp H41	19	DQ301831	Anc sp 514	30	DQ301837	Anc tap 523
9	AY350517	Anc sp H34	20	DQ301821	Anc sp 515	31	DQ301822	Anc lap 527
10	AY350518	Anc sp H32	21	DQ301820	Anc sp 516	32	DQ301823	Anc lap 528
11	AY350519	Anc sp H30	22	DQ301832	Anc sp 517	33	DQ301836	Anc lap 529

**Nastavak Tablice 4.**

34	DQ301827	Anc lap 530	48	EU376500	Anc fl H6b	62	EU376514	Anc fl H83
35	DQ301828	Anc lap 531	49	EU376501	Anc fl H6c	63	EU376515	Anc fl H84
36	DQ301824	Anc lap 532	50	EU376502	Anc fl H5a	64	EU376516	Anc fl H85
37	DQ301829	Anc lap 532	51	EU376503	Anc fl H5b	65	EU376517	Anc fl H88
38	EU376490	Anc fl H65	52	EU376504	Anc fl H15	66	EU376518	Anc fl H6a
39	EU376491	Anc fl H67c	53	EU376505	Anc fl H72	67	EU376519	Anc fl H86
40	EU376492	Anc fl H1a	54	EU376506	Anc fl H75	68	EU376520	Anc fl H87
41	EU376493	Anc fl H1b	55	EU376507	Anc fl H76	69	EU376521	Anc fl H67b
42	EU376494	Anc fl H19	56	EU376508	Anc fl H77	70	EU376522	Anc fl H67a
43	EU376495	Anc fl H69b	57	EU376509	Anc fl H78	71	AY577506	Anc fl 1
44	EU376496	Anc fl H69a	58	EU376510	Anc fl H79	72	AY282582	Anc fl 2
45	EU376497	Anc fl H70a	59	EU376511	Anc fl H80	73	DQ328270	Anc fl 3
46	EU376498	Anc fl H70b	60	EU376512	Anc fl H81	74	DQ452032	Ferfra
47	EU376499	Anc fl H6d	61	EU376513	Anc fl H82	75	AY350524	Plan corn

**Tablica 5.** Popis ranije objavljenih sekvenci za *16S rRNA* gen korištenih u molekularno-filogenetskim analizama s pristupnim brojem iz banke gena i skraćenim originalnim nazivom (Pfenninger i Bugert 2001; Pfenninger i sur. 2003a; Jørgensen i sur. 2004; Albrecht i sur. 2006; Coredlier i Pfenninger 2008; Klusmann-Kolb i sur. 2008).

	<b>PRISTUPNI BROJ</b>	<b>IME SEKVENCE</b>		<b>PRISTUPNI BROJ</b>	<b>IME SEKVENCE</b>		<b>PRISTUPNI BROJ</b>	<b>IME SEKVENCE</b>
1	AY238703	Anc sp H1	22	AY238724	Anc sp H22	43	AY238745	Anc sp H43
2	AY238704	Anc sp H2	23	AY238725	Anc sp H23	44	AY238746	Anc sp H44
3	AY238705	Anc sp H3	24	AY238726	Anc sp H24	45	AY238747	Anc sp H45
4	AY238706	Anc sp H4	25	AY238727	Anc sp H25	46	AY238748	Anc sp H46
5	AY238707	Anc sp H5	26	AY238728	Anc sp H26	47	AY238749	Anc sp H47
6	AY238708	Anc sp H6	27	AY238729	Anc sp H27	48	AY238750	Anc sp H49
7	AY238709	Anc sp H7	28	AY238730	Anc sp H28	49	AY238751	Anc sp H50
8	AY238710	Anc sp H8	29	AY238731	Anc sp H29	50	AY238752	Anc sp H51
9	AY238711	Anc sp H9	30	AY238732	Anc sp H30	52	AY238754	Anc sp H54
10	AY238712	Anc sp H10	31	AY238733	Anc sp H31	53	AY238755	Anc sp H55
11	AY238713	Anc sp H11	32	AY238734	Anc sp H32	54	AY238756	Anc sp H56
12	AY238714	Anc sp H12	33	AY238735	Anc sp H33	55	AY238757	Anc sp H57
13	AY238715	Anc sp H13	34	AY238736	Anc sp H34	56	AY350526	Anc sp E1.1
14	AY238716	Anc sp H14	35	AY238737	Anc sp H35	57	AY350527	Anc sp E1.2
15	AY238717	Anc sp H15	36	AY238738	Anc sp H36	58	AY350528	Anc sp E1.3
16	AY238718	Anc sp H16	37	AY238739	Anc sp H37	59	AY350529	Anc sp E1.4
17	AY238719	Anc sp H17	38	AY238740	Anc sp H38	60	AY350530	Anc sp E3.1
18	AY238720	Anc sp H18	39	AY238741	Anc sp H39	61	AY350531	Anc sp E3.2
19	AY238721	Anc sp H19	40	AY238742	Anc sp H40	62	AY350532	Anc sp E3.3
20	AY238722	Anc sp H20	41	AY238743	Anc sp H41	63	AY350533	Anc sp E3.4
21	AY238723	Anc sp H21	42	AY238744	Anc sp H42	64	AY350534	Anc sp E3.5

**Nastavak Tablice 5.**

65	AY350535	Anc sp F1.1	94	AY350564	Anc sp U1.2	123	EU000280	Anc fl H71
66	AY350536	Anc sp F1.2	95	AY350565	Anc sp U1.3	124	EU000281	Anc fl H72
67	AY350537	Anc sp F1.3	96	AY350566	Anc sp U1.4	125	EU000282	Anc fl H73
68	AY350538	Anc sp F2.1	97	AY350567	Anc sp U1.5	126	EU000283	Anc fl H74
69	AY350539	Anc sp F3.1	98	DQ301842	Anc sp 511	127	EU000284	Anc fl H75
70	AY350540	Anc sp F3.2	99	DQ301850	Anc sp 512	128	EU000285	Anc fl H76
71	AY350541	Anc sp F3.3	100	DQ301849	Anc sp 513	129	EU000286	Anc fl H77
72	AY350542	Anc sp F3.4	101	DQ301846	Anc sp 514	130	EU000287	Anc fl H78
73	AY350543	Anc sp K3.1	102	DQ301844	Anc sp 515	131	EU000288	Anc fl H79
74	AY350544	Anc sp K3.3	103	DQ301845	Anc sp 516	132	EU000289	Anc fl H80
75	AY350545	Anc sp P1.1	104	DQ301847	Anc sp 517	133	EU000290	Anc fl H81
76	AY350546	Anc sp P1.2	105	DQ301856	Anc sp 518	134	EU000291	Anc fl H82
77	AY350547	Anc sp P2.1	106	DQ301853	Anc sp 519	135	EU000292	Anc fl H83
78	AY350548	Anc sp P2.2	107	DQ301851	Anc sp 520	136	EU000293	Anc fl H84
79	AY350549	Anc sp P2.3	108	DQ301854	Anc sp 521	137	EU000294	Anc fl H85
80	AY350550	Anc sp P2.4	109	DQ301855	Anc sp 522	138	EU000295	Anc fl H86
81	AY350551	Anc sp P2.5	110	DQ301859	Anc sca 524	139	EU000296	Anc fl H87
82	AY350552	Anc sp S2.1	111	DQ301848	Anc sca 526	140	EU000297	Anc fl H88
83	AY350553	Anc sp L1.1	112	DQ301857	Anc tap 523	141	AY577466	Anc fl 16S
84	AY350554	Anc sp L1.2	113	DQ301843	Anc lap 527	142	EF489312	Anc fl 325462
85	AY350555	Anc sp L1.3	114	DQ301860	Anc lap 529	143	AF326919	Anc1
86	AY350556	Anc sp L1.4	115	DQ301858	Anc lap 530	144	AF326920	Anc2
87	AY350557	Anc sp L1.5	116	DQ301852	Anc lap 533	145	AF326921	Anc3
88	AY350558	Anc sp L2.1	117	EU000274	Anc fl H65	146	AF326922	Anc4
89	AY350559	Anc sp L2.2	118	EU000275	Anc fl H66	147	AF326923	Anc5
90	AY350560	Anc sp L2.3	119	EU000276	Anc fl H67	148	AF326924	Anc6
91	AY350561	Anc sp L2.4	120	EU000277	Anc fl H68	149	AF326925	Anc7
92	AY350562	Anc sp L5.1	121	EU000278	Anc fl H69	150	AF326926	Anc8
93	AY350563	Anc sp U1.1	122	EU000279	Anc fl H70	151	AY350568	Plan plan
						152	DQ452039	Ferfrag

Za dio sekvenci preuzetih iz banke gena nije navedeno geografsko izvorite uzorka u originalnim publikacijama. Lokaliteti sakupljanja uzoraka te pripadajuće geografske koordinate za sekvence za koje postoje ti podaci navedeni su u Tablici 6 i 7.

**Tablica 6.** Popis sekvenci s pripadajućim lokalitetima za *COI* gen.

	<b>KRATICA</b>	<b>KOD LOKALITETA</b>	<b>LOKALITET</b>	<b>GEOG. KOORD.</b>	
1	AY350509 Anc sp H2	FR1	Francuska, Ornans	47.059° N	6.222° E
2	AY350510 Anc sp H5	PL1	Poljska, Lizbark	53.240° N	19.831° E
3	AY350511 Anc sp H6	DE1	Njemačka, Schleswig-Holstein	54.283° N	10.583° E

**Nastavak Tablice 6.**

4	AY350512 Anc sp H15	SL1	Slovenija, Slatina Radenci	46.652° N	16.085° E
5	AY350513 Anc sp H24	PT1	Portugal, Ourique	37.524° N	-8.246° E
6	AY350514 Anc sp H23	PT1	Portugal, Ourique	37.524° N	-8.246° E
7	AY350515 Anc sp H22	PT1	Portugal, Ourique	37.524° N	-8.246° E
8	AY350516 Anc sp H41	ES1	Španjolska, Kanarski o., Tenerife	28.16667° N	-16.5° E
9	AY350517 Anc sp H34	TR1	Turska, Egirdir	37.856° N	30.829° E
10	AY350518 Anc sp H32	AT1	Austrija, Donau	48.126° N	16.617° E
11	AY350519 Anc sp H30	MA1	Maroko, Barrage	31.524° N	-8.012° E
12	AY350520 Anc sp H28	IT4	Italija, Sicilija	37.793° N	15.203° E
13	AY350521 Anc sp H56	IT2	Italija, Cimina	38.224° N	16.140° E
14	AY350522 Anc sp H36	IT3	Italija, Margio Salice	37.880° N	14.812° E
15	AY350523 Anc sp H39	IT1	Italija, Verres	45.668° N	7.687° E
16	DQ301830 Anc sp 511	MK1	Makedonija, Novo Selo	41.31842° N	20.81652° E
17	DQ301834 Anc sp 512	MK2	Makedonija, Vevčani	41.23892° N	20.58522° E
18	DQ301833 Anc sp 513	MK3	Makedonija, Šum	41.18277° N	20.63158° E
19	DQ301831 Anc sp 514	MK6	Makedonija, j. Ohrid surr.	41.11036° N	20.81891° E
20	DQ301821 Anc sp 515	MK12	Makedonija, j. Ohrid surr.	40.91275° N	20.74502° E
21	DQ301820 Anc sp 516	MK13	Makedonija, j. Ohrid surr.	40.91019° N	20.74782° E
22	DQ301832 Anc sp 517	AL1	Albanija, Tušemišta	40.89688° N	20.71268° E
23	DQ301838 Anc sp 518	GR1	Grčka, Nomos Ioannina	39.40913° N	21.00453° E
24	DQ301840 Anc sp 519	GR2	Grčka, Thermo	38.57043° N	21.65973° E
25	DQ301835 Anc sp 520	TR2	Turska, Aksraj prov.	38.25° N	34.31667° E
26	DQ301841 Anc sp 521	TR3	Turska, Isparta prov.	38.25° N	30.85083° E
27	DQ301825 Anc sca 524	MK4	Makedonija, j. Ohrid	41.11337° N	20.64050° E
28	DQ301826 Anc sca 525	MK4	Makedonija, j. Ohrid	41.11337° N	20.64050° E
29	DQ301839 Anc sca 526	MK5	Makedonija, j. Ohrid	41.11280° N	20.63938° E
30	DQ301837 Anc tap 523	MK7	Makedonija, j. Ohrid	41.08714° N	20.79424° E
31	DQ301822 Anc lap 527	MK8	Makedonija, E obala j. Ohrid	40.98652° N	20.79818° E
32	DQ301823 Anc lap 528	MK8	Makedonija, E obala j. Ohrid	40.98652° N	20.79818° E
33	DQ301836 Anc lap 529	MK9	Makedonija, j. Ohrid	40.97324° N	20.78668° E
34	DQ301827 Anc lap 530	MK10	Makedonija, j. Ohrid	40.97097° N	20.78604° E
35	DQ301828 Anc lap 531	MK10	Makedonija, j. Ohrid	40.97097° N	20.78604° E
36	DQ301824 Anc lap 532	MK11	Makedonija, E obala j. Ohrid	40.93602° N	20.78023° E
37	DQ301829 Anc lap 532	MK11	Makedonija, E obala j. Ohrid	40.93602° N	20.78023° E

**Tablica 7.** Popis sekvenci s pripadajućim lokalitetima za *16S rRNA* gen.

	KRATICA	KOD LOKALITETA	LOKALITET	GEOG. KOORD.	
1	AY238704 Anc sp H2	FR1	Francuska, Ornans	47.059° N	6.222° E
2	AY238707 Anc sp H5	PL1	Poljska, Lizbark	53.240° N	19.831° E
3	AY238708 Anc sp H6	DE1	Njemačka, Schleswig-Holstein	54.283° N	10.583° E



**Nastavak Tablice 7.**

4	AY238717 Anc sp H15	SL1	Slovenija, Slatina Radenci	46.652° N	16.085° E
5	AY238724 Anc sp H22	PT1	Portugal, Ourique	37.524° N	-8.246° E
6	AY238725 Anc sp H23	PT1	Portugal, Ourique	37.524° N	-8.246° E
7	AY238726 Anc sp H24	PT1	Portugal, Ourique	37.524° N	-8.246° E
8	AY238730 Anc sp H28	IT4	Italija, Sicilija	37.793° N	15.203° E
9	AY238732 Anc sp H30	MA1	Maroko, Barrage	31.524° N	-8.012° E
10	AY238734 Anc sp H32	AT1	Austrija, Donau	48.126° N	16.617° E
11	AY238736 Anc sp H34	TR1	Turska, Egirdir	37.856° N	30.829° E
12	AY238738 Anc sp H36	IT3	Italija, Margio Salice	37.880° N	14.812° E
13	AY238741 Anc sp H39	IT1	Italija, Verres	45.668° N	7.687° E
14	AY238743 Anc sp H41	ES1	Španjolska, Kanarski o., Tenerife	28.16667° N	-16.5° E
15	AY238756 Anc sp H56	IT2	Italija, Cimina	38.224° N	16.140° E
16	DQ301842 Anc sp 511	MK1	Makedonija, Novo Selo	41.31842° N	20.81652° E
17	DQ301850 Anc sp 512	MK2	Makedonija, Vevčani	41.23892° N	20.58522° E
18	DQ301846 Anc sp 513	MK3	Makedonija, Šum	41.18277° N	20.63158° E
19	DQ301844 Anc sp 514	MK6	Makedonija, j. Ohrid surr.	41.11036° N	20.81891° E
20	DQ301844 Anc sp 515	MK12	Makedonija, j. Ohrid surr.	40.91275° N	20.74502° E
21	DQ301845 Anc sp 516	MK13	Makedonija, j. Ohrid surr.	40.91019° N	20.74782° E
22	DQ301847 Anc sp 517	AL1	Albanija, Tušemišta	40.89688° N	20.71268° E
23	DQ301856 Anc sp 518	GR1	Grčka, Nomos Ioannina	39.40913° N	21.00453° E
24	DQ301853 Anc sp 519	GR2	Grčka, Thermo	38.57043° N	21.65973° E
25	DQ301851 Anc sp 520	TR2	Turska, Aksraj prov.	38.25° N	34.31667° E
26	DQ301854 Anc sp 521	TR3	Turska, Isparta prov.	38.25° N	30.85083° E
27	DQ301855 Anc sp 522	TR4	Turska, Antalya prov.	37.15° N	31.2° E
28	DQ301859 Anc sca 524	MK4	Makedonija, j. Ohrid	41.11337° N	20.64050° E
29	DQ301848 Anc sca 526	MK5	Makedonija, j. Ohrid	41.11280° N	20.63938° E
30	DQ301857 Anc tap 523	MK7	Makedonija, j. Ohrid	41.08714° N	20.79424° E
31	DQ301843 Anc lap 527	MK8	Makedonija, E obala j. Ohrid	40.98652° N	20.79818° E
32	DQ301860 Anc lap 529	MK9	Makedonija, j. Ohrid	40.97324° N	20.78668° E
33	DQ301858 Anc lap 530	MK10	Makedonija, j. Ohrid	40.97097° N	20.78604° E
34	DQ301852 Anc lap 533	MK11	Makedonija, E obala j. Ohrid	40.93602° N	20.78023° E

Sve računalne analize nukleotidnih sekvenci provedene su zasebno za *COI* gen i zasebno za *16S rRNA* gen te za združeni set podataka koji obuhvaća konkatenirane sekvence dva različita mitohondrijska gena dobivena iz istih jedinki (*COI+16S rRNA*).

Prije bilo kakvih analiza sekvence su uređene u programu Bioedit 7.2.4. (Hall 1999). Uređivanje je uključivalo uklanjanje početnica i loše očitanih početaka kako bi za daljnje analize ostale samo filogenetički informativne regije. Nakon toga, eksperimentalno dobivene sekvence sravnjene su sa sekvencama preuzetim iz banke gena pomoću ClustalW višestrukog sravnjivanja (Larkin i sur. 2007). Uočene razlike u sekvencama provjerene su pregledavanjem kromatograma pojedine sekvence. Sve pogreške, bilo da se radi o pogrešno očitanoj signalu, preklapanju signala dviju baza ili o izostavljanju neke od baza, ručno su ispravljene. Početak i kraj svih sekvenci odrezan je prema duljini eksperimentalno dobivenih sekvenci.

Nakon pregleda svih sekvenci uočeno je da su neke prekratke te su kao takve izbačene iz seta. U daljnjim analizama za *COI* gen korišteno je ukupno 105 sekvenci, 73 preuzete iz banke gena te 32 eksperimentalno dobivene sekvence. Za *16S rRNA* gen korištene su 162 sekvence, 151 preuzeta iz banke gena te 11 eksperimentalno dobivenih sekvenci.

Svaki set podataka (*COI*, *16S rRNA* i *COI+16S rRNA*) korištenjem opcije „*DNA to haplotype collapser and converter*“ online servisa FaBox v.1.41 (Villesen, 2007) kolabiran je u jedinstvene haplotipove. Haplotip predstavlja jedinstveni nukleotidni slijed te su sve sekvence koje pripadaju istom haplotipu identične. Ti jedinstveni haplotipovi korišteni su u daljnjim analizama, a za njihov lakši prikaz na filogenetskim stablima i mrežama svakom je haplotipu dano ime.

Za izradu filogenetskih stabala na temelju *COI* gena korišteni su eksperimentalno dobiveni haplotipovi i sve dostupne sekvence kolabirane u haplotipove preuzete iz banke gena osim EU376522 Anc fl H67a sekvence pošto je prekratka (301 pb) i AY577506 Anc fl 1 sekvence koja ne odgovara istraživanom nego drugom dijelu *COI* gena. Za ukorjenjivanje stabala korištene su sekvence vrsta *Planorbis corneus* i *Ferrissia fragilis*.

Za izradu filogenetskih stabala na temelju *16S rRNA* gena korišteni su eksperimentalno dobiveni haplotipovi i sve dostupne sekvence kolabirane u haplotipove preuzete iz banke gena. Za ukorjenjivanje stabala korištene su sekvence vrsta *Planorbis planorbis* i *Ferrissia fragilis*.

Za izradu filogenetskih stabala na temelju konkateniranog seta *COI+16S rRNA* korišteni su eksperimentalno dobiveni haplotipovi i sve dostupne sekvence kolabirane u haplotipove preuzete iz banke gena. Za ukorjenjivanje stabala korištene su sekvence vrsta *Planorbis corneus* i *Ferrissia fragilis*.

### 3.2.5.2 Filogenetičke i filogeografske analize nukleotidnih sekvenci

Filogenetičke analize provedene su na sva tri seta podataka (*COI*, *16S rRNA* i *COI+16S rRNA*) korištenjem metode susjednog sparivanja (NJ), najveće vjerojatnosti (ML) i Bayesian-ovog zaključivanja (BA). Za rekonstrukciju filogenetskog stabla NJ i ML metodom korišten je program MEGA7 (Kumar i sur. 2016), a BA metodom program MrBayes (Ronquist i Huelsenbeck 2003).

Prije same rekonstrukcije stabla potrebno je odabrati najbolji evolucijski model za svaki genski biljeg. Evolucijski model predstavlja skup pretpostavki koje opisuju različite vjerojatnosti supstitucije jednog nukleotida drugim. Različiti evolucijski modeli daju različite rezultate. Ako se na određeni set podataka primjeni nedovoljno precizni ili pak pogrešni model to rezultira netočnim filogenetskim stablom s krivim duljinama grana, krivim odnosom tranzicija i transverzija, podcijenjene ili precijenjene divergentnosti te u konačnici krivim rasporedom taksonomskih grupa unutar stabla. Bolji rezultati dobivaju se primjenom kompleksnijih modela jer oni uključuju više različitih parametara, ali su upravo zbog toga vremenski i računalno zahtjevniji od jednostavnijih modela. Za odabir najboljeg modela (eng. best-fit model), onoga koji najbolje pristaje određenom setu podataka, koriste se statistički testovi. Statistička testiranja dijele se u dvije skupine (Lemey i sur. 2009):

- hijerarhijski test udjela vjerojatnosti (hLRT, eng. *hierarchical likelihood ratio test*)
- informacijski kriterij (IC, eng. *information criteria*)

Za sva tri seta podataka (*COI*, *16S rRNA* i *COI+16S rRNA*) u NJ metodi korištene su nekorrigirane udvojene distance, uzimajući u obzir i tranzicije i transverzije. Za najbolji evolucijski model u ML metodi odabrani je model T92+G (Tamura 3-parameter (Gamma)).

Kao podrška grananja unutar stabla u svim filogenetičkim analizama korištena je metoda samoučitanja (eng. *bootstrap*). Podrška za grananja unutar filogenetskih stabala za NJ

metodu određena je na temelju 2000 *bootstrap* ponavljanja, a za ML metodu 1000 *bootstrap* ponavljanja.

Nekorigirane udvojene distance (PD, eng. *p-distance, uncorrected pairwise distance*) izračunate su za svaki set podataka. Te distance predstavljaju udio nukleotidnih mjesta na kojima se uspoređivane sekvence razlikuju. Dobiju se na način da se broj razlika podijeli s ukupnim brojem nukleotida u uspoređivanim sekvencama. P-distance zapravo pokazuju kolike su genetske udaljenosti između haplotipova (Nei i Kumar 2000).

Za BA metodu najbolji evolucijski model za sva tri seta podataka (*COI, 16S rRNA* i *COI+16S rRNA*) odabran je u programu jModelTest 2.1.5. (Darriba i sur. 2012) prema Bayesian informacijskom kriteriju (BIC, eng. Bayesian information criterion). Za *COI* gen odabrani je HKY+G kao najbolji model, a za *16S rRNA* gen HKY+I+G model. BA metoda omogućuje da se u konkateniranom setu podataka posebno primjeni odgovarajući model za jedan dio podataka, a posebno za drugi dio. Tako je za *COI* gen u konkateniranom setu *COI+16S rRNA* najbolji model HKY+I+G, a za *16S rRNA* gen HKY+G.

Podrška grananjima u BA analizi izražena je putem vrijednosti posteriornih vjerojatnosti (*Bayesian posterior probabilities*).

Intraspecifični filogenetski odnosi ne mogu uvijek biti adekvatno prikazani bifurkalnim stablom te je za njihovo prikazivanje obično prikladnija filogenetska mreža (Posada i Crandall 2001). Filogenetske mreže konstruirane su metodom statističke parsimonije (eng. *statistical parsimony*) (Templeton i sur. 1992) u programu TCS1.21 (Templeton-Crandall-Sing) (Clement i sur. 2000) s graničnom vrijednosti vjerojatnosti od 95 %. Zbog velikog broja sekvenci nekompletnih na 5' ili 3' kraju, a s obzirom da značajke koje nedostaju mogu potencijalno uzrokovati probleme u analizi, prije analize skraćeni su krajevi sekvenci te je analiza provedena na duljini sravnjenja od 463 pb (54 haplotipa).

Vrijeme divergencije na temelju Bayesian evolucijske analize određeno je korištenjem programskog paketa BEAST v1.7.4 (Drummond i sur. 2012). Kako u Gastropoda postoje objavljene supstitucijske rate, tj. molekularni sat s intervalima 95 % pouzdanosti za *COI* gen pod različitim evolucijskim modelima, procjena vremena divergencije rađena je za *COI* set podataka (Wilke i sur. 2009). U programu jModeltest prema BIC kriteriju određeni je najpovoljniji evolucijski model, HKY+G. S obzirom da za taj model ne postoji supstitucijska rata uzeti je treći po redu model, HKY+I+G, jer je za njega rata poznata te ona iznosi  $1,6 \times 10^{-7}$

<sup>8</sup> supstitucija/mjestu/godini. Hipoteza molekularnog sata testirana je metodom najveće vjerojatnosti u programu MEGA7. Kako hipoteza nije odbačena korišten je model strogog molekularnog sata. Analiza je provedena korištenjem Yule modela kroz 10 000 000 generacija s time da je uzorkovano svakih 1 000 generacija. Od toga je prvih 1 000, odnosno 10% uzorkovanih stabala odbačeno (*burn-in*). Pouzdanost analize provjerena je u programu Tracer v. 1.6 (Rambaut i dr. 2014). Za sve parametre efektivne veličine uzorka (ESS vrijednosti) bile su veće od 200 što pokazuje da je analiza pouzdana.

ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery) brza je i jednostavna analiza koja na temelju "barkod praznine" sekvence iz određenog seta podataka svrstava u hipotetske vrste. "Barkod praznina" javlja se kada su genetske razlike između organizama koji pripadaju istoj vrsti manje nego što su genetske razlike između organizama koji pripadaju različitim vrstama, odnosno praznina se uočava između maksimalnih intraspecifičnih i minimalnih interspecifičnih p-distanci (Puillandre i sur. 2011). ABGD analiza izvršena je korištenjem mrežnog softvera ABGD (Puillandre i dr. 2011) na *COI* setu podataka. Vrijednost minimalne intraspecifične udaljenosti postavljena je na 0,001, a maksimalne intraspecifične udaljenosti na 0,018 na temelju minimalnih interspecifičnih razlika vrsta *Ancylus scalariformis* i *Ancylus tapirulus*. Minimalna širina "barkod praznine" ostavljena je prema općim postavkama na 1,5 vrijednost.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Srvajivanje nukleotidnih sekvenci

Ukupna duljina nukleotidnih sekvenci za *COI* gen iznosi 620 pb, za *16S rRNA* gen 430 pb, a za konkatenerani set *COI+16S rRNA* 1050 pb.

Za *COI* gen utvrđeno je ukupno 68 haplotipova (Tablica 8), za *16S rRNA* gen 110 haplotipova (Tablica 9), a za konaktenirani set *COI+16S rRNA* 61 haplotip (Tablica 10).

**Tablica 8.** Popis haplotipova za *COI* gen.

	IME HAPLOTIPA	NAZIV SEKVENCE		IME HAPLOTIPA	NAZIV SEKVENCE
1	cAF1	ANCDR-1	12	cB8	ANCUN-2
		ANCDR-2	13	cB9	ANCVR-1
		ANCDD-1			ANCVR-4
		ANCDD-2	14	cAF3	AY350509 Anc sp H2
		ANCDD-3	15	cAF4	AY350510 Anc sp H5
2	cAF2	ANCDD-3			AY350511 Anc sp H6
3	cB1	ANCDR-3	16	cAF5	AY350512 Anc sp H15
4	cC1	ANCJA-1	17	cA1	AY350513 Anc sp H24
5	cC2	ANCJD-1	18	cA2	AY350515 Anc sp H23
6	cB2	ANCJD-2	19	cA3	AY350515 Anc sp H22
		ANCKA-1	20	cB10	AY350516 Anc sp H41
		ANCKA-2	21	cB11	AY350517 Anc sp H34
7	cB3	ANCKA-3	22	cB12	AY350518 Anc sp H32
		ANCKR-1	23	cB13	AY350519 Anc sp H30
		ANCKR-2	24	cC3	AY350520 Anc sp H28
		ANCKR-3			AY350521 Anc sp H56
		ANCKR-6	25	cC4	AY350522 Anc sp H36
		ANCKR-7			AY350523 Anc sp H39
ANCKR-8					
8	cB4	ANCKR-1	26	cB14	DQ301830 Anc sp 511
		ANCKR-2	27	cB15	DQ301834 Anc sp 512
		ANCKR-3	28	cB16	DQ301833 Anc sp 513
		ANCKR-4	29	cB17	DQ301831 Anc sp 514
		ANCKR-5	30	cD1	DQ301821 Anc sp 515
		ANCKR-3	31	cD2	DQ301820 Anc sp 516
9	cB5	ANCKR-1	32	cD3	DQ301832 Anc sp 517
		ANCKR-5	33	cB18	DQ301838 Anc sp 518
10	cB6	ANCKR-3	34	cB19	DQ301840 Anc sp 519
		ANCKR-4	35	cB20	DQ301835 Anc sp 520
11	cB7	ANCKR-1	36	cB21	DQ301841 Anc sp 521

**Nastavak Tablice 8.**

37	cAS1	DQ301825 Anc sca 524	52	cAF12	EU376496 Anc fl H69a
38	cAS2	DQ301826 Anc sca 525	53	cAF13	EU376497 Anc fl H70a
39	cAS3	DQ301839 Anc sca 526			EU376498 Anc fl H70b
40	cAT1	DQ301837 Anc tap 523	54	cAF14	EU376499 Anc fl H6d
41	cAL1	DQ301822 Anc lap 527	55	cAF15	EU376502 Anc fl H5a
		DQ301823 Anc lap 528			EU376503 Anc fl H5b
42	cAL2	DQ301836 Anc lap 529			EU376520 Anc fl H87
43	cAL3	DQ301827 Anc lap 530	56	cAF16	EU376504 Anc fl H15
44	cAL4	DQ301828 Anc lap 531	57	cAF17	EU376505 Anc fl H72
45	cAL5	DQ301824 Anc lap 532	58	cAF18	EU376506 Anc fl H75
		DQ301829 Anc lap 532	59	cAF19	EU376507 Anc fl H76
46	cAF6	EU376490 Anc fl H65	60	cAF20	EU376510 Anc fl H79
47	cAF7	EU376491 Anc fl H67c	61	cAF21	EU376512 Anc fl H81
		EU376521 Anc fl H67b	62	cAF22	EU376513 Anc fl H82
48	cAF8	EU376492 Anc fl H1a	63	cAF23	EU376514 Anc fl H83
		EU376500 Anc fl H6b	64	cAF24	EU376515 Anc fl H84
		EU376501 Anc fl H6c	65	cAF25	EU376516 Anc fl H85
		EU376508 Anc fl H77			EU376517 Anc fl H88
		EU376509 Anc fl H78	66	cAF26	EU376518 Anc fl H6a
		EU376511 Anc fl H80			EU376519 Anc fl H86
49	cAF9	EU376493 Anc fl H1b	67	cAF27	AY282582 Anc fl 2
50	cAF10	EU376494 Anc fl H19	68	cAF28	DQ328270 Anc fl 3
51	cAF11	EU376495 Anc fl H69b	69		AY350524 Plan corn
			70		DQ452032 Ferfra

**Tablica 9.** Popis haplotipova za *16S rRNA* gen.

	IME HAPLOTIPA	NAZIV SEKVENCE		IME HAPLOTIPA	NAZIV SEKVENCE
1	sAF1	ANCDR-1	6	sB5	ANCUN-1
		ANCDD-2	7	sC1	ANCJD-2
2	sB1	ANCSL-1	8	sAF2	Anc sp H1
3	sB2	ANCSL-3	9	sAF3	Anc sp H2
		ANCRI-1	10	sAF3	Anc sp H3
		ANCKR-1	11	sAF4	Anc sp H4
		ANCKR-6	12	sAF5	Anc sp H5
4	sB3	ANCKA-1	13	sAF6	Anc sp H6
5	sB4	ANCRI-2	14	sAF7	Anc sp H7
		Anc sp H32	15	sAF8	Anc sp H8
		Anc sp 511	16	sAF9	Anc sp H9
		Anc sp 512	17	sAF10	Anc sp H10
		Anc sp 513	18	sAF11	Anc sp H11
		Anc sp 514	19	sAF12	Anc sp H12
		Anc sp 518	20	sAF13	Anc sp H13

**Nastavak Tablice 9.**

21	sAF14	Anc sp H14	63	sAF23	Anc sp F1.1
22	sAF15	Anc sp H15			Anc sp F1.2
23	sAF16	Anc sp H16			Anc sp F1.3
24	sAF17	Anc sp H17			Anc fl H69
25	sAF18	Anc sp H18	64	sAF24	Anc sp F2.1
26	sAF19	Anc sp H19			Anc sp F3.1
27	sAF20	Anc sp H20			Anc sp F3.2
28	sA1	Anc sp H21			Anc sp F3.3
29	sA2	Anc sp H22			Anc sp F3.4
30	sA3	Anc sp H23			Anc fl H70
31	sA4	Anc sp H24	65	sC14	Anc sp K3.1
32	sC2	Anc sp H25	66	sC15	Anc sp K3.3
33	sB6	Anc sp H26	67	sAF25	Anc sp P1.1
34	sB7	Anc sp H27			Anc fl H65
35	sC3	Anc sp H28	68	sAF26	Anc sp P1.2
36	sB8	Anc sp H29			Anc fl H66
37	sB9	Anc sp H30	69	sAF27	Anc sp P2.1
38	sB10	Anc sp H31			Anc sp P2.2
39	sB11	Anc sp H33			Anc sp P2.3
40	sB12	Anc sp H34			Anc sp P2.4
41	sB13	Anc sp H35			Anc sp P2.5
42	sC4	Anc sp H36			Anc fl H67
43	sB14	Anc sp H37	70	sAF28	Anc sp S2.1
44	sC5	Anc sp H38			Anc fl H68
45	sC6	Anc sp H39	71	sAF29	Anc sp L1.1
46	sC7	Anc sp H40			Anc sp L1.2
47	sB15	Anc sp H41			Anc sp L1.3
		Anc sp H46			Anc sp L1.4
48	sB16	Anc sp H42			Anc sp L1.5
49	sB17	Anc sp H43			Anc sp L2.1
50	sB18	Anc sp H44			Anc sp L2.2
51	sB19	Anc sp H45			Anc sp L2.3
52	sC8	Anc sp H47			Anc sp L2.4
53	sB20	Anc sp H49			Anc sp L5.1
54	sC9	Anc sp H50			Anc sp U1.1
55	sC10	Anc sp H51			Anc sp U1.2
56	sC11	Anc sp H52			Anc sp U1.3
57	sB21	Anc sp H54			Anc sp U1.4
58	sC12	Anc sp H55			Anc sp U1.5
59	sC13	Anc sp H56	Anc fl H71		
60	sB22	Anc sp H57	72	sD1	Anc sp 515
61	sAF21	Anc sp E1.1	73	sD2	Anc sp 516
		Anc sp E1.2	74	sD3	Anc sp 517
		Anc sp E1.3	75	sB23	Anc sp 519
		Anc sp E1.4	76	sB24	Anc sp 520
62	sAF22	Anc sp E3.1	77	sB25	Anc sp 521
		Anc sp E3.2	78	sB26	Anc sp 522
		Anc sp E3.3	79	sAS1	Anc sca 524
		Anc sp E3.4			Anc sca 526
		Anc sp E3.5	80	sAT1	Anc tap 523



**Nastavak Tablice 9.**

81	sAL1	Anc lap 527	97	sAF42	Anc fl H84
82	sAL2	Anc lap 529	98	sAF43	Anc fl H85
83	sAL3	Anc lap 530	99	sAF44	Anc fl H86
84	sAL4	Anc lap 533	100	sAF45	Anc fl H87
85	sAF30	Anc fl H72	101	sAF47	Anc fl H88
86	sAF31	Anc fl H73	102	sAF48	AY577466 Anc fl 16S
87	sAF32	Anc fl H74	103	sAF49	EF489312 Anc fl 325462
88	sAF33	Anc fl H75	104	sA5	AF326919 Anc1
89	sAF34	Anc fl H76			AF326922 Anc4
90	sAF35	Anc fl H77	105	sA6	AF326920 Anc2
91	sAF36	Anc fl H78	106	sA7	AF326921 Anc3
92	sAF37	Anc fl H79	107	sA8	AF326923 Anc5
93	sAF38	Anc fl H80	108	sA9	AF326924 Anc6
94	sAF39	Anc fl H81	109	sA10	AF326925 Anc7
95	sAF40	Anc fl H82	110	sA11	AF326926 Anc8
96	sAF41	Anc fl H83	111		AY350568 Plan plan
			112		DQ452039Ferfrag

**Tablica 10.** Popis haplotipova za konkatenirani set sekvenci *COI+16S rRNA* gen.

	IME HAPLOTIPA	NAZIV SEKVENCE		IME HAPLOTIPA	NAZIV SEKVENCE
1	cAF1sAF1	ANCDR-1	19	cAF8sAF37	Anc fl H78
		ANCDD-2	20	cAF20sAF38	Anc fl H79
2	cC2sC1	ANCJD-2	21	cAF8sAF39	Anc fl H80
3	cB2sB3	ANCKA-1	22	cAF21sAF40	Anc fl H81
4	cB3sB2	ANCKR-1	23	cAF22sAF41	Anc fl H82
		ANCKR-6	24	cAF23sAF42	Anc fl H83
5	cB4sB2	ANCRI-1	25	cAF24sAF43	Anc fl H84
6	cB4sB4	ANCRI-2	26	cAF25sAF44	Anc fl H85
7	cB5sB1	ANCSL-1	27	cAF26sAF45	Anc fl H86
8	cB6sB2	ANCSL-3	28	cAF15sAF46	Anc fl H87
9	cB7sB5	ANCUN-1	29	cAF22sAF47	Anc fl H88
10	cAF6sAF26	Anc fl H65	30	cAL1sAL1	Anc lap 527
11	cAF7sAF28	Anc fl H67	31	cAL2sAL2	Anc lap 529
12	cAF12sAF24	Anc fl H69a	32	cAL3sAL3	Anc lap 530
13	cAF11sAF24	Anc fl H69b	33	cAS1sAS1	Anc sea 524
14	cAF13sAF25	Anc fl H70	34	cAS3sAS1	Anc sea 526
15	cAF17sAF31	Anc fl H72	35	cB14sB4	Anc sp 511
16	cAF18sAF34	Anc fl H75	36	cB15sB4	Anc sp 512
17	cAF19sAF35	Anc fl H76	37	cB16sB4	Anc sp 513
18	cAF8sAF36	Anc fl H77	38	cB17sB4	Anc sp 514

**Nastavak Tablice 10.**

39	cD1sD1	Anc sp 515	50	cA1sA4	Anc sp H24
40	cD2sD2	Anc sp 516	51	cC3sC3	Anc sp H28
41	cD3sD3	Anc sp 517	52	cB13sB9	Anc sp H30
42	cB18sB4	Anc sp 518	53	cB12sB4	Anc sp H32
43	cB19sB23	Anc sp 519	54	cB11sB12	Anc sp H34
44	cB20sB24	Anc sp 520	55	cC4sC4	Anc sp H36
45	cB21sB25	Anc sp 521	56	cC4sC6	Anc sp H39
46	cAF5sAF16	Anc sp H15	57	cB10sB15	Anc sp H41
47	cAF3sAF3	Anc sp H2	58	cAF4sAF6	Anc sp H5
48	cA3sA2	Anc sp H22	59	cC3sC13	Anc sp H56
49	cA2sA3	Anc sp H23	60	cAF4sAF7	Anc sp H6
			61	cAT1sAT1	Anc tap 523

**4.2. Filogenetičke i filogeografske analize sekvenci**

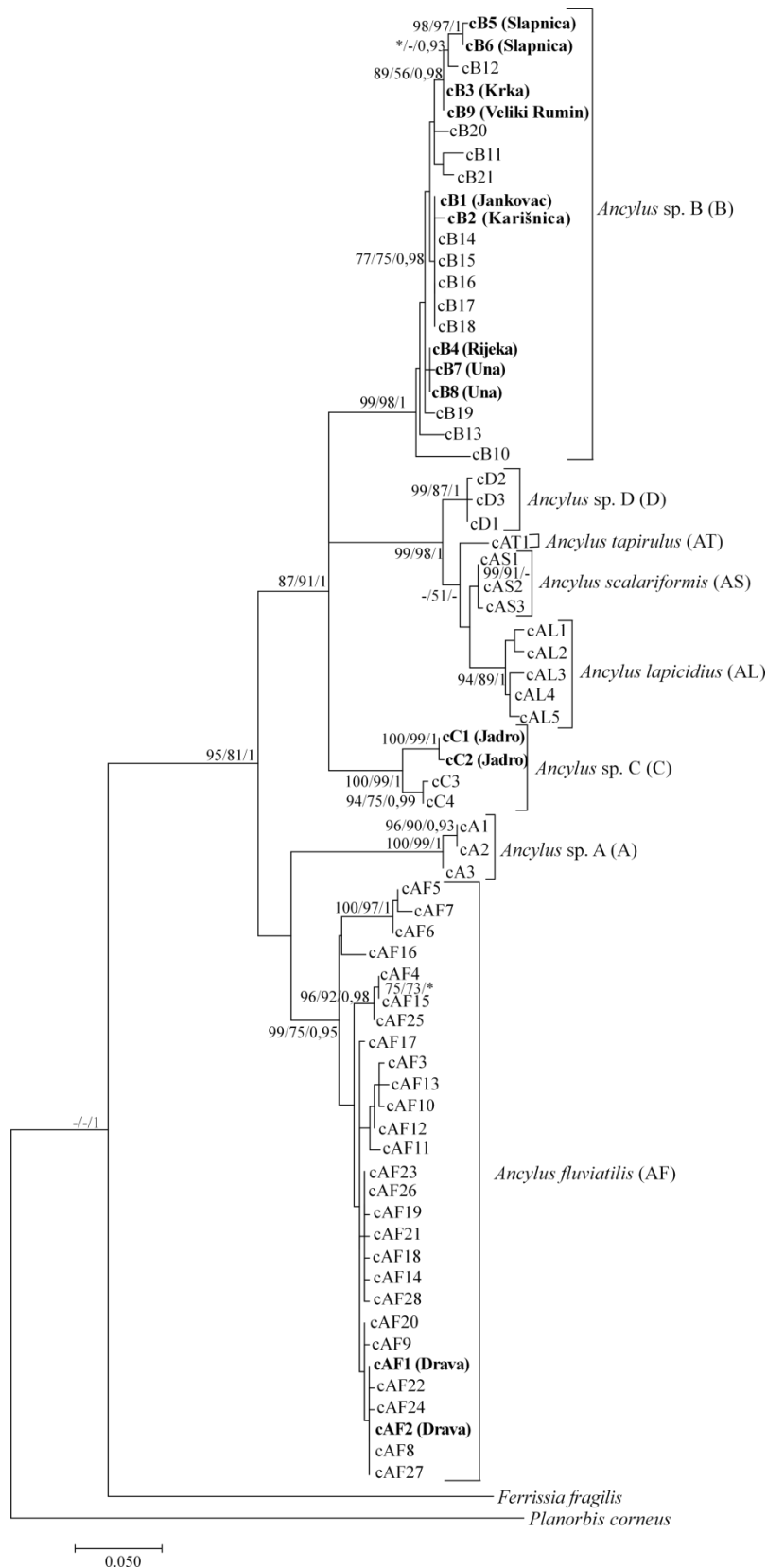
Sve *Ancylus* sekvence grupiraju se u 8 linija, odnosno klade kojima su dane sljedeće oznake:

- AF = *Ancylus fluviatilis* (Albrecht i sur. 2006) = kladij 1 (Pfenninger i sur. 2003a)
- A = *Ancylus* sp. A (Albrecht i sur. 2006) = kladij 2 (Pfenninger i sur. 2003a)
- B = *Ancylus* sp. B (Albrecht i sur. 2006) = kladij 3 (Pfenninger i sur. 2003a)
- C = *Ancylus* sp. C (Albrecht i sur. 2006) = kladij 4 (Pfenninger i sur. 2003a)
- D = *Ancylus* sp. D (Albrecht i sur. 2006)
- AL = *Ancylus lapicidus* (Albrecht i sur. 2006)
- AS = *Ancylus scalariformis* (Albrecht i sur. 2006)
- AT = *Ancylus tapirulus* (Albrecht i sur. 2006)

Analizom dobivenih filogenetskih stabala i mreža uočeno je da se haplotipovi eksperimentalno dobivenih sekvenci za sva tri seta podataka (*COI*, *16S rRNA* i *COI+16S rRNA*) grupiraju u 3 linije: AF, B i C. Linija AF obuhvaća uzorke iz Drave, linija B uzorke iz Une, Jankovca, Velikog Rumina, Slapnice, Rijeke, Krke i Karišnice, a linija C uzorke iz rijeke Jadro.

#### **4.2.1. Analiza *COI* gena**

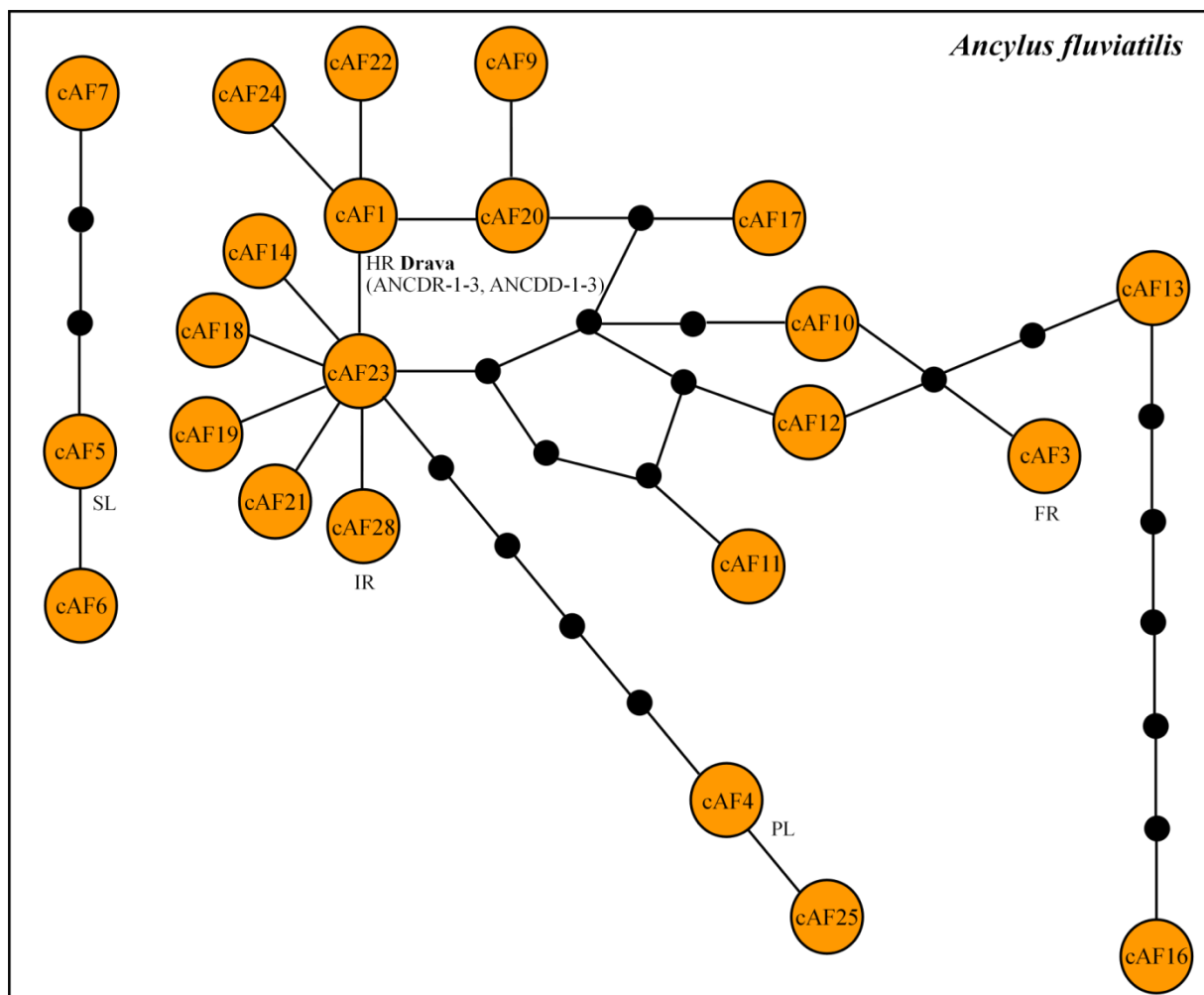
Metode susjednog sparivanja (NJ), najveće vjerojatnosti (ML) i Bayesian-ovog zaključivanja (BA) rezultirale su filogenetskim stablima sa sličnom topologijom, podržanošću i duljinom grana. Stablo dobiveno ML metodom prikazano je u rezultatima, a na njemu su prikazane vrijednosti *bootstrap* podrške veće od 70 % za NJ metodu, vrijednosti *bootstrap* podrške veće od 50 % za ML metodu te vrijednosti posteriornih vjerojatnosti veće od 90 % za BA metodu (Slika 7).



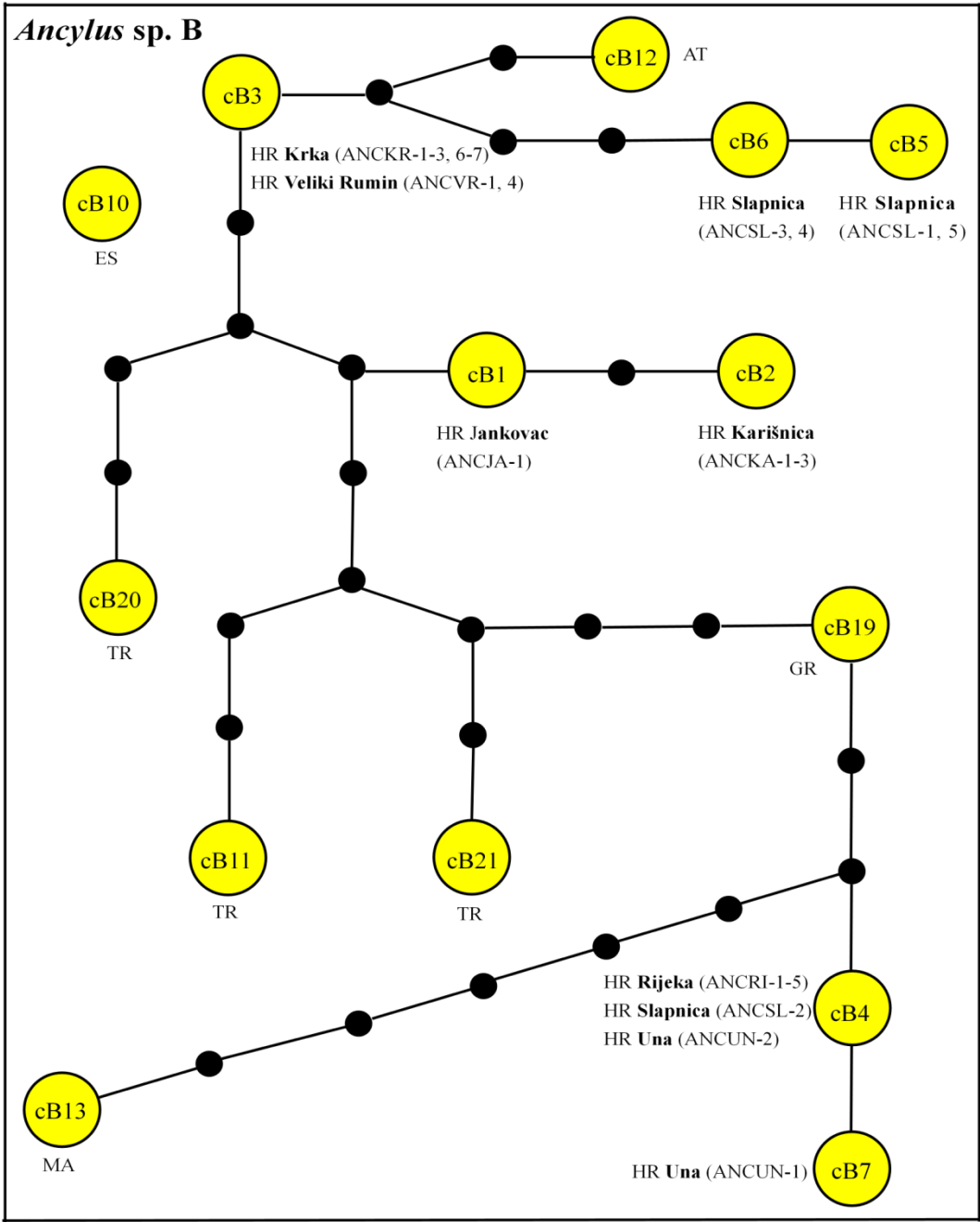
**Slika 7.** ML filogenetsko stablo dobiveno analizom *COI* gena. Na granama su redom označene: *bootstrap* vrijednosti za NJ i ML metodu te vrijednosti *posterior probability* podrške BA metode. Pri tome „\*“ označava da grananje ne postoji u određenoj metodi, a „-“ da grananje nije podržano u određenoj metodi. Duljina grana sukladna je broju supstitucijskih promjena (mjerna crta označava 0,050 supstitucije).

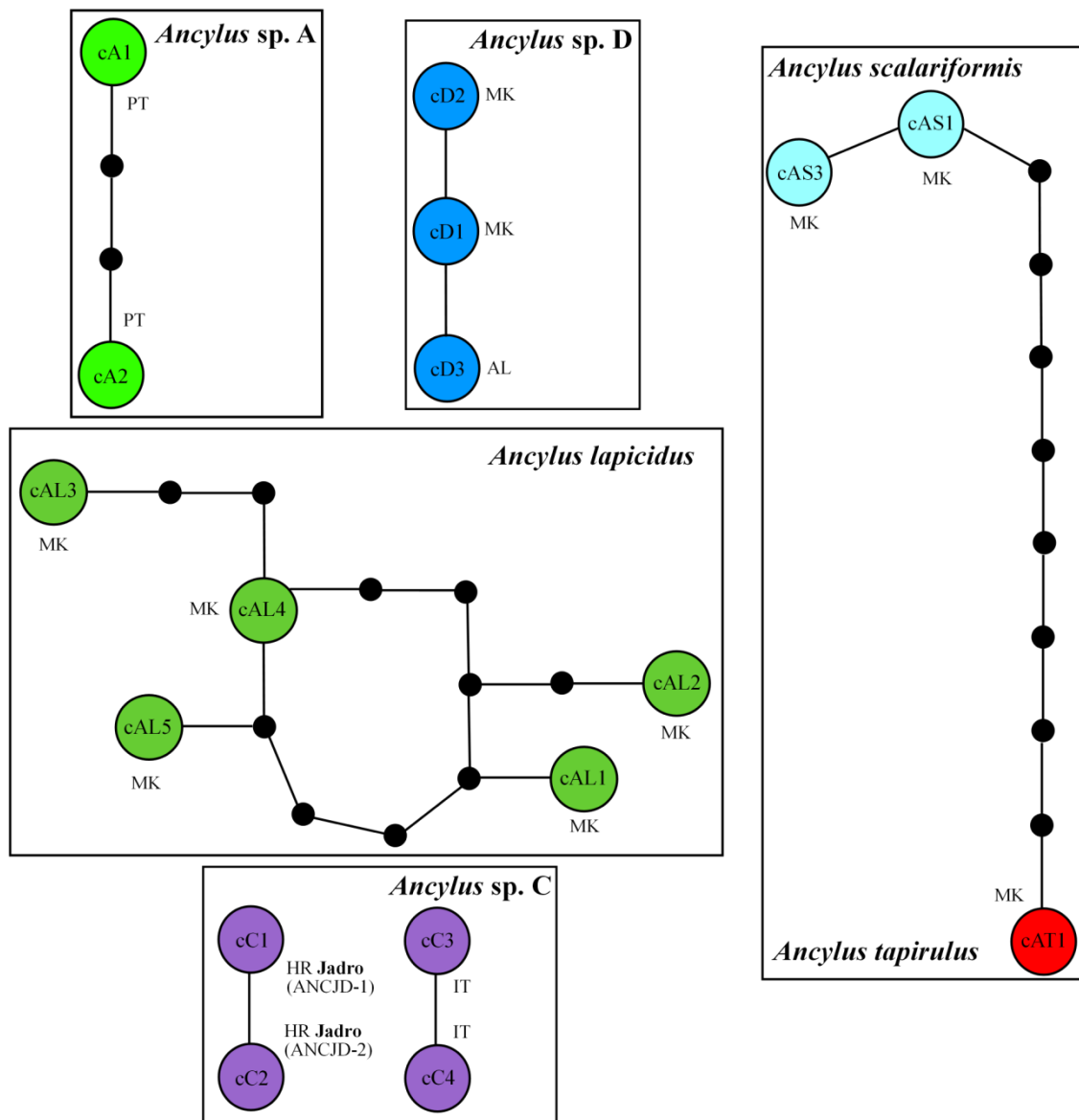
Na filogenetskom stablu jasno se vidi postojanje 8 linija. Unutar dobro podržane AF linije mogu se uočiti dvije podlinije, jedna dobro podržana svim metodama, a druga slabo podržana u koju spadaju i haplotipovi iz rijeke Drave. Kao sestrinska grupa AF liniji razlučena je linija A, no ovo grupiranje nije podržano niti jednom metodom. Ostalih pet linija formiraju dobro podržanu grupu koju karakterizira trihotomija između B i C linije te grupe koja sadrži liniju D i ohridske endemične vrste. Unutar linije B, grupiranje haplotipova s Jankovca i Karišnice s ostalim haplotipovima iz Makedonije (cB14, cB15, cB16, cB17) i Grčke (cB18) slabo je podržano isto kao i odvajanje haplotipova iz rijeke Slapnice, Krke i Velikog Rumina. Unutar C linije s dobrom podržanošću odvajaju se haplotipovi iz rijeke Jadro od ostalih dvaju haplotipa iz Italije. Treću granu čine uglavnom (s izuzetkom podrške za AS liniju u Bayesian metodi) dobro podržane linije D, AT, i AL dok je AS linija zastupljena s jednim jedinim haplotipom. Grupiranje AL, AS i AT linije vrlo je slabo podržano samo ML metodom tako da filogenetski odnosi između ove 4 linije nisu razriješeni.

TCS analizom dobivena je mreža prikazana na Slici 8.



***Ancylus* sp. B**





**Slika 8.** Filogenetska mreža dobivena metodom statističke parsimonije (TCS mreža) na temelju haplotipova *COI* gena. Crne točke predstavljaju haplotipove koji nedostaju (neuzorkovane ili izumrle haplotipove), a crtice označavaju broj mutacijskih koraka. Pripadnost haplotipova glavnoj genetičkoj liniji (Slika 9) naznačena je različitim bojama. Države u kojima su pojedini haplotipovi pronađeni: AL = Albanija, AT = Austrija, ES = Španjolska, FR = Francuska, GR = Grčka, HR = Hrvatska, IR = Irska, IT = Italija, MA = Maroko, MK = Makedonija, PL = Poljska, PT = Portugal, SL = Slovenija TR = Turska)

Na mreži se razdvaja osam zasebnih skupina haplotipova te dodatno haplotip cB10 koji međusobno nisu mogli biti parsimonijski povezani. *Ancyclus fluviatilis* (AF) se u TCS analizi odvaja u dvije odijeljene grupe. Jedna obuhvaća tri haplotipa od kojih je jedan s područja Slovenije (cAF5), a u drugu podgrupu svi ostali haplotipovi, uključujući i haplotip iz rijeke Drave. U drugu skupinu pripada *Ancyclus* sp. B. Haplotip cB10 s Kanarskog otočja odvojio se od ostatka grupe. Ostatak grupe čine haplotipovi iz rijeke Krke, Velikog Rumina,

Slapnice, Jankovca, Karišnice, Rijeke i Une uz haplotipove pronađene u Austriji, Makedoniji, Grčkoj i Turskoj. Haplotipovi Jankovca i Karišnice grupiraju se zajedno s udaljenošću od samo 2 mutacijska koraka dok je haplotip nađen u uzorcima iz Krke i Velikog Rumina udaljen od haplotipa Karišnice 6 mutacijskih koraka. Dva haplotipa iz Slapnice (cB5 i cB6) pojavljuju se kao vanjski haplotipovi u filogenetskoj mreži i najbliži su haplotipu iz Krke i Velikog Rumina (cB3) od kojeg su udaljeni četiri mutacijska koraka. Treći haplotip iz Slapnice (cB4), identičan onom nađenom u uzorcima iz Une i Rijeke vrlo je udaljen od ostalih haplotipova s iste lokacije od kojih ga razdvaja čak 16, odnosno 17 mutacijskih koraka. Dva haplotipa iz Une odvojena su za samo jedan mutacijski korak.

Iz dobivenih vrijednosti nekorigiranih udvojenih genetskih distanci (p-distance) izračunat je njihov raspon unutar i između pojedinih linija te podlinija koje su se na filogenetskom stablu odvojile kao zasebne skupine (Tablica 11). Raspon unutargrupne vrijednosti iznosi 0,002 – 0,039. Najviša vrijednost genetske udaljenosti od 0,039 zabilježena je unutar linije AF. Raspon međugrupnih vrijednosti iznosi 0,019 – 0,104. Najniža vrijednost genetske udaljenosti od 0,019 zabilježena je između linija AS i AT, a najviša vrijednost od 0,104 između linija A i B, između A i AS te između AF i AL.

**Tablica 11.** Prikaz raspona vrijednosti nekorigiranih udvojenih genskih distanci unutar i između linija A, AF, B, C, D, AL, AS i AT.

A	0,006							
AF	0,065-0,073	0,002-0,039						
B	0,086-0,104	0,071-0,099	0,002-0,035					
C	0,080-0,099	0,063-0,099	0,060-0,084	0,002-0,028				
D	0,093-0,097	0,084-0,095	0,065-0,082	0,073-0,089	0,002-0,004			
AL	0,091-0,097	0,089-0,104	0,067-0,093	0,080-0,097	0,030-0,043	0,004-0,017		
AS	0,104	0,084-0,095	0,071-0,086	0,076-0,089	0,026-0,030	0,022-0,030	0,002	
AT	0,095-0,099	0,071-0,091	0,065-0,078	0,065-0,076	0,032-0,035	0,028-0,035	0,019-0,022	N.D.
	A	AF	B	C	D	AL	AS	AT

Unutar linije AF na filogenetskom stablu uočeno je dobro podržano razdvajanje dviju podlinija, AF1 i AF2. U AF1 podliniju pripadaju haplotipovi cAF5, cAF6 i cAF7, a svi ostali haplotipovi u AF2 podliniju. Između njih izračunati je raspon vrijednosti genetske udaljenosti koji iznosi 0,024 – 0,039 (Tablica 12).



**Tablica 12.** Prikaz raspona vrijednosti nekorigiranih udvojenih genskih distanci unutar i između podlinije AF1 i AF2.

AF1	0,002-0,009	
AF2	0,024-0,039	0,002-0,024
	AF1	AF2

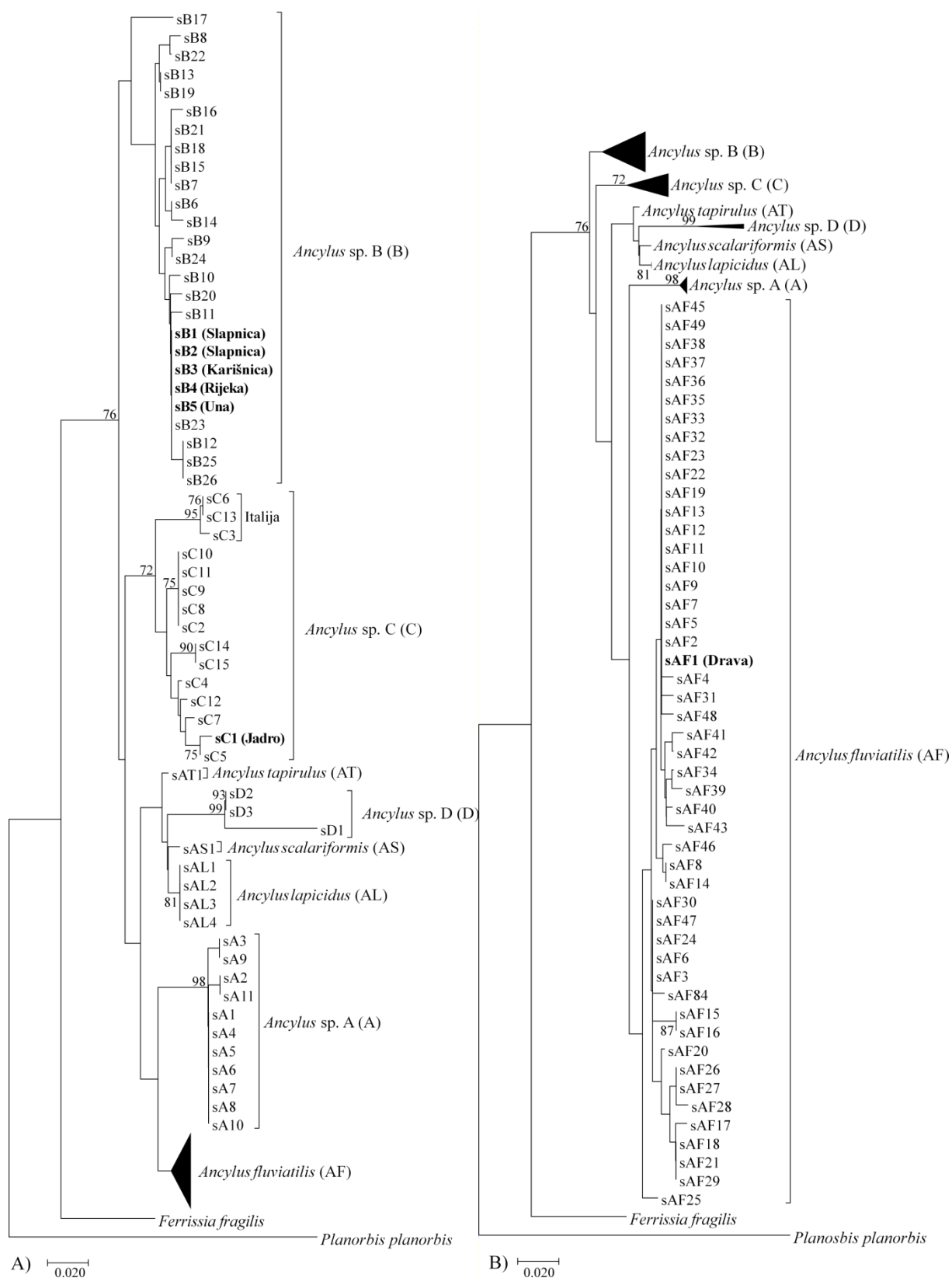
Dobro podržano razdvajanje dviju podlinija (C1 i C2) uočeno je i unutar linije C. U C1 podliniju pripadaju haplotipovi cC1 i cC2, a u C2 podliniju haplotipovi cC3 i cC4. Raspon genetske udaljenosti između njih iznosi 0,024 – 0,028 (Tablica 13).

**Tablica 13.** Prikaz raspona vrijednosti nekorigiranih udvojenih genskih distanci unutar i između podlinije C1 i C2.

C1	0,002	
C2	0,024-0,028	0,002
	C1	C2

#### 4.2.2. Analiza *16S rRNA* gena

Metode susjednog sparivanja (NJ), najveće vjerojatnosti (ML) i Bayesian-ovog zaključivanja (BA) rezultirale su filogenetskim stablima sa sličnom topologijom, podržanošću i duljinom grana. Iako su sve glave grupe dobivene analizom *COI* gena razlučene i na temelju analize *16S rRNA* sekvenci, podrške grananjima vrlo su slabe te se ne dobivaju pouzdane informacije o razdvajanju i grupiranju haplotipova. Na Slici 9 prikazano je NJ filogenetsko stablo samo u svrhu da se prikaže u koju liniju pripadaju uzorci iz Hrvatske s obzirom da je broj publiciranih *16S rRNA* sekvenci veći od onih za *COI* gen. Tako je u ovom stablu vidljivo, za razliku od *COI* stabla, da uzorci iz rijeke Jadro ne predstavljaju novootkrivenu divergentnu liniju unutar *Ancylus* sp. C linije, nego se grupiraju s uzorcima iz Italije za koje u banci gena ne postoje *COI* sekvence.



**Slika 9.** NJ filogenetsko stablo dobiveno analizom *16S rRNA* gena. A) Prikaz haplotipova linija B, C, D, AT, AS i AL. B) Prikaz haplotipova linije AF. Na granama su označene *bootstrap* vrijednosti za NJ metodu. Duljina grana sukladna je broju supstitucijskih promjena (mjerna crta označava 0,020 supstitucije).

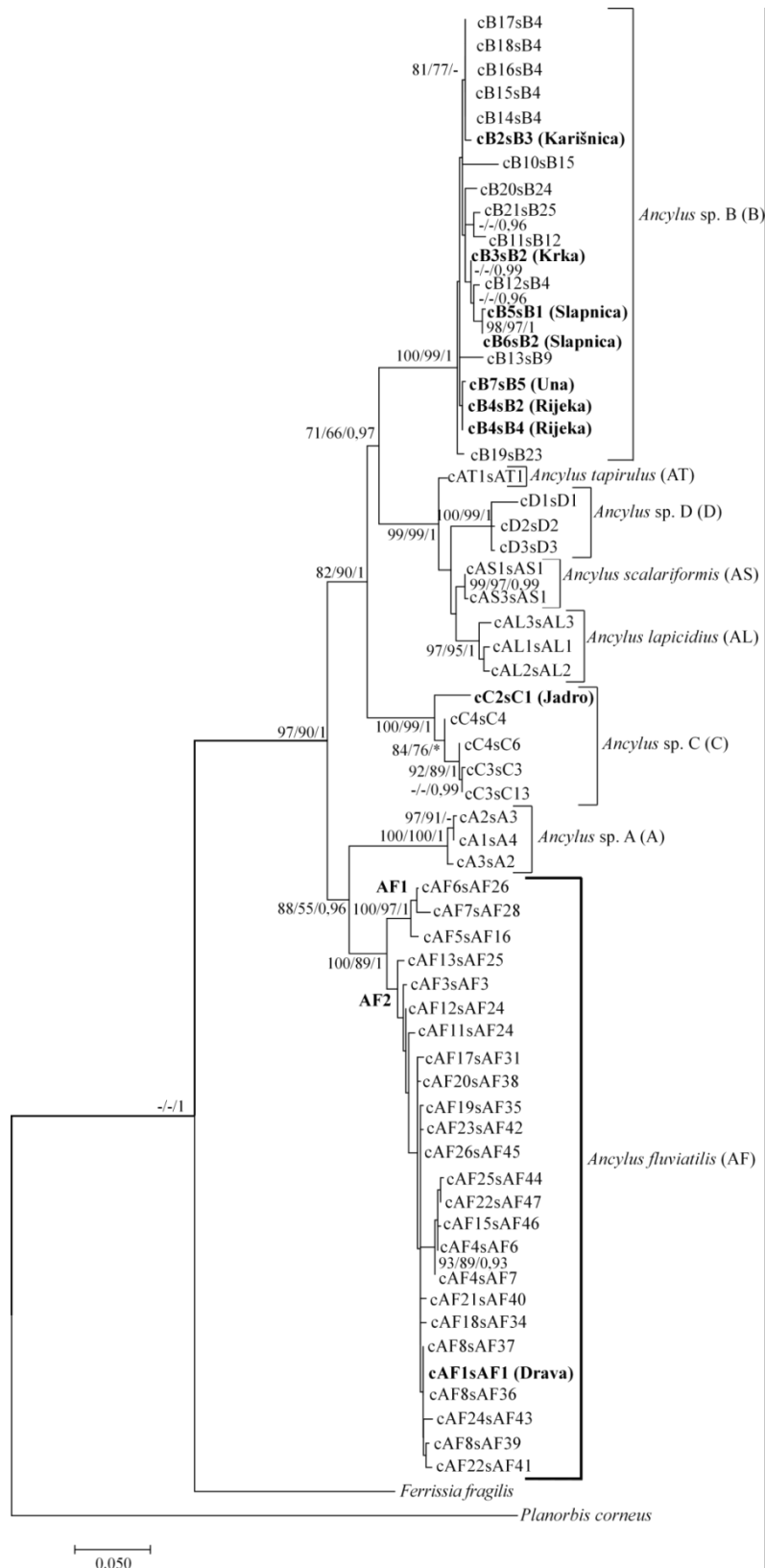
Iz dobivenih vrijednosti nekorigiranih udvojenih genetskih distanci (p-distance) izračunat je njihov raspon unutar i između pojedinih linija (Tablica 14). Raspon unutargrupne vrijednosti iznosi 0,000 – 0,074. Najviša vrijednost genetske udaljenosti od 0,074 zabilježena je unutar linije C. Raspon međugrupnih vrijednosti iznosi 0,011 – 0,144. Najniža vrijednost genetske udaljenosti od 0,011 zabilježena je između linija AL i AS, AL i AT te AS i AT, a najviša vrijednost od 0,144 između linija C i D.

**Tablica 14.** Prikaz raspona vrijednosti nekorigiranih udvojenih genskih distanci unutar i između linija A, AF, B, C, D, AL, AS i AT.

A	0,005-0,011							
AF	0,037-0,059	0,005-0,032						
B	0,069-0,096	0,048-0,090	0,005-0,059					
C	0,074-0,112	0,069-0,117	0,064-0,117	0,005-0,074				
D	0,080-0,128	0,059-0,122	0,053-0,112	0,074-0,144	0,043			
AL	0,059-0,064	0,037-0,059	0,043-0,059	0,069-0,101	0,032-0,074	0		
AS	0,059-0,064	0,037-0,059	0,043-0,059	0,069-0,101	0,032-0,074	0,011	N.D.	
AT	0,053-0,059	0,032-0,053	0,032-0,059	0,064-0,096	0,032-0,074	0,011	0,011	N.D.
	A	AF	B	C	D	AL	AS	AT

#### 4.2.3. Analiza konkateniranog seta *COI+16S rRNA*

Metode susjednog sparivanja (NJ), najveće vjerojatnosti (ML) i Bayesian-ovog zaključivanja (BA) rezultirale su filogenetskim stablima sa sličnom topologijom, podržanošću i duljinom grana. Stablo dobiveno ML metodom prikazano je u rezultatima, a na njemu su prikazane vrijednosti *bootstrap* podrške veće od 70 % za NJ metodu, vrijednosti *bootstrap* podrške veće od 50% za ML metodu te vrijednosti posteriornih vjerojatnosti veće od 90 % za BA metodu (Slika 10).



**Slika 10.** ML filogenetsko stablo dobiveno analizom konkateniranog seta *COI+16S rRNA*. Na granama su redom označene: *bootstrap* vrijednosti za NJ i ML metodu te vrijednosti *posterior probability* podrške BA metode. Pri tome „\*“ označava da grananje ne postoji u određenoj metodi, a „-“ da grananje nije podržano u određenoj metodi. Duljina grana sukladna je broju supstitucijskih promjena (mjerna crta označava 0,050 supstitucije).

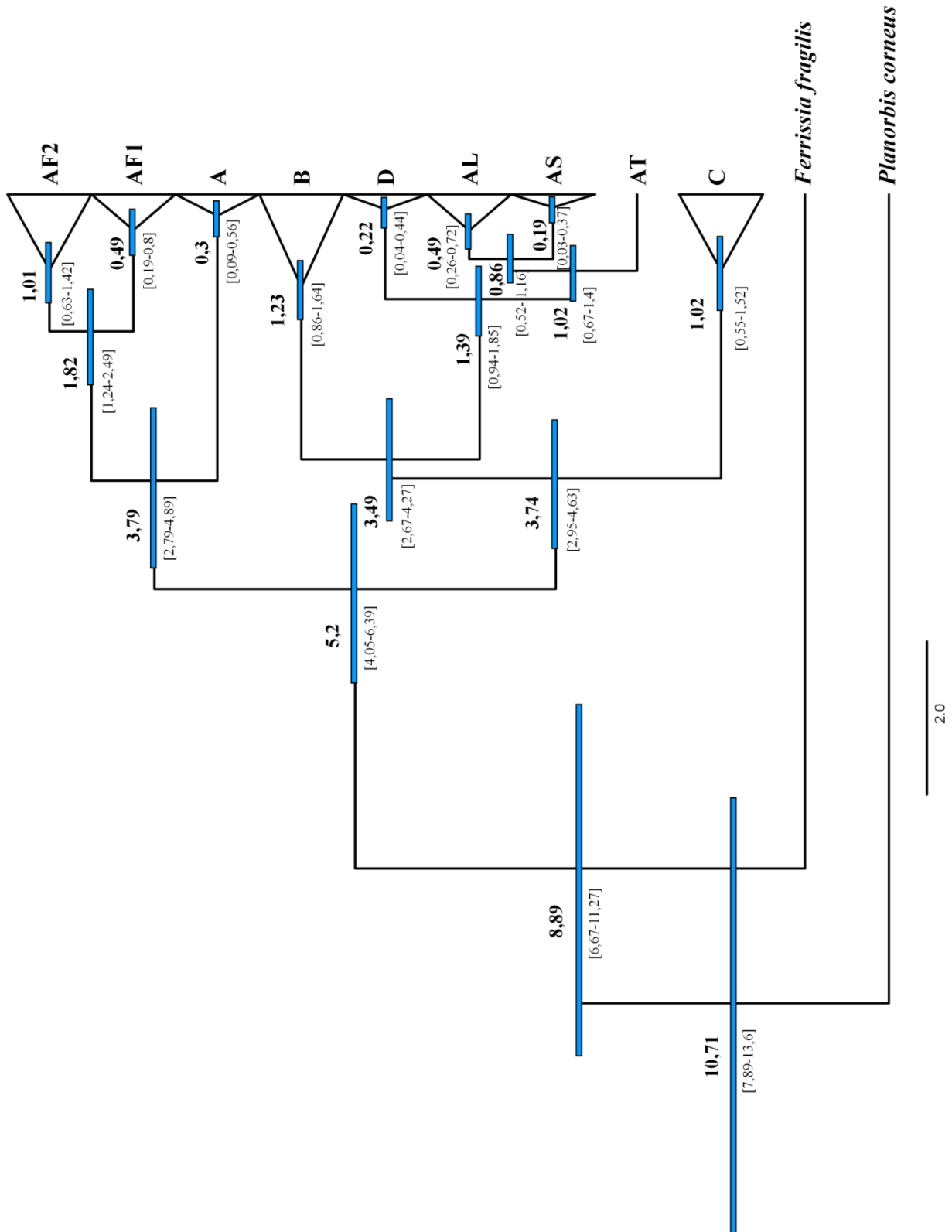
Na filogenetskom stablu jasno se vidi postojanje 8 linija. Unutar AF linije razlikuje se dobro podržana AF1 podlinija u koju između ostalog spada i haplotip iz područja Slovenije (cAF5sAF16) te slabije podržana AF2 podlinija koja uključuje i haplotipove iz rijeke Drave. Linija A dobrom je podrškom odvojena od linije AF. Jako dobro je podržano i odvajanje uzorka iz rijeke Jadro (cC2cC1) od svih ostalih uzoraka iz Italije. Vrlo dobro je podržano i odvajanje linije AT od linija D, AS i AL koje nisu značajno podržane. Linija B jako je dobro podržana svim metodama.

#### 4.3. Procjena vremena divergencije

Vrijednosti procijenjenih vremena divergencije između linija i podlinija prikazana su u Tablici 15. Vremenski kalibrirano filogenetsko stablo za *COI* gen prikazano je na Slici 11.

**Tablica 15.** Procjena vremena divergencije (u milijun godina) na temelju molekularnog sata za *COI* gen.

ČVOROVI	MEDIJAN	95% interval
( <i>Planorbis corneus</i> ) / ( <i>Ferrissia fragilis</i> +AF2+AF1+A+B+D+AL+AS+AT+C)	10,71	7,89-13,6
( <i>Ferrissia fragilis</i> ) / (AF2+AF1+A+B+D+AL+AS+AT+C)	8,89	6,67-11,27
(AF2+AF1+A) / (B+D+AL+AS+AT+C)	5,2	4,05-6,39
(AF2+AF1) / (A)	3,79	2,79-4,89
(AF2) / (AF1)	1,82	1,24-2,49
AF2	1,01	0,63-1,42
AF1	0,49	0,19-0,8
A	0,3	0,09-0,56
(B+D+AL+AS+AT) / (C)	3,74	2,95-4,63
C	1,02	0,55-1,52
(B) / (D+AL+AS+AT)	3,49	2,67-4,27
B	1,23	0,86-1,64
(D) / (AL+AS+AT)	1,39	0,94-1,85
D	0,22	0,04-0,44
(AL+AS) / (AT)	1,02	0,67-1,4
(AL) / (AS)	0,86	0,52-1,16
AL	0,49	0,26-0,72
AS	0,19	0,03-0,37

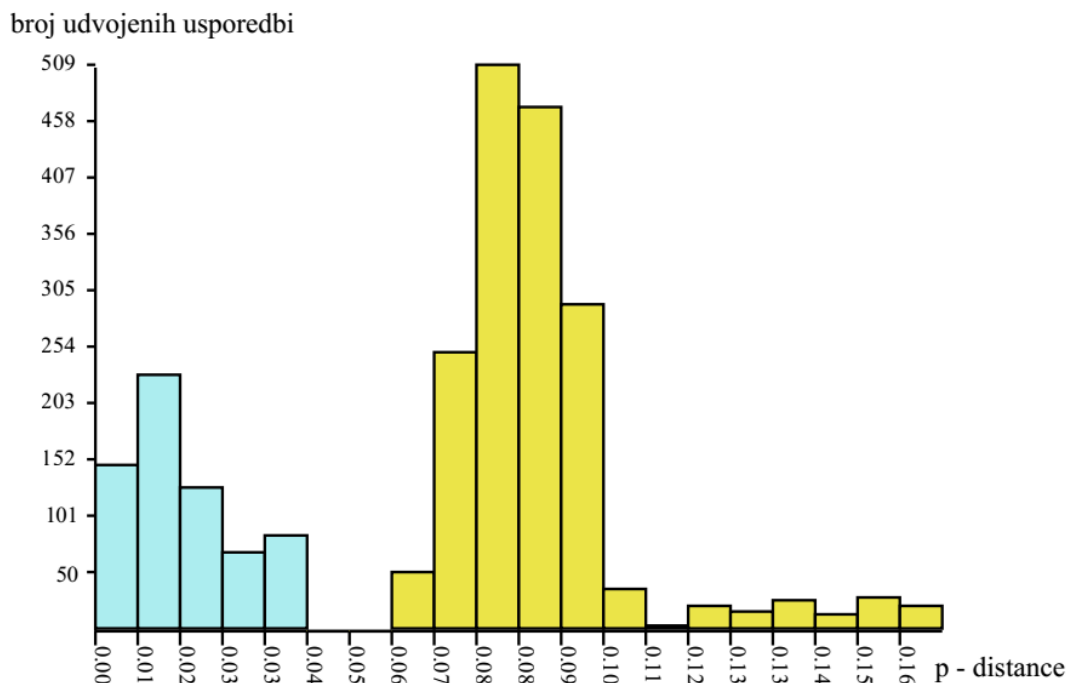


**Slika 11.** Filogenetsko stablo s procijenjenim vremenima divergencija u milijunima godina za *COI*. Vrijeme divergencije između linija i podlinija izračunato je za *COI* gen prema molekularnom satu od 3,2 % promjena po nukleotidu po milijun godina (Wilke i sur. 2009).

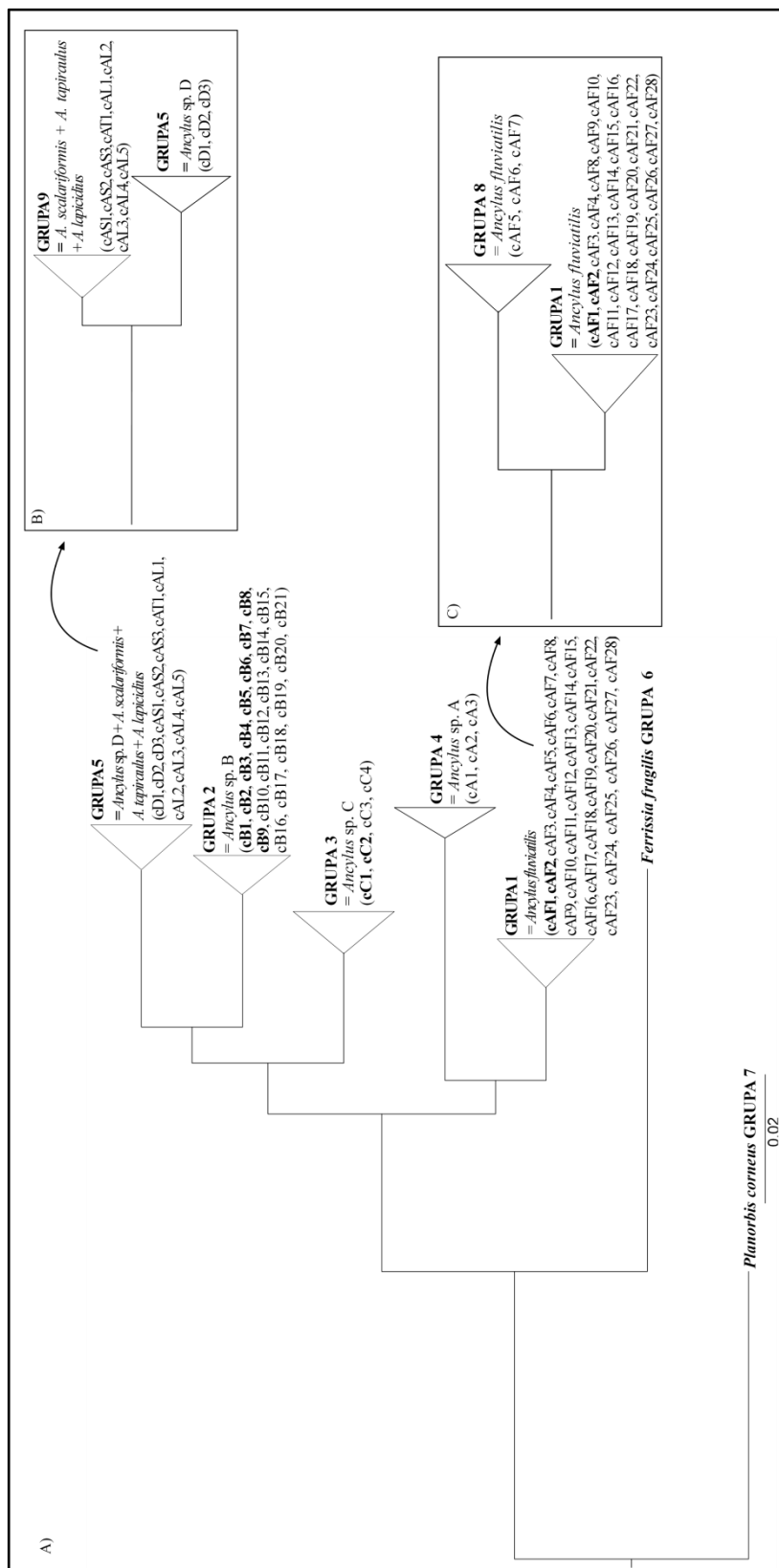
#### 4.4. ABDG analiza

ABGD analiza svrstala je uzorke iz ovog istraživanja u sedam hipotetskih vrsta kod inicijalne particije s maksimalnom vrijednosti intraspecifične udaljenosti od 0,011 (Slika 13 A). Za taj iznos maksimalne intraspecifične udaljenosti neke sigurne vrste, npr. *Ancylus scalariformis*, *Ancylus lapicidus* i *Ancilus tapirulus*, još se ne razdvajaju u posebne grupe. Kod regresivne particije s maksimalnom vrijednosti intraspecifične udaljenosti od 0,00646 uzorci se svrstavaju u osam hipotetskih vrsta. Grupa 1 koja predstavlja vrstu *Ancylus fluviatilis* podijelila se na dvije grupe (Slika 13 B). U jednu grupu svrstavaju se haplotipovi cAF5, cAF6 i cAF7, a u drugu grupu spadaju svi preostali haplotipovi. Kod regresivne particije s maksimalnom vrijednosti intraspecifične udaljenosti od 0,00495 uzorci se svrstavaju u devet hipotetskih vrsta. Grupa 1 ponovo se podijelila na dvije grupe kao i prethodno. Grupa 5 dijeli se također na dvije grupe. U jednu se grupu odvojio *Ancylus* sp. D, a u drugoj su grupi ostali *Ancylus scalariformis*, *Ancylus lapicidus* i *Ancilus tapirulus* (Slika 13 C).

Distribucija učestalosti nekorigiranih udvojenih genetskih distanci prikazana je na histogramu (Slika 12). Između vrijednosti p-distance 0,04-0,06 nalazi se "barkod praznina".



**Slika 12.** Histogram koji prikazuje distribuciju učestalosti nekorigiranih udvojenih genetskih distanci prema ABGD analizi. Na x-osi prikazane su p-distance, a na y-osi broj udvojenih usporedbi. Na lijevoj strani histograma (plava boja) prikazana je intraspecifična, a na desnoj strani (žuta boja) interspecifična varijanca udaljenosti.

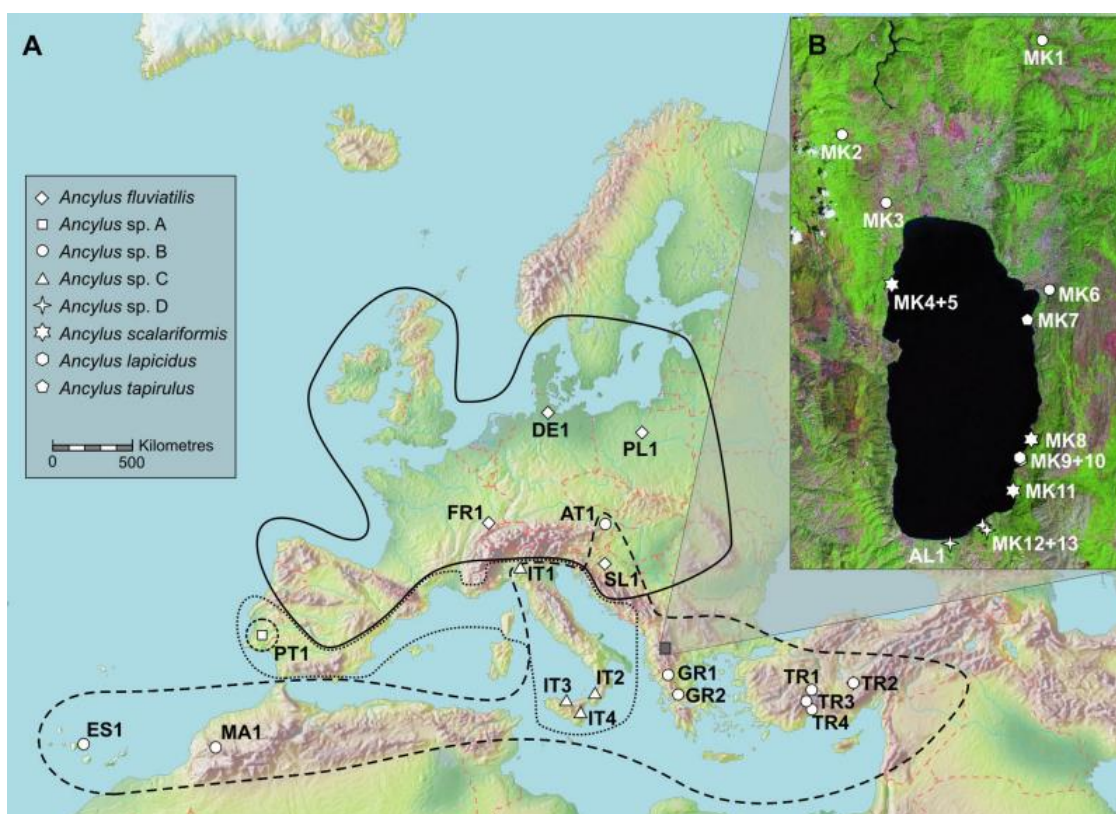


**Slika 13.** Stablo dobiveno ABGD analizom na temelju *COI* seta podataka. A) Hipotetske vrste prema inicijalnoj particiji s maksimalnom vrijednosti intraspecifične udaljenosti od 0,011. B) Hipotetske vrste prema regresivnoj particiji s maksimalnom vrijednosti intraspecifične udaljenosti od 0,00646. C) Hipotetske vrste prema regresivnoj particiji s maksimalnom vrijednosti intraspecifične udaljenosti od 0,00495.



## 5. RASPRAVA

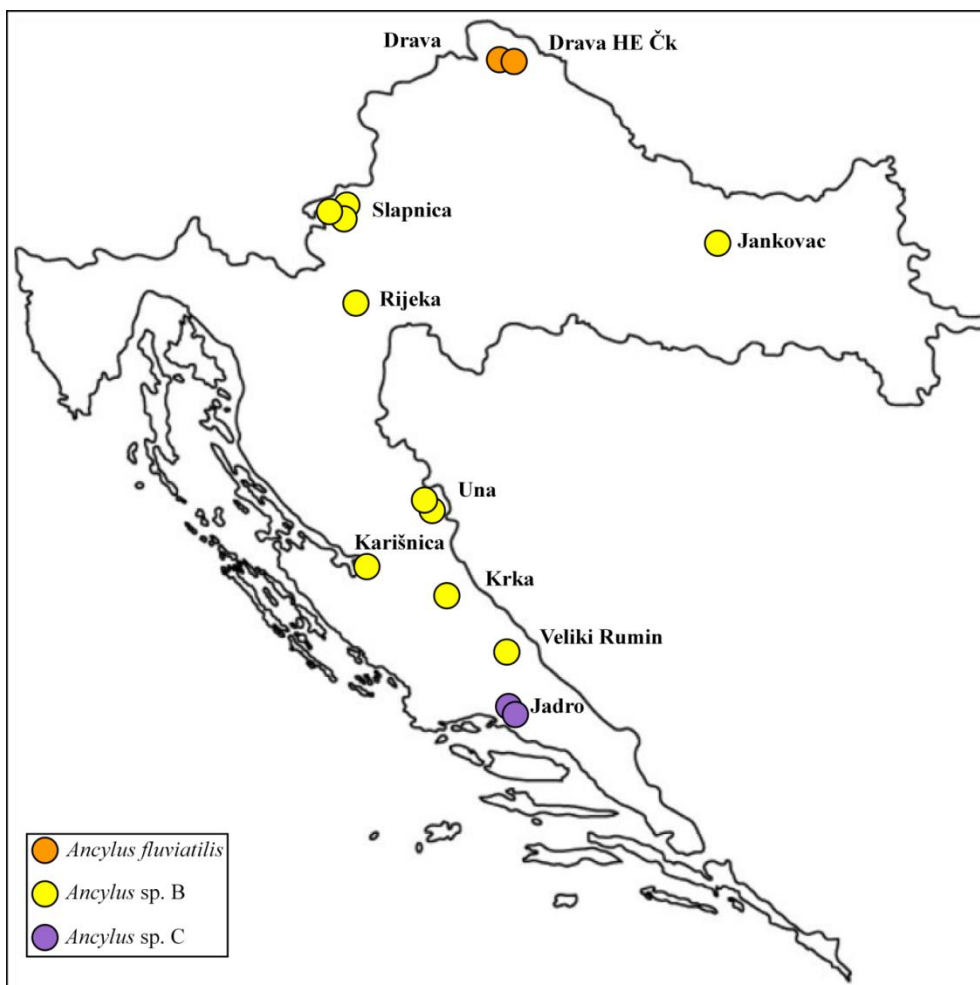
Molekularno genetička istraživanja temeljena na mitohondrijskim i nuklearnim biljezima pokazala su da je *Ancylus fluviatilis sensu lato* filogeografski jako strukturiran (Slika 14) u smislu geografskog rasprostranjenja 5 kriptičnih vrsta koje obuhvaća (Pfenninger 2003a; Albrecht 2006). *Ancylus fluviatilis sensu stricto* (AF) rasprostranjen je na području sjeverozapadne, središnje i istočne Europe. *Ancylus* sp. A (A) je jako lokaliziran te je pronađen samo na području Portugala. *Ancylus* sp. B (B) rasprostranjen je na području zapadne Europe, na Kanarskim otocima i Maroku te na području Italije i Austrije, Balkana i Turske. *Ancylus* sp. C (C) rasprostranjen je duž sjevernih obala Mediterana (Pfenninger i sur. 2003a) dok je *Ancylus* sp. D (D) zasad pronađen samo u makedonskim i albanskim pritocima koji se ulijevaju u Ohridsko jezero (Albrecht i sur. 2006).



**Slika 14.** A) Karta rasprostranjenosti kriptične vrste *Ancylus fluviatilis*; puna linija= *Ancylus fluviatilis* (kladij 1 prema Pfenningeru i sur. 2003a); kratko isprekidana linija= *Ancylus* sp. A (kladij 2 prema Pfenningeru i sur. 2003a); dugo isprekidana linija= *Ancylus* sp. B (kladij 3 prema Pfenningeru i sur. 2003a); točkasta linija= *Ancylus* sp. C (kladij 4 prema Pfenningeru i sur. 2003a). B) Lokacije prikupljanja uzoraka na jezeru Ohrid (preuzeto iz: Albrecht i sur. 2006, originalna karta iz: Pfenninger i sur. 2003a).

Regiju koja obuhvaća Pirinejski poluotok i Maroko nastanjuju čak četiri glavne linije (AF, A, B i C) što ukazuje da su ta područja mogući centri radijacije (Avisé 1994; Pfenninger i sur. 2003a). Raspodjela linija te granica do kojih se pojedine linije rasprostiru uvjetovana je ekološkim čimbenicima, ponajprije temperaturom, precipitacijom i nadmorskom visinom, a ne geografskim barijerama toku gena (Pfenninger i sur. 2003a). Limitirajući faktor za rasprostranjenje *Ancylus fluviatilis* (AF) linije jest temperatura pa se tako najjužnije rasprostire do jugozapada Španjolske, a najsjevernije do Velike Britanije i Norveške. Odgovaraju mu vlažna ljeta s malom evaporacijom, niske srednje godišnje temperature te puno oborina u hladnijem dijelu godine kao i viša nadmorska visina. *Ancylus* sp. B (B) i *Ancylus* sp. C (C) linijama odgovara suho ljeto s višom evaporacijom, viša srednja godišnja temperatura te sezonska pojava oborina, a što se nadmorske visine tiče obitavanju na nižim područjima. Hrvatska se nalazi na dodiru tri glavne filogeografske regije nastanjene vrstama *Ancylus fluviatilis* (AF), *Ancylus* sp. B (B) i *Ancylus* sp. C (C). Uz to raznolike reljefne i klimatske značajke zadovoljavaju različite ekološke zahtjeve različitih vrsta *A. fluviatilis* kompleksa. Stoga nije neočekivano, da su u našem istraživanju uz ranije, na pojedinačnim lokalitetima, zabilježene *Ancylus* sp. B (B) i *Ancylus* sp. C (C) (Pfenninger i sur. 2003a) zabilježen i *Ancylus fluviatilis* (AF). Naše molekularno-filogenetičke analize podržale su postojanje svih pet ranije objavljenih linija unutar *A. fluviatilis* kompleksa, s time da na području Hrvatske dolaze tri različite linije. Uzorci iz rijeke Drave pripadaju u liniju *A. fluviatilis* (AF), uzorci iz Une, Jankovca, Velikog Rumina, Slapnice, Rijeke, Krke i Karišnice u liniju *Ancylus* sp. B (B), a uzorci iz rijeke Jadro u liniju *Ancylus* sp. C (C) (Slika 15). U našem istraživanju, *Ancylus* sp. B haplotipovi nađeni su u područjima različite nadmorske visine i klimatskih obilježja (mediteranske, ali i umjereno-kontinentalne klime) što ne potvrđuje ranije iznešene ekološke zahtjeve te kriptične vrste (Pfenninger i sur. 2003a).

Distribucija ohridskih vrsta nejednolika je te ograničena većinom na litoralnu i sublitoralnu zonu jezera. *A. scalariformis* i *A. tapirulus* nastanjuju sublitoral sjevernog i sjeverozadapnog dijela jezera te su alopatrički odvojeni od vrste *A. lapicidus* koji nastanjuje istočni dio. *A. scalariformis* i *A. tapirulus* većinom obitavaju na 15-30 metara dubine, većinom na školjkašu *Dreissena stankovici* dok je *A. lapicidus* ograničeni na područje litorala od 0-5 m dubine te se ga može naći pričvršćenog na kameni supstrat (Albrecht i sur. 2006).



**Slika 15.** Karta rasprostranjenosti haplotipova uzoraka iz Hrvatske.

Pfenninger i suradnici (2003a) procijenili su da su se linije AF, A, B i C razdvojile u kasnom pliocenu. Rezultati našeg istraživanja ukazuju na prvotnu divergenciju u najranijem pliocenu, prije oko 5,2 milijuna godina (interval pouzdanosti 4,05-6,39) pri čemu su se razdvojili ancesori današnjih AF (AF1 i AF2) i A linija s jedne, te B, D, C, AL, AS i AT s druge strane. Dok su Pfenninger i sur. (2003a) koristili molekularni sat širokog raspona u divergenciji sekvenci u milijun godina od 1–5 %, u našem istraživanju primjenjen je specifičniji molekularni sat, kalibriran za nekoliko protostomičnih linija (Wilke 2009). Sličnu evolucijsku ratu za određivanje vremena razdvajanja endemskih Ohridskih linija koristili su i Albrecht i suradnici (2006). Vrijeme prvotne divergencije korespondira s Mesinskom krizom saliniteta (5.99-5.63 milijuna godina). Mesinska kriza saliniteta prouzrokovala je drastične promjene prema hladnijoj i aridnijoj klimi na području Mediterana (Hsu i sur. 1977). Utjecaj Mesinske krize saliniteta na divergenciju srodnih vrsta ili dubokih intraspecifičnih genetskih

linija zabilježen je u brojnim skupinama organizama kao npr. rakova *Austropotamobius torrentium* (Klobučar i sur. 2013) i *A. pallipes* (Jelic i sur. 2016), gušterica roda *Dinarolacerta* i *Dalmatolacerta* (Podnar i sur. 2014), a također i kod slatkovodnog puža roda *Bythinella* (Osikowski i sur. 2015). Prema našim rezultatima, do daljnjeg razdvajanja linija dolazi prije oko 3,8 milijuna godina. U to se vrijeme razdvaja ancestor današnjih AF (AF1 i AF2) linija od linije A te se razdvaja linija C od ancestoru B, D, AL, AS i AT linija. Ovo razdvajanje objašnjava se putem ekološke specijacije zbog uspostave mediteranske klime, a poznato je da su se zbog tog događaja razdvojile i druge vrste, npr. dvije sestrinske vrste kopnenih puževa *Candidula unifasciata* i *C. rugosiuscula* (Pfenninger i sur. 2003b). Sljedeća bitna razdvajanja prema našem istraživanju desila su se u vremenu od 1-1,82 milijuna godina što odgovara početku srednje pleistocenske tranzicije (MPT, eng. *Middle Pleistocene Transition*). Srednja pleistocenska tranzicija označava granicu između ranog i srednjeg pleistocena (1,25- 0,70 milijuna godina), a karakterizira je početak intenzivne glacijacije (Clark, 2012). U vremenu od prije oko 1,82 milijuna godina došlo je do razdvajanja AF1 i AF2 linija, prije oko 1,39 milijuna godina razdvojila se linija D od ancestoru linija AL, AS i AT te prije oko 1,02 milijuna godina razdvojila se linija AT od ancestoru linija AL i AS.

Iako se većina objavljenih *Ancylus* sekvenci odnosi na 16S rRNA gen, naši rezultati temeljeni su većinom na analizi *COI* slijedova ili konkateneranih *COI+16S rRNA* slijedova s obzirom na to da su analize temeljene na *16S rRNA* sekvencama rezultirale vrlo slabim podrškama. Razlog tomu su vjerojatno kratka područja preklapanja ranije objavljenih sekvenci. No sama razdvajanja linija bila su podudarna za sve korištene setove podataka.

Naš set podataka jest intraspecifičan kojeg kao takvog karakterizira nizak stupanj različitosti i manji broj značajki za analize, prisutnost ancestralnih haplotipova koji koegzistiraju s haplotipovima koji su iz njih nastali, pojava stvarne politomije, prisutnost retikulacije i veliki set podataka koji obuhvaća veliki broj populacija i više predstavnika za svaku populaciju. Na takav set podataka za razrješavanje međusobnih odnosa bolje je primijeniti metodu filogenetske mreže nego filogenetskog stabla. Filogenetske mreže napravljene su za *COI* set podataka te one prikazuju sedam zasebnih skupina haplotipova. Može se uočiti kako iz haplotipa cAF23 proizlazi šest drugih haplotipova te on kao takav predstavlja centar radijacije. Jedan od tih šest haplotipova jest i haplotip iz rijeke Drave. TCS analiza također odvaja AF grupu i C grupu na dvije podgrupe kao što je to vidljivo i iz filogenetskog stabla. Unutar B grupe odvaja se zasebno samo jedan haplotip, cB10, koji se u filogenetskom stablu pojavljuje kao sestrinska grupa svim ostalim haplotipovima. Područje

rasprostranjenja linije *Ancylus* sp. B (B) veoma je zanimljivo iz razloga što nastanjuje prostore koji malo toga imaju zajedničko u geološkoj prošlosti, npr. Kanarski otoci koji su vulkanskog podrijetla i koji nikada nisu bili u doticaju s kontinentom. Kako naseljavanje ovih otoka nije moguće putem vodotokova, jedino objašnjenje jest pasivni transport. Pokazano je da vektori za širenje mogu biti kukci, vodene ptice ili neki drugi organizmi (Pfenninger i sur. 2003a; Coredllier i Pfenninger 2008; Macher i sur. 2016). Na taj se način različite vrste ili divergentne linije iste vrste mogu pronaći na istom lokalitetu. Moguće je da je do takvog transporta došlo između populacija iz Rijeke i Slapnice pošto jedan od uzoraka iz Slapnice ima identičan haplotip kao uzorci iz Rijeke i Une. Pasivnim transportom, najvjerojatnije pticama, jedino se može objasniti i velik sličnost haplotipova geografski vrlo udaljenih lokaliteta različitih slivova, Karišnice i Jankovca. Kontakt između ta dva sliva bio bi hipotetski moguć samo preko rijeke Une. No međutim, haplotipovi nađeni u Uni vrlo su različiti. Ostala grupiranja u skladu su s geografskim položajem lokaliteta i pripadnosti slivu.

Detaljniju filogeografsku analizu onemogućila nam je činjenica da iz postojeće literature za veliki broj *COI* haplotipova nije moguće sa sigurnošću utvrditi niti geografsko izvorište, niti frekvenciju pojavljivanja. Stoga u filogeografskim mrežama frekvencije haplotipova nisu prikazane. S druge strane, pokušaj konstrukcije filogenetske mreže na temelju *16S rRNA* seta podataka, iz gore opisanih razloga, rezultirao je nerazlučenom mrežom s velikim brojem omči.

Analiza genetske udaljenosti korištenjem genskih biljega za *COI* i *16S rRNA* dala je slične rezultate. Kako je brzina evolucije *16S rRNA* gena sporija od evolucije *COI* gena dobivene vrijednosti genetske udaljenosti sukladno tome su niže.

ABGD analiza daje od sedam do devet hipotetskih vrsta, ovisno o vrijednosti maksimalne intraspecifične udaljenosti što može značiti da možda postoje dodatne kriptične vrste. Ovom analizom razdvajanje AF linije u dvije podlinije jest podržano dok razdvajanje unutar C linije nije podržano. Analiza ne razdvaja ohridske AL, AS i AT linije no one su neupitno razdvojene vrste nastale intralakustičkom specijacijom u jezeru Ohrid. Ovaj naš rezultat dodatno govori u prilog opravdanosti podizanja kriptičnih *Ancylus* linija na nivo vrste.

Ovim istraživanjem nisu obuhvaćeni svi lokaliteti na području Hrvatske na kojima obitava *Ancylus fluviatilis* pa bi zato u budućim istraživanjima trebalo obuhvatiti više jedinki i više različitih lokaliteta. Na taj bi se način dobio jasniji uvid u rasprostranjenje kriptičnih vrsta ovog kompleksa.

Dobro poznavanje rasprostranjenosti neke vrste, njezinih ekoloških zahtjeva i stanja populacija bitno je kako bi se mogla učinkovito planirati zaštita vrsta i ekosistema. Sve brže klimatske promjene mijenjaju uvjete u okolišu te prisiljavaju vrste ili na prilagodbu ili na izumiranje. Molekularna istraživanja mogu pridonijeti razumjevanju utjecaja klimatskih promjena na biološku raznolikost. Na ovom primjeru se vidi koliko je važno provesti molekularna istraživanja, a u slučaju kriptičnih vrsta ovo je jedini način da se otkriju razlike pošto morfološka istraživanja nisu dovoljna (Macher i sur. 2016).

## 6. ZAKLJUČAK

---

- Molekularno-filogenetičke analize pokazale su da populacije *Ancylus fluviatilis sensu lato* iz Hrvatske pripadaju u tri grupe, *Ancylus fluviatilis sensu stricto*, *Ancylus* sp. B i *Ancylus* sp. C.
- Filogeografski uzorak grupa *Ancylus* sp. B na području Hrvatske karakterizira postojanje četiri plitko odijeljene, geografski slabo strukturirane genetske podlinije. Uočeni uzorak vjerojatno je posljedica lakog rasprostiranja vrste pasivnim transportom na velike udaljenosti kao i specifičnim ekološkim zahtjevima.
- S obzirom da genetske udaljenosti između dvije podgrupe grupe *Ancylus fluviatilis* (AF1 i AF2) premašuju one između formalno opisanih endemičnih ohridskih vrsta, broj kriptičnih *Ancylus* vrsta mogao bi u budućnosti biti i veći. S obzirom da haplotip pronađen na dva hrvatska lokaliteta u Dravi pripada drugoj podgrupi od onog pronađenog u Sloveniji, prisutnost obje podgrupe u Hrvatskoj pa tako i još jedne potencijalno kriptične vrste, ne može se isključiti.
- U budućim istraživanjima trebalo bi proširiti analize na veći broj lokaliteta te analizirati veći broj jedinki po lokalitetu da bi se što točnije utvrdila rasprostranjenost ovih kriptičnih vrsta u Hrvatskoj.
- Poželjno je također u analizu uključiti i jezgrine molekularne biljege koji bi omogućili utvrđivanje i opseg eventualne hibridizacije između linija ili divergentnih haplotipova unutar iste linije na istom lokalitetu.

## 7. LITERATURA

---

- Albrecht C., Wilke T., Kuhn K., Streit B. (2004): Convergent evolution of shell shape in freshwater limpets: the African genus *Burnupia*. *Zoological Journal of the Linnean Society* **140**: 577-586.
- Albrecht C., Trajanovski S., Kuhna K., Streit B., Wilke T (2006): Rapid evolution of an ancient lake species flock: Freshwater limpets (Gastropoda: Ancyliidae) in the Balkan Lake Ohrid. *Organisms, Diversity & Evolution* **6**: 294–307.
- Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. (1990): Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**: 403-410.
- Avise J. C. (1994): *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman & Hall, New York.
- Avise J. C., Arnold J., Ball R. M., Bermingham E., Lamb T., Neigel J. E., Saunders N. C. (1987): Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**: 489-522.
- Avise J. C. (2000): *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press.
- Baxevanis A. D, Oullette B. F. F. (2001): *Bioinformatics: a practical guide to the analysis of genes and proteins*. Second edition. Wiley-Interscience.
- Bensasson D., Zhang D., Hartl D. L., Hewitt H. G. (2001): Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends in Ecology & Evolution* **16**: 314-321.
- Bermingham E., Moritz C. (1998): *Comparative phylogeography: concepts and applications*. *Molecular Ecology* **7**: 367- 369.
- Bouchet P. (2007): *Inventorying the molluscan fauna of the world: How far to go?* U: Jordaens K., van Houtte N., van Goethem J., Backeljau T. (ur.) *Abstracts of the World Congress of Malacology*, Antwerp, Belgium.
- Bouchet P., Rocroi J. (2005): *Classification and nomenclator of gastropod families*. Hackenheim, Germany: ConchBooks.
- Boykin L. M., Kubatko L. S., Lowrey T. K. (2010): Comparison of methods for rooting phylogenetic trees: A case study using *Orcuttieae* (Poaceae: Chloridoideae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **54**: 687–700.



- Calow P. (1973): The Food of *Ancylus fluviatilis* (Müll.), a Littoral Stone-Dwelling, Herbivore. *Oecologia* **13**: 113-133.
- Clark P. U. (2012): Ice sheets in transition. *Science* **337**: 656-658.
- Clement M., Posada D., Crandall K. A. (2000): TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* **9**: 1657-1659.
- Cuttelod A., Seddon M., Neubert E. (2011): European Red list of Non-marine Molluscs. Luxembourg: Publications Office of the European Union.
- Darriba D., Taboada G. L., Doallo R., Posada D. (2012): jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* **9**: 772.
- Dillon R. T. (2004): The ecology of freshwater molluscs. Cambridge: Cambridge University Press.
- Dowell K. (2008): Molecular Phylogenetics. An introduction to computational methods and tools for analyzing evolutionary relationships. [http://www.math.umaine.edu/~khalil/courses/MAT500/papers/MAT500\\_Paper\\_Phylogenetics.pdf](http://www.math.umaine.edu/~khalil/courses/MAT500/papers/MAT500_Paper_Phylogenetics.pdf)
- Drummond A. J., Suchard M. A., Xie D., Rambaut A. (2012): Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* **29**: 1969-1973.
- Emerson B. C., Hewitt G. M. (2005): Phylogeography. *Current Biology* **15**: 367-371.
- Encyclopeia of Life (2014): *Ancylus fluviatilis*. [http://eol.org/data\\_objects/29831474](http://eol.org/data_objects/29831474), pristupljeno: 15. srpnja 2016.
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. (1994): DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology Biotechnology* **3**: 294-299.
- Geldiay R. (1956): Studies on the local populations of the freshwater limpet *Ancylus fluviatilis*. *Journal of Animal Ecology* **25**: 389-402.
- Gold D. (2016): How to Build A Snail. [Bioblueprints.blogspot.hr](http://bioblueprints.blogspot.hr/2010/11/how-to-build-snail-raphaela-osterauer.html). <http://bioblueprints.blogspot.hr/2010/11/how-to-build-snail-raphaela-osterauer.html>, pristupljeno: 8. srpnja 2016.
- Habdija I., Primc Habdija B., Radanović I., Špoljar M., Matoničkin Kepčija R., Vujčić Karlo S., Miliša M., Ostojić A., Sertić Perić M. (2011): Protista - Protozoa i Metazoa - Invertebrata. *Strukture i funkcije*. Alfa, Zagreb.

- Hajibabaei M., Singer G. A. C., Hebert P. D. N., Hickey D. A. (2007): DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics* **23**: 167-72.
- Hall T. A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**: 95-98.
- Hebert P. D. N., Cywinska A., Ball S. L. (2003a): Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B* **270**: 313–321.
- Hebert P. D. N., Ratnasingham S., deWaard J. R., (2003b): Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B* **270**: 96–99.
- Hickerson M. J., Carstens B. C., Cavender-Bares J., Crandall K. A., Graham C. H., Johnson J. B., Rissler L., Victoriano P. F., Yoder A. D. (2009): Phylogeography's past, present, and future: 10 years after *Avise*, 2000. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **54**: 291–301.
- Hsu K. J., Montadert L., Bernoulli D., Cita M. B., Erickson A., Garrison R. E., Kidd R. B., Melieres F., Muller C., Wright R. (1977): History of the Mediterranean salinity crisis. *Nature* **267**: 399– 403.
- Hwang U. W., Kim W. (1999): General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *The Korean Journal of Parasitology* **37**: 215-228.
- Innis M. A., Gelfand D.H. (1990): Optimization of PCRs. U: Innis, Gelfand, Sninsky, White (ur.): *PCR Protocols*. Academic Press, New York, str. 3-12.
- 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). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **103**: 26-40.
- Jørgensen A., Kristensen T. K., Stothard J. R. (2004): An investigation of the “Ancyloplanorbidae” (Gastropoda, Pulmonata, Hygrophila): preliminary evidence from DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **32**: 778–787.
- Kinene T., Wainaina J., Maina S., Boykin L. M. (2016): Rooting Trees, Methods for. U: Kliman, R. M. (ed.): *Encyclopedia of Evolutionary Biology* **3**: 489–493. Oxford: Academic Press.

- Klobučar G., 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*. *Freshwater Biology* **58**: 1089-1105.
- Klussmann-Kolb A., Dinapoli A., Kuhn K., Streit B., Albrecht C. (2008): From sea to land and beyond – New insights into the evolution of euthyneuran Gastropoda (Mollusca). *BMC Evolutionary Biology* **8**: 57.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K (2016): MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* **33**: 1870-1874.
- Larkin M. A., Blackshields G., Brown N. P., Chenna R., McGettigan P. R., McWilliam H., Valentin F., Wallace I. M., Wilm A., Lopez R., Thompson J. D., Gibson T. J., Higgins D. G. (2007): ClustalW ad ClustalX version 2. *Bioinformatics* **23**: 2947-2948.
- Lemey P., Salemi M., Vandamme A. M. (2010): *The Phylogenetic Handbook, A practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing (second edition)*. UK: Cambridge University Press.
- Lydeard C., Cowie R. H., Bogan A. E., Bouchet P., Cummings K. S., Frest T. J., Herbert D. G., Hershler R., Gargominy O., Perez K., Ponder W. F., Roth B., Seddon M., Strong E. E., Thompson F. G. (2004): The global decline of non-marine mollusks. *BioScience* **54**: 321-330.
- Macher J. N., Weiss M., Beermann A. J., Leese F. (2016): Cryptic diversity and population structure at small scales: The freshwater snail *Ancylus* (Planorbidae, Pulmonata) in the Montseny mountain range. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology* **52**: 387-399.
- Narodne novine 80/2013. Pravilnik o strogo zaštićenim vrstama. Prilog I.
- Nei M., Kumar S. (2000): *Molecular Evolution and Phylogenetics*, Oxford University Press, New York.
- Nicolè S., Negrisola E., Eccher G., Mantovani R., Patarnello T., Erickson D. L., Kress W. J., Barcaccia G. (2012): Seafood Authentication by DNA Barcoding, *Food Technology and Biotechnology* **50**: 387–398.

- Osikowski A., Georgiev D., Hofman S., Falniowski A. (2015): Does the genetic structure of spring snail *Bythinella* (Caenogastropoda, Truncatelloidea) in Bulgaria reflect geological history? *Zookeys* 25: 67-86.
- Page R. D. M., Holmes E. C. (1998): *Molecular Evolution, A phylogenetic approach*. Blackwell Science Ltd., Blackwell Publishing company.
- Palaeos (2002): Life Trough Deep Time. <http://www.palaeos.com>, pristupljeno: 7. srpnja 2016.
- Patwardhan A., Ray S., Roy A. (2014): Molecular Markers in Phylogenetic Studies-A Review. *Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology* 2: 131.
- Pfenninger M., Bugert M. (2001): Dynamic microsatellites in transcribed regions of gastropod mitochondrial 16S rDNA. *Genome* 44: 163-166.
- Pfenninger M., Staubach S., Albrecht C., Streit B., Schwenk K. (2003a): Ecological and morphological differentiation among cryptic evolutionary lineages in freshwater limpets of the nominal form-group *Ancylus fluviatilis* (O. F. Müller, 1774). *Molecular Ecology* 12: 2731-2745.
- Pfenninger M., Eppenstein A., Magnin F. (2003b): Evidence for ecological speciation in the sister species *Candidula unifasciata* (Poiret, 1801) and *C. rugosiuscula* (Michaud, 1831) (Helicellinae, Gastropoda). *Biological Journal of the Linnean Society* 79:611–328.
- Podnar M., Bruvo Mađarić B., Mayer W. (2014): Non-concordant phylogeographical patterns of three widely codistributed endemic Western Balkans lacertid lizards (Reptilia, Lacertidae) shaped by specific habitat requirements and different responses to Pleistocene climatic oscillations. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 52: 119-129.
- Ponder W., Lindberg D. R. (2008): *Phylogeny and Evolution of the Mollusca*. University of California Press, Berkeley.
- Posada D., Crandall, K. A. (2001): Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology & Evolution* 16: 37-45.
- Primrose S., Twyman, R. (2006): *Principles of gene manipulation and genomics*. Malden, MA: Blackwell Pub.
- Puillandre N., Lambert A., Brouillet S., Achaz G. (2011): ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology* 21: 1864-77.
- Rambaut A., Drummond A. J. (2009): Tracer v.1.5. [Online].

- Ronquist F., Huelsenbeck J. P. (2003): MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**: 1572-1574.
- Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich H. A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491
- Seddon M., Albrecht C., Van Damme D. (2012): *Ancylus fluviatilis*. The IUCN Red List of Threatened Species.
- Simon C., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H., Flook, P. (1994): Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America* **87**: 651-701.
- Srkoč M. (2015): Taksonomska analiza i rasprostranjenost slatkovodnih puževa iz Zbirke Zoologijskog zavoda. Diplomski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
- Strong E. E., Gargominy O., Ponder W. F., Bouchet P. (2008): Global diversity of gastropods (Gastropoda; Mollusca) in freshwater. *Hydrobiologia* **595**: 149-166.
- Templeton A. R., Crandall K. A., Sing C. F. (1992): A Cladistic Analysis of Phenotypic Associations With Haplotypes Inferred From Restriction Endonuclease Mapping and DNA Sequence Data. III. Cladogram Estimation. *Genetics* **132**: 619-633.
- Thorp J. H., Covich A. P. (2010): *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates*. Academic Press, Amsterdam.
- Villesen P. (2007): FaBox: an online toolbox for fasta sequences. *Molecular Ecology Notes* **7**: 965-968.
- Walther A. C., Lee T., Burch J. B., Foighil D. O. (2006): E pluribus unum: A phylogenetic and phylogeographic reassessment of *Laevapex* (Pulmonata: Ancyliidae), a North American genus of freshwater limpets. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **40**: 501-516.
- Waugh J. (2007): DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *BioEssays* **29**: 188-197.
- Wilke T., Schultheiß R., Albrecht, C. (2009): As Time Goes by: A Simple Fool's Guide to Molecular Clock Approaches in Invertebrates. *American Malacological Bulletin* **27**: 25-45.

- Xiong J. (2006): Essential Bioinformatics. Cambridge University Press, Published in the United States of America by Cambridge University Press, New York. The Edinburgh Building, Cambridge, UK.
- Zuckerkandl E., Pauling L. (1965): Molecules as Documents of Evolutionary History. The Journal of Theoretical Biology **8**: 357-366.

Internetski izvori:

- <http://www.fauna-eu.org/>, pristupljeno: 15. srpnja 2016.
- <http://www.rhoen.quellen-grundwasser.de/en/fauna.html>, pristupljeno 15. srpnja 2016.
- [http://www.ganfyd.org/images/archive/d/d6/20100130225953!Human\\_Mitochondrial\\_DNA\\_en.svg](http://www.ganfyd.org/images/archive/d/d6/20100130225953!Human_Mitochondrial_DNA_en.svg), pristupljeno 20. kolovoza 2016.
- <http://www.hpm.hr/Znanost/CroBOL%20-%20Hrvatska%20inicijativa%20za%20barkodiranje%20života>, pristupljeno 4. studenog 2016.

## 8. ŽIVOTOPIS

---

### **Kristina Kocijan**

- Uska ulica 36, Gornji Kuršanec, Hrvatska
- 098 1634 630
- kristina.kocijan92@gmail.com

### **Datum i mjesto rođenja:**

- 10.7.1992., Varaždin

### **Završeno obrazovanje:**

- Diplomski studij eksperimentalne biologije, Biološki odsjek; Prirodoslovno - matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- Preddiplomski studij znanosti o okolišu; Biološki odsjek; Prirodoslovno - matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- Druga gimnazija Varaždin, Varaždin
- Osnovna škola Nedelišće

### **Vannastavni program:**

- Sudjelovanje u popularno-znanstvenoj manifestaciji „Noć biologije“ (2012., 2013., 2016.)