

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

Marn, Nina

Master's thesis / Diplomski rad

2009

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:279894>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-03**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Nina Marn

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

Diplomski rad

Zagreb, 2009

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

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

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

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

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

Nina Marn

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

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

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

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

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

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

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

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

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

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

Zamjena: doc. dr. sc. Ivana Maguire

Rad je prihvaćen: 03. 06. 2009.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation thesis

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

Nina Marn

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

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

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

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

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

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

Thesis deposited in Central biological library.

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

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

Assistant supervisor: Dr. Sc. Damjan Franjević

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

Dr. Mirjana Pavlica, Prof.

Dr. Božena Mitić, Prof.

Substitute: Dr. Ivana Maguire, Asst. Prof.

Thesis accepted: 03. 06. 2009.

Sadržaj:

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

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

UVOD

1.1. PORODICA ASTACIDAE

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

1.1.1. Sistematski položaj porodice Astacidae i njena taksonomija

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

Sistematika:

Koljeno: ARTHROPODA – lankonošci
 Razred: CRUSTACEA – rakovi
 Red: DECAPODA – desetonošci
 Podred: ASTACIDA
 Natporodica: ASTACOIDEA
 Porodica: CAMBARIDAE
Porodica: ASTACIDAE
 Rod: *ASTACUS*
 Rod: *AUSTROPOTAMOBIVS*
 Natporodica: PARASTACOIDEA
 Porodica: PARASTACIDAE

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

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

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

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

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

1.1.2. Filogenetsko podrijetlo porodice Astacidae i naseljavanje voda na kopnu

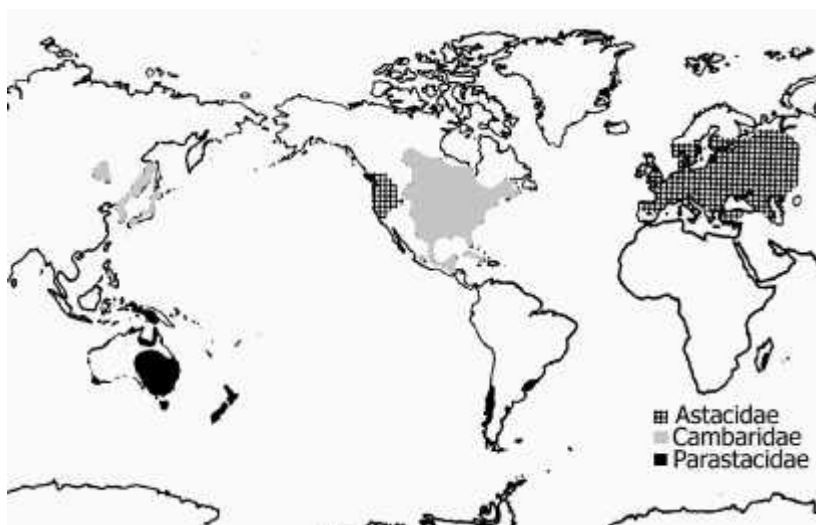
Zadnjih stotinu godina me u astakolozima se vodi rasprava da li slatkovodni rakovi dijele zajedni ko filogenetsko podrijetlo i u koliko su navrata naselili slatke vode.

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

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

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

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



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

1.1.3. Astacidae u Europi

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

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

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



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

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

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

1.1.4. Astacidae u Hrvatskoj

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

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

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

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

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



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

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

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

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



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

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

mnogim hranidbenim lancima kopnenih voda i važna su karika u kruženju organskih tvari (Creed, 1994; Nyström i sur., 1996). Razmnožavanje se odvija u jesen, a reproduksijski ciklus ovisi o klimi i uvjetima staništa. Tipično stanište poto nog raka smješteno je na višim nadmorskim visinama u hladnim, nešto bržim potocima, a najbitniji faktor pri biranju staništa upravo je supstrat na dnu vodotoka (Stucki i Romer, 2001). Ova vrsta preferira staništa s mnoštvom zaklona ili mogu noš u da ih rakovi sami iskopaju. Glavni uzroci nestanka poto nog raka posljedica su ljudskog djelovanja – uništavanje staništa i geografska separacija i izolacija staništa. Najčešće nema rekolonizacije nakon što nestane lokalna populacija (Bohl, 1997). Pri izradi planova za očuvanje ili ponovno unošenje vrste na neko područje treba što to nije odrediti genetsku strukturu populacija, kako bi se spriječio unošenje genetskih različitih grupa jedinki u isti hidrogeografski bazen (Grandjean i Souty-Grosset, 2000). Također, dobri rezultati se postižu ako su jedinke izabrane za reintrodukciju najbolje prilagođene staništu.

1.2. FILOGENIJA

Filogenija je znanstvena disciplina koja se bavi proučavanjem evolucijskog srodstva između različitih grupacija organizama. To je hijerarhijska klasifikacija prema kojoj je svaki oblik života na neki način povezan sa svim ostalim oblicima života. Proučavanje se zasniva na morfološkim, fiziološkim, genetskim i etološkim obilježjima pojedinih taksona.

Poznato je da se organizmi prilagođavaju uvjetima u okolišu na različite načine, a neke od tih prilagodbi imaju utjecaj na morfologiju organizma. Iako postoje prilagodbe koje se mogu objasniti samo genotipskom, odnosno fenotipskom varijabilnošću, u većini slučajeva oba ova mehanizma imaju bitni značaj i treba ih uzeti u obzir. Prema Swain i Foote (1999) varijacije u morfologiji nisu nužno povezane s varijacijama genotipa, ali fenotipske promjene mogu ukazivati na dulju odvojenost i potpuno diferencijacije i prilagodbe specifičnim novim uvjetima i to bez promjene genotipa. Zbog toga se morfometrijske metode mogu pokazati pogodnijima za istraživanje kratkoročnih posljedica utjecaja okoliša ili potpuno diferencijacije nego što su genetska istraživanja. Rezultati morfometrijskih mjerenja mogu se koristiti za odvajanje populacija ili dijelova populacija, a multivarijantna diskriminantna analiza može se primijeniti kako bi se izdvojile one morfološke značajke koje karakteriziraju pojedinu populaciju i na temelju kojih se populacije jasno razdvajaju (Sint i sur., 2005).

Međutim, iako je specijacija proces u kojem su genetske razlike između srodnih populacija usko vezane uz sekundarno stjecanje morfoloških razlika, u nekim slučajevima srodne vrste mogu nakupljati genetske razlike bez istovremenih morfoloških promjena. U takvim slučajevima, razlikovanje vrsta prema morfološkim karakteristikama može biti otežano ili nemoguće, te je potrebno upotrijebiti molekularne metode (Franjević, 2006). Time se bavi

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

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

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

1.2.1. Filogenetska stabla

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

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

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

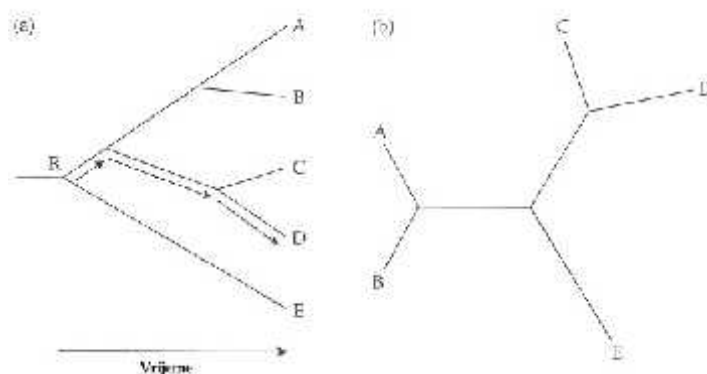
- a) vanjski korovi – predstavljaju taksonomske jedinice koje proučavamo (*operational taxonomic units - OTU*)
- b) unutarnji korovi – predstavljaju hipotetske zajedničke pretke taksonomskih jedinica koje proučavamo (*hypothetical taxonomic units - HTU*)

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

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

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

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



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

Za ukorjenjivanje filogenetskih stabala naj eš e se koristi vanjska grupa (*outgroup rooting*). Ona nije lan analizirane grupe taksonomskih jedinica, nego je to neka taksonomska jedinica za koju sa sigurnoš u znamo da se odvojila u evolucijskoj prošlosti ranije od taksonomskih jedinica koje prou avamo. Vanjsku grupu izabiremo proizvoljno vode i ra una da ne bude u predalekoj vezi s ostalim taksonomskim grupama, ali i da ne bude previše srodna sa taksonomskim grupama koje prou avamo, jer tada gubi svoju funkciju. Filogenetsko stablo možemo ukorijeniti i bez upotrebe vanjske grupe pomo u srednje to ke (*midpoint rooting*). Polazi se od pretpostavke da je u estalost evolucijskih promjena sli na za sve promatrane taksonomske jedinice duž stabla. Ukorjenjivanje filogenetskog stabla bitan je proces jer nam omogu ava razlikovanje pleziomorfnih (ancestralnih) osobina od apomorfnih (izvedenih) osobina. Ako na ukorijenjeno filogenetsko stablo ukomponiramo potdake dobivene pomo u molekularnog sata, a prou avane jedinice

Geni usko srodnih vrsta zovu se homologni geni i obično se razlikuju samo u točkastim mutacijama koje su najčešće na poziciji trećeg kodona. Iz toga proizlazi činjenica da treća pozicija na kodonu ima bržu evolucijsku stopu od prve i druge pozicije i iz tog razloga ima veću značajku u filogenetičkim istraživanjima. Mutacijska stopa kod nukleotidnih sekvenci i proteina je različita. Nukleotidne sekvence mutiraju brže, pa su bolje za određivanje evolucijskih odnosa među srodnim vrstama, dok su proteinske sekvence bolje za utvrđivanje srodstvenih odnosa na višim sistematskim kategorijama (Vandamme, 2004).

Za rekonstrukcije filogenetskih stabala ne postoji jedinstvena metoda koja bi bila prihvatljiva u svim slučajevima niti najbolja metoda za pojedini slučaj. Umjesto toga koristi se nekoliko različitih metoda i pristupa u filogenetskoj rekonstrukciji kako bi se povećala vjerodostojnost dobivenih rezultata. Metode filogenetske rekonstrukcije možemo podijeliti u četiri glavne grupe, ovisno o tome koriste li se diskretni podaci («*Character-state*» metode) ili matrice udaljenosti (*Distance Matrix*) među parovima, te grupiraju li se pojedini podaci postepeno (uzastopno grupiranje - *Stepwise clustering*) i tako daju samo jedno moguće stablo, ili se u obzir uzimaju sva teoretski moguća stabla (iscrpna pretraga - *Exhaustive search*).

Prikaz najčešće korištenih metoda dan je u Tablici 1.

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

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

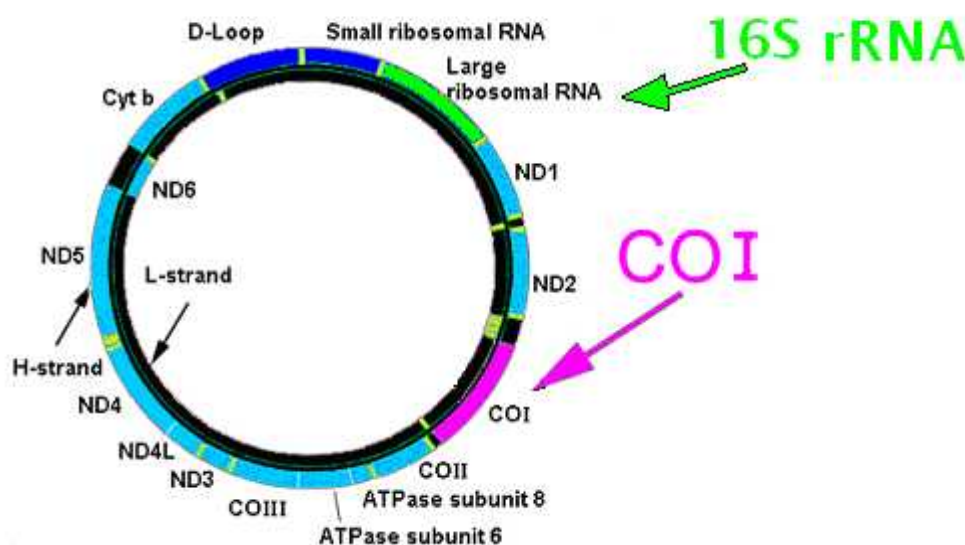
Bayesian analiza – Zaključivanje pomoću Bayesovog teorema relativna je novost u filogeniji (Rannala i Yang, 1996; Mau i Larget, 1997; Li i sur., 2000). Zaključak se temelji na prethodnim spoznajama o podacima i njihovoj distribuciji (*prior expectation/ prior distribution*), koriste i naknadne vjerojatnosti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

1.3. MITOHONDRIJSKI GENOM

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

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

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



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

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

1.3.1. Gen za 16S rRNA

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

Ovaj gen za rRNA često se upotrebljava u molekularno filogenetskim istraživanjima, usprkos toga što se značajan broj različitih gena nalazi i u sastavu jezgrine DNA. Razlog tome je što za razliku od jezgrinih gena mitohondrijski gen za rRNA je mnogo jednostavnije građen i nalazi se samo u jednoj kopiji u genomu. Osim toga jezgrina rRNA evoluira mehanizmom usklađene evolucije što znači da se supstitucija u jednoj kopiji brzo širi na ostale, te dovodi do znatnih problema u filogenetskim istraživanjima i ponekad navodi na krive zaključke o filogeniji pojedinih organizama (Hanckok i sur. 1988, Hillis i Dixon 1991).

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

1.3.2 Gen za podjedinicu I citokrom-oksidge (COI)

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

Ovaj gen se smatra jednim od najkorisnijih molekularnih filogenetskih biljega iz nekoliko razloga. Kao terminalni katalizator u mitohondrijskom respiratornom lancu, citokrom-oksidge I je dobro biokemijski istražena te je zaključeno da je njena veličina i struktura sačuvana kod svih aerobnih organizama (Saraste, 1990). Druga bitna karakteristika ovog gena kao filogenetskog biljega je da kodira najveću od tri proteinske podjedinice kompleksa citokrom-oksidge c (Clary i Wolstenholme, 1985). Time je omogućena amplifikacija i sekvenciranje

puno većeg broja nukleotida unutar istog funkcionalnog kompleksa što je izuzetna prednost u filogenetskim istraživanjima.

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

1.4. FILOGEOGRAFIJA

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

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

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

CILJ
ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja su:

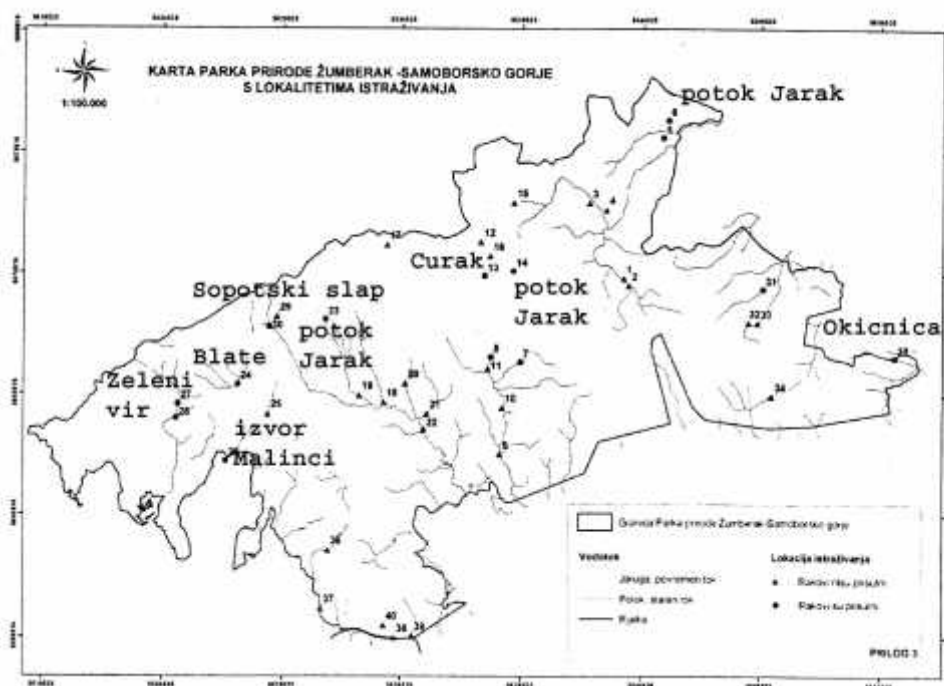
- utvrđivanje stupnja genetičke raznolikosti populacija vrste *Austropotamobius torrentium* na području Parka prirode »Žumberak-Samoborsko gorje« i korelacija s drugim populacijama ove vrste na području Europe
- pokušati rekonstruirati događaje tijekom pliocena i pleistocena na području današnje jugoistočne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

MATERIJAL
I METODE

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Životinjski materijal

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



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

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

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

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



SLIKA 9. Ručno izrađena vrša

3.1.2. Analizirane sekvence

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.1.3. Reagensi i laboratorijski materijal za molekularno filogeneti ke metode

Kemikalije

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

Puferske otopine

- TAE pH 8,0 (Sambrook i Rusell, 2001) :
 - 40 mM Tris-acetat
 - 1 mM EDTA
- TE pH 8,0 (Sambrook i Rusell, 2001) :
 - 10 mM Tris
 - 1 mM EDTA

Osnovni laboratorijski materijali

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

Enzimi

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

Po etnice za lan anu reakciju polimerazom

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

Elektroforetski standardi

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

Kompleti reagensa

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

ROCHE (Švicarska)
High Pure PCR Product Purification Kit - komplet reagensa za proširenje i čišćenje produkata laganu reakciju polimerazom (PCR) i izolaciju fragmenata DNA iz agaroznog gela

QIAGEN (Njemačka)
DNeasy[®] Tissue Kit – komplet reagensa za izolaciju ukupne genomske DNA iz životinjskog tkiva
QIAquick[®] PCR Purification Kit – komplet reagensa za proširenje i čišćenje produkata laganu reakciju polimerazom (PCR)

Tehnika oprema i uređaji

Adapteri za centrifugu: Adapteri za 0.2 mL PCR-mikroeprovete za 1.5/2.0 mL rotor (Eppendorf, Njemačka)
Adapter za digitalni fotoaparata: Adapter Ring for Olympus (Kenko, Japan)
Analitička vaga: EW 150-3M (Kern, Njemačka)
Centrifuga: miniSpin plus (Eppendorf, Njemačka)
Digitalni fotoaparata: Camedia C-4000 Zoom (Olympus, Japan)
Filter za etidij-bromid: Digital filter 590 nm (Peca Products Inc., SAD)
Kadice za elektroforezu: Mini-Sub Cell i Wide Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad, SAD)
Kadice za pripremu agaroznih gelova: Gel Caster, GT UVTP Gel Tray i Fixed High Comb (Bio-Rad, SAD)
Magnetska miješalica: Bibby Sturat (Barloworld Scientific, UK)
Mikrovalna pećnica: Intellowave (LG, Republika Koreja)
Mikropipete: Pipetman 2 μ L, 20 μ L, 200 μ L, 1000 μ L i 10 mL (Gilson, SAD) i Eppendorf Research 10 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L i 1000 μ L (Eppendorf, Njemačka)
Napajanje: Power Pac 300 (Bio-Rad, SAD)
pH metar: pH Meter 744 (Metrohm, Švicarska)
Rezač parafilma: Heathrow Scientific (SAD)
Termostat: ThermoStat plus (Eppendorf, Njemačka)
Thermal cycler: Mastercycler personal (Eppendorf, Njemačka)
Transiluminator: UV Transilluminator TR2000 (Bio-Rad, SAD)
Vodene kupelji: High Performance Water Bath 1225 (Shell Lab, SAD)
Vortex miješalica: Bibby Sturat Vortex Mixer SA7 (Barloworld, UK)
Zamrzivač -80 °C: Ultra Low Temperature Freezer U101-86 (New Brunswick Scientific, UK)
Zamrzivač -20 °C i hladnjak +4 °C: Express Cool GR-282MF (LG, Republika Koreja)
Zatvarač za PCR-mikroeprovete: Capping Aid (Eppendorf, Njemačka)
Zaštitni pokrov od UV zračenja za transiluminator s nosačem za digitalnu kameru: Digital Hood DH-27 (Peca Products Inc., SAD)

3.2. METODE

3.2.1. Izolacija DNA

DNA je izolirana pomoću kompleta reagensa DNeasy Tissue Kit prema uputama proizvođača. Završna elucija izolirane DNA provedena je sa 100 µL i 200 µL elucijskog pufera čime smo dobili dvije različite koncentracije DNA koje smo koristili u eksperimentu.

3.2.2. Umnažanje fragmenata DNA lančanom reakcijom polimerazom (PCR)

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

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

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

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

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

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

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

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

16Sar: 5' - CGCCTGTTTATCAAAAACAT - 3'

16Sbr: 5' - CCGGTCTGAACTCAGATCACGT - 3'

LCO-1490: 5' – GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG – 3'

HCO-2198: 5' – TAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA -3'

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

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

TABLICA 7. Karakteristike po etnica 16Sar i 16Sbr

| Po etnica | G + C % | T _m | Mr | Pb |
|--------------|---------|----------------|--------|----|
| 16Sar | 35 | 51.2 | 5996.0 | 20 |
| 16Sbr | 54.6 | 62.1 | 6631.4 | 22 |
| LCO | 32 | 56,4 | 7658,1 | 25 |
| HCO | 34,6 | 58,5 | 7916,3 | 26 |

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

T_m – temperatura mekšanja po etnice

Mr – molekulska masa po etnice

Pb – broj parova baza po etnice

3.2.3. Elektroforetsko odjeljivanje fragmenata DNA

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

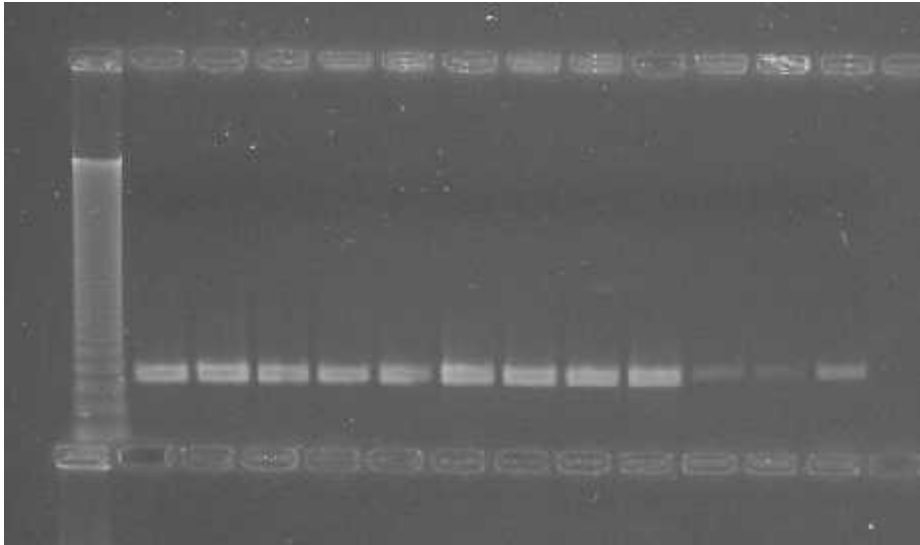
Fragmenti koji su dobiveni nakon lan ane reakcije polimeraze razdvajani su na 1% agaroznom gelu. Agarozni gelovi su pripremani u 1 X TAE puferu.

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

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

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

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



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

3.2.4. Određivanje primarne strukture DNA (sekvenciranje)

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

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

3.2.5. Molekularno-filogenetičke analize

a) Sravnjivanje sekvenci i pretraživanje baze podataka

Sekvence su sravnjene globalno i lokalno.

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

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

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

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

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

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

b) Bayesian analiza

Ovo je relativno nova metoda u filogenetskoj analizi, koja postaje metodom izbora kod ve ine najnovijih filogenetskih istraživanja (Mallatt i sur., 2004, Utevsky i Trontelj, 2004, Waters i Roy, 2004, Wahlberg i sur., 2005). Bayesian analiza (Rannala i Yang, 1996, Mau i Newton, 1997, Mau i sur., 1999) temelji se na spoznaji o vjerojatnostima koje su procijenjene na osnovi nekog modela tzv. naknadnim vjerojatnostima (*posterior probabilities*).

Bayesian analiza provedena je pomo u programa **Mr. Bayes 3.1.1** (Ronquist i Huelsenbeck, 2003) upotrebom metode *Metropolis-coupled Markov Chain Monte Carlo* koja se temelji na nizu neovisnih potraga za skupom najboljih stabala s povremenim izmjenama informacija izme u potraga. Dvije najve e prednosti Bayesian analize, pred ostalim sli nim tipovima analiza, prije svega u odnosu na analizu metodom najve e vjerojatnosti, leže u sposobnosti algoritma da traži grupe najboljih stabala, a ne jedno najbolje stablo, kao i mogu nost izmjene informacija tijekom analize me u više neovisnih potraga za najboljom grupom stabala.

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

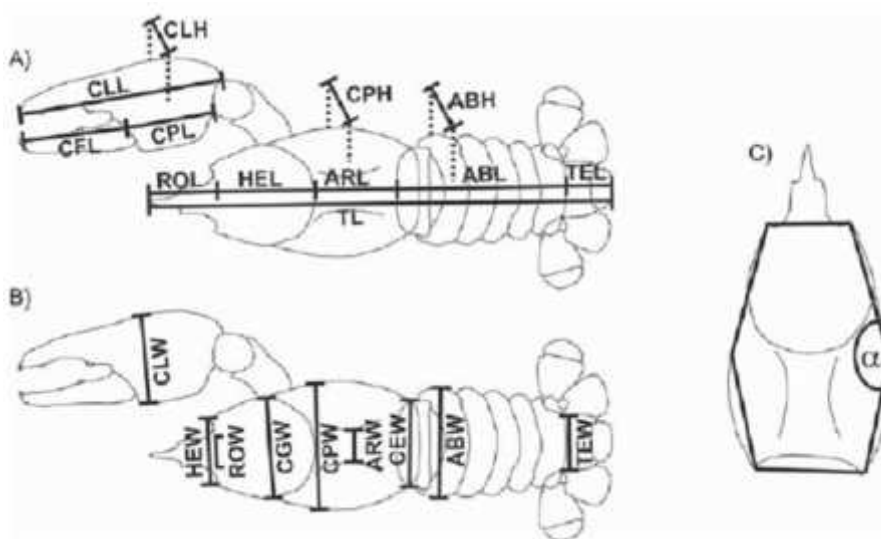
Geneti ka udaljenost (p) je broj koji govori koliko se dvije uspore ivane sekvence razlikuju (Nei i Kumar, 2000). Sekvence koje su evoluirale od nekog zajedni kog pretka tijekom vremena nakupljaju promjene kao rezultat djelovanja evolucijskih procesa. Najjednostavniji na in za mjerenje divergencije me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

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

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

3.2.6. Morfometrijska i meristi ka mjerenja

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



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

TABLICA 8. Objašnjenje kratica korištenih u morfometrijskim mjerenjima.

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

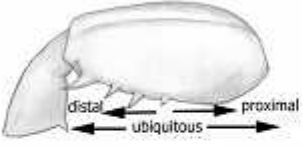
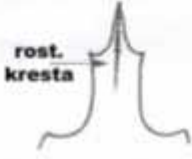



Obzirom da se morfološka obilježja karapaksa mogu pokazati korisnima pri razlikovanju populacija (Sinti i sur., 2005), u daljnje analize uključena je i bo na zakrivljenost karapaksa izražena kao kut (Slika 11). Bo na zakrivljenost izražena je u stupnjevima (degrees), a izražena je na najširem dijelu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

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

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

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

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

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

SLIKA 12. Bilježene merističke značajke.

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

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

3.3. PODRU JE ISTRAŽIVANJA

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

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



SLIKA 13. Geografski položaj Parka prirode Žumberak- Samoborsko gorje

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

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

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

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



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

Raznolikost staništa uvjetovala je veliku biološku raznolikost ovoga kraja.

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

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

REZULTATI

4.1. MOLEKULARNO – FILOGENETI KE ANALIZE

4.1.1. SraVnjivanje i obrada sekvenci

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

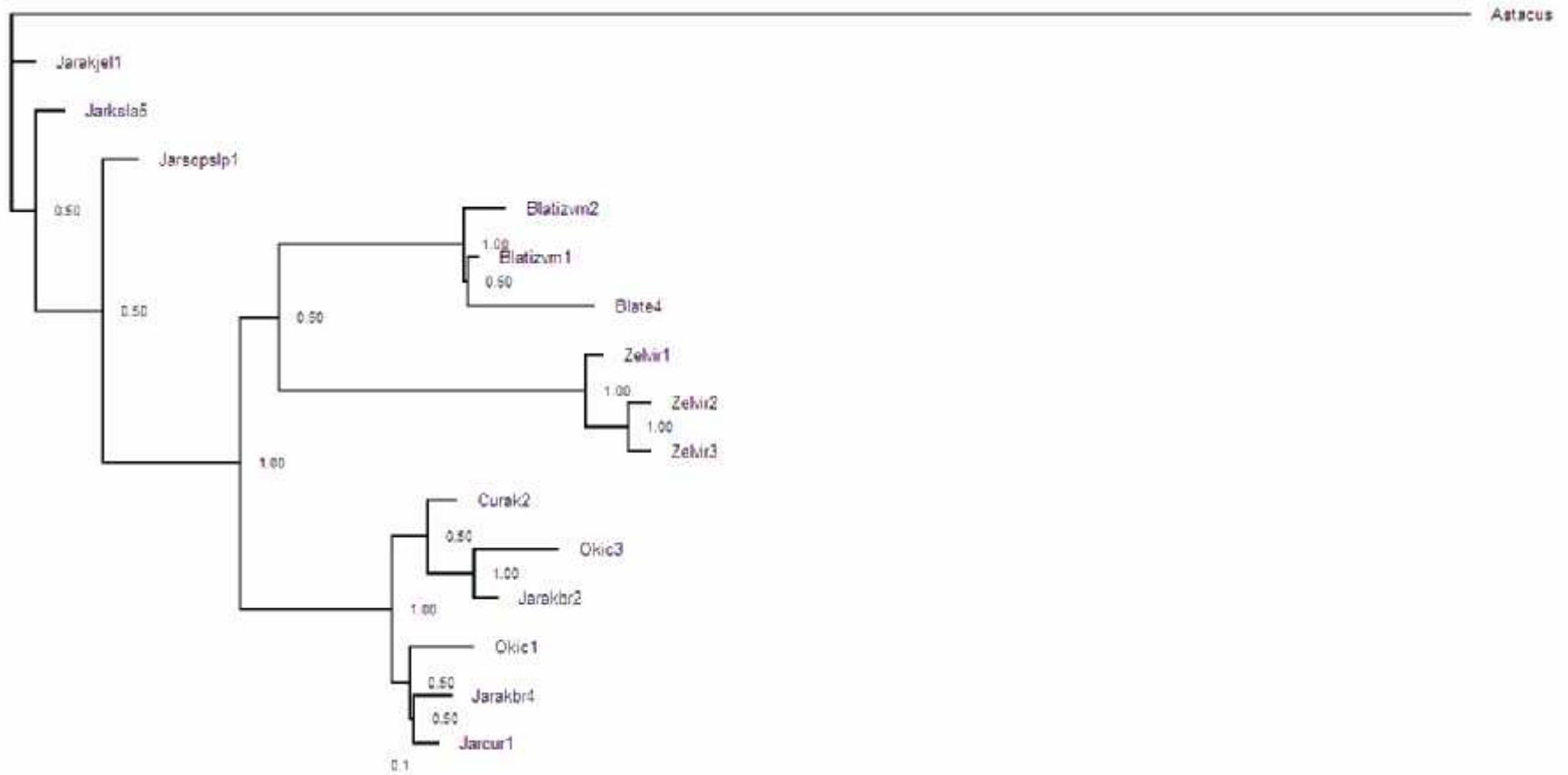
Takvi rezultati odmah ukazuju na prisutnost barem dvije genetski distinktivne populacije rakova na području PP Žumberak-Samoborsko gorje: jedne vezane uz područje srednje i jugoistočne Europe, odnosno Dunavski sliv (Dolje - Jarcur1) i druge koji pripadaju populaciji rakova iz Gorskog Kotara (CrniLug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

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

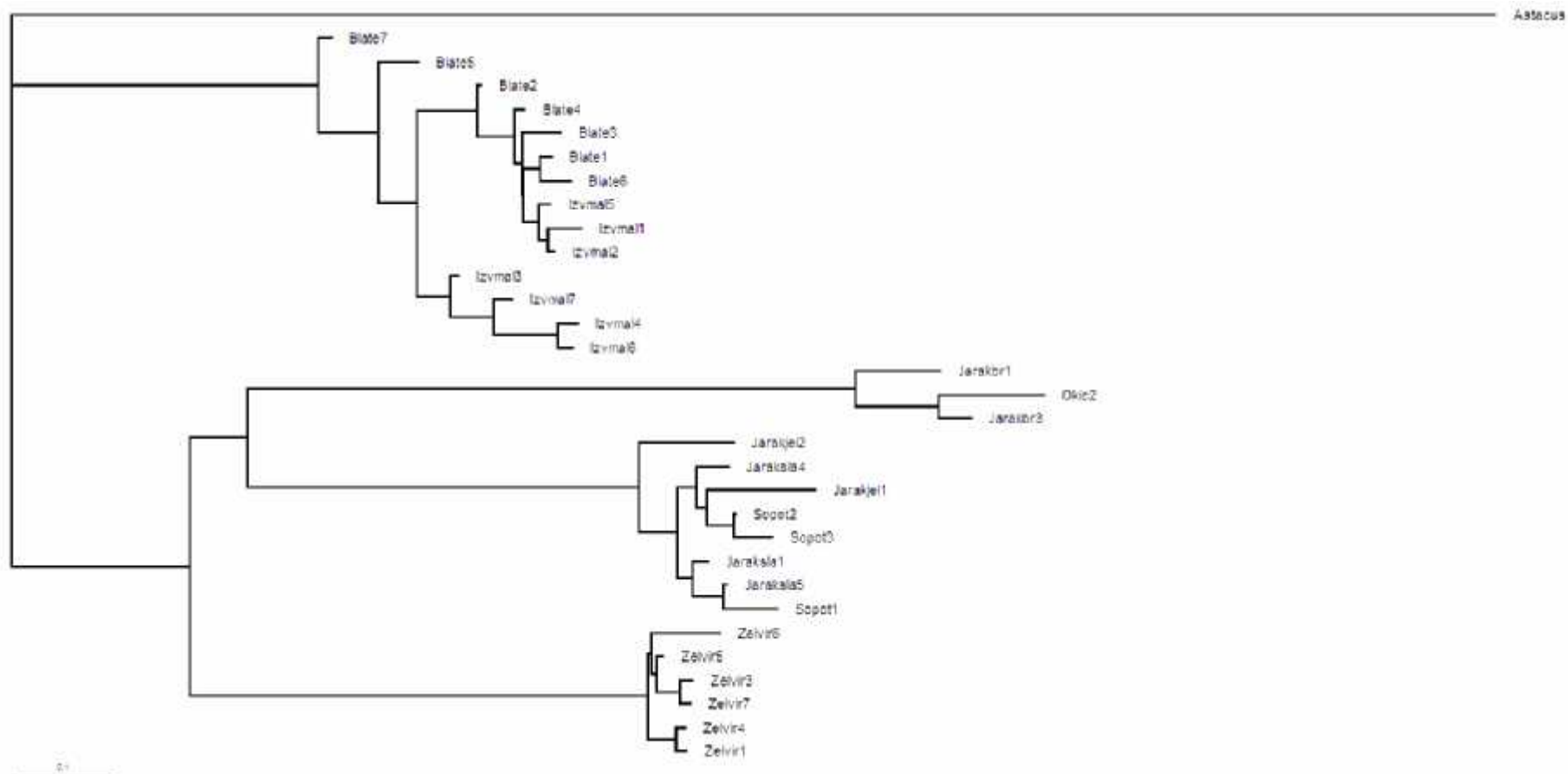
4.1.2. Bayesian analiza

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

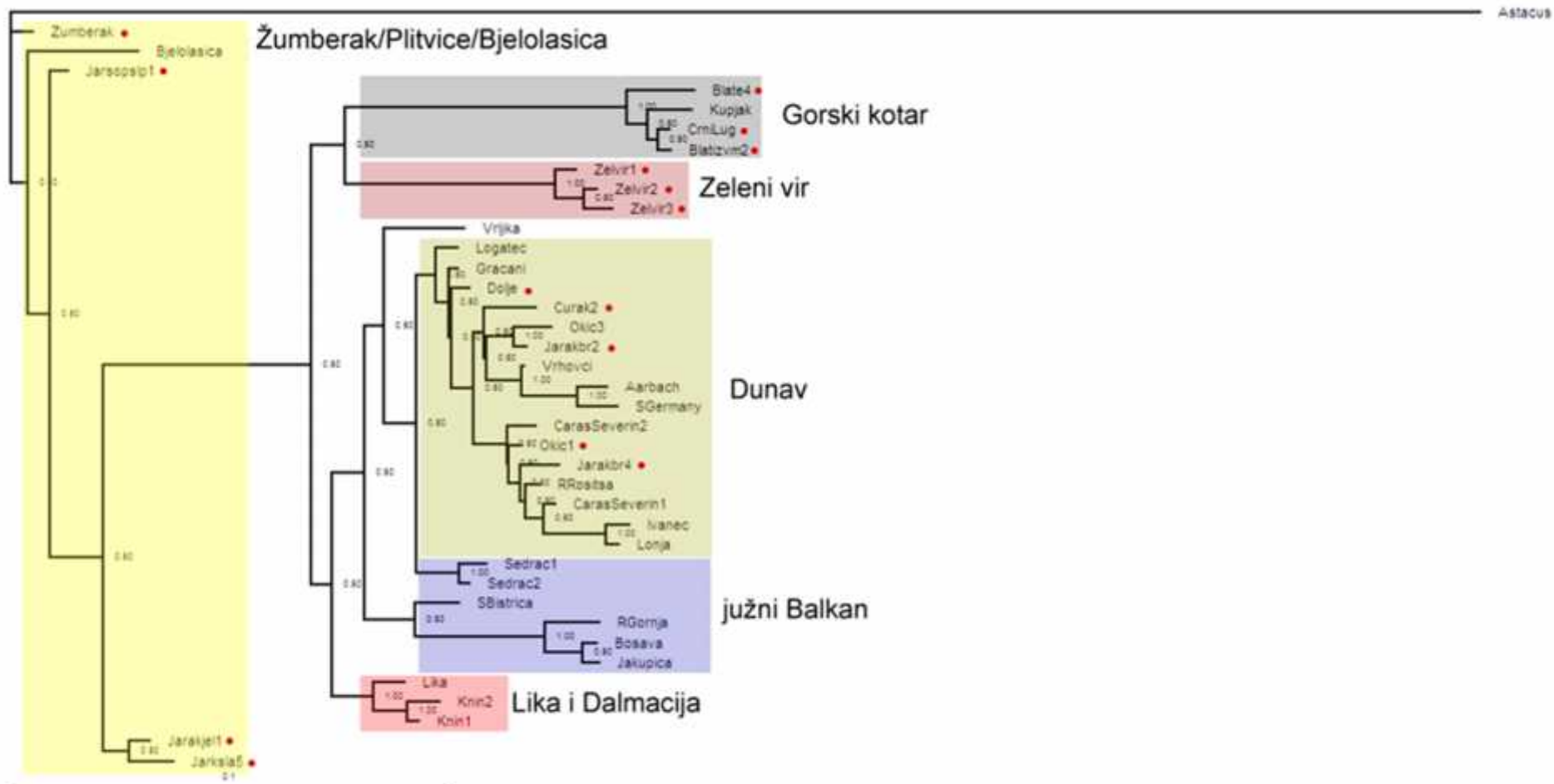
Iz filograma je vidljivo da se sekvence prikupljene s različitih lokacija unutar PP Žumberak – Samoborsko gorje uglavnom grupiraju ovisno o lokaciji, primjerice sekvence iz Zelenog vira jasno su odijeljene od ostalih (Slika 15 i 16). Kako bi imali bolji uvid u njihov geografski i genetički kontekst,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



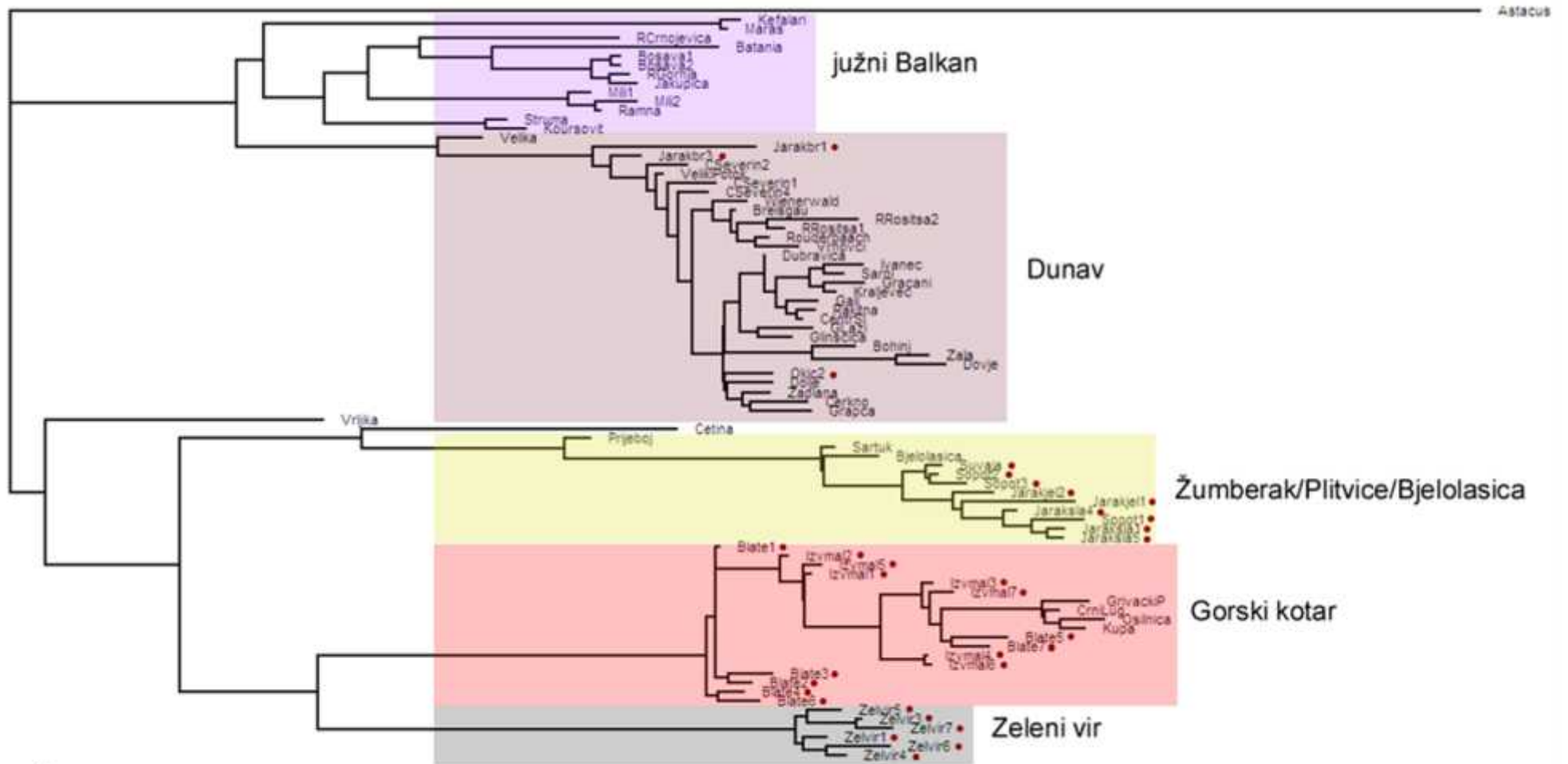
SLIKA 15. Ukorijenjeni konsenzus filogram odnosa sekvenci-haplotipova gena za 16S rRNA vrste *Austropotamobius torrentium* na području PP Žumberak Samoborsko Gorje dobiven *Bayesian analizom* prema HKY85 modelu s gama distribucijom (Hasegawa i sur. 1985) upotrebom metode Metropolis-coupled Markov Chain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



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



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



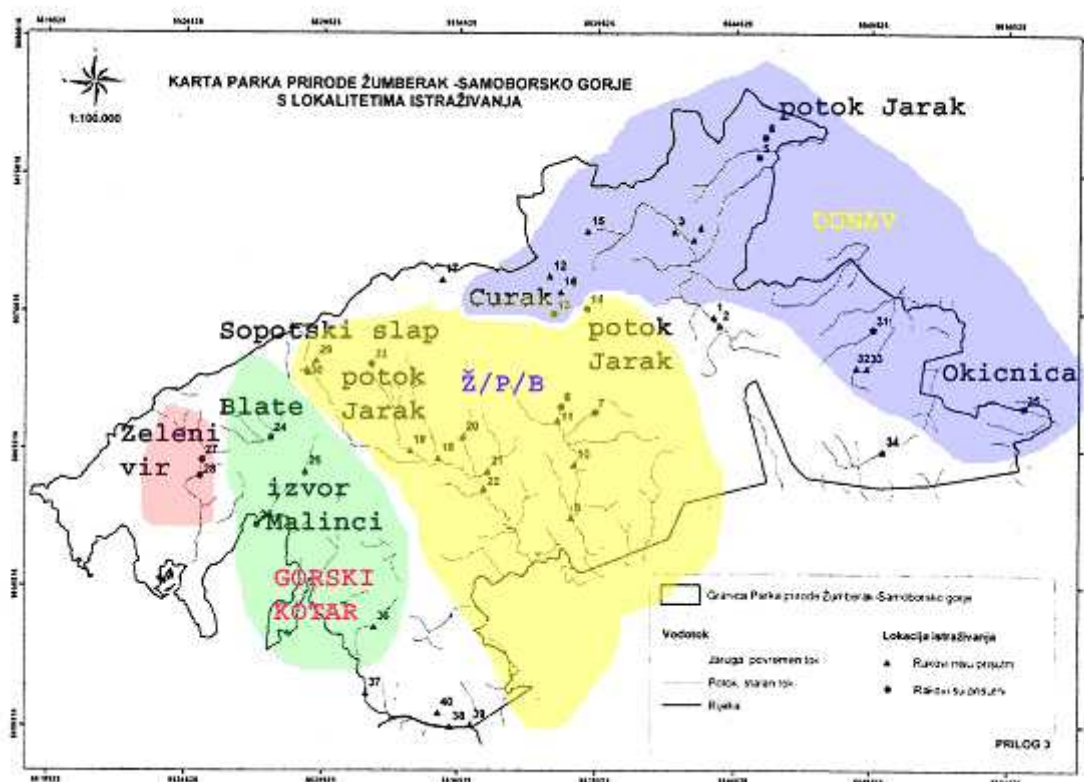
SLIKA 18. Ukorijenjeni konsenzus filogram odnosa sekvenci-haplotipova gena za COI vrste *Austropotamobius torrentium* na području Europe dobiven *Bayesian analizom* prema HKY85 modelu s gama distribucijom (Hasegawa i sur. 1985) upotrebom metode Metropolis-coupled Markov Chain Monte Carlo. Sekvence dobivene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

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

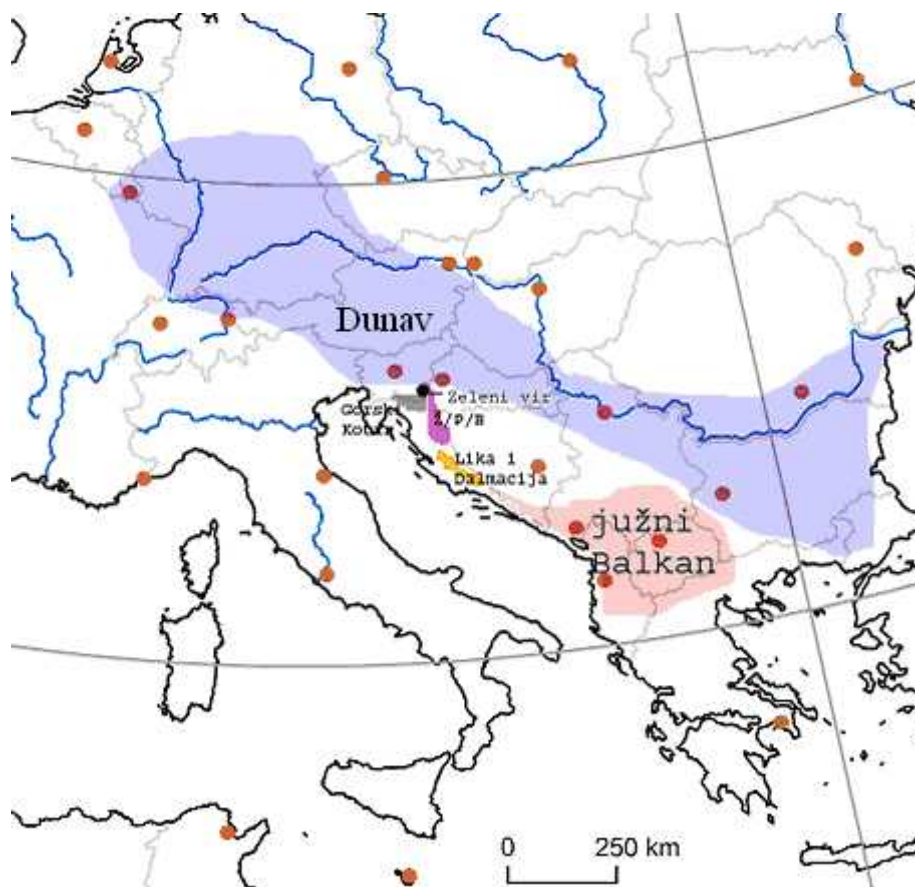
- središnja i jugoisto na Europa (Dunav)
- južni Balkan
- Gorski kotar
- Žumberak/Plitvice/Bjelolasica (Ž/P/B)
- Zeleni vir
- Lika i Dalmacija (samo 16S rRNA)

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

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



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



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

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

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

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

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

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

/ - haplogrupa LD nije zastupljena COI sekvencama

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

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

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

/ - haplogrupa LD nije zastupljena COI sekvencama

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

4.1.4. Vrijeme razdvajanja

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

Dobiveni podaci prikazani su u tablici 12.

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

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

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

Mogu i scenarij razdvajanja prvobitnih grupa poto nog raka:

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

4.2. MORFOMETRIJSKE I MERISTI KE ZNA AJKE

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

| b) | Morf. značajka | Broj jedinki | Srednja Vrijed. | Min | Maks | Std. Dev. |
|----|----------------|--------------|-----------------|----------|----------|-----------|
| | dcil | 2 | 0,843913 | 0,838871 | 0,848955 | 0,007130 |
| | dcfl | 2 | 0,512850 | 0,510452 | 0,515248 | 0,003391 |
| | dcpl | 2 | 0,422829 | 0,385030 | 0,460628 | 0,053456 |
| | dclw | 2 | 0,386753 | 0,385705 | 0,387802 | 0,001483 |
| | dclh | 2 | 0,248350 | 0,245448 | 0,251252 | 0,004104 |
| | lcll | 2 | 0,839538 | 0,822030 | 0,857047 | 0,024760 |
| | lcfl | 2 | 0,500417 | 0,496966 | 0,503869 | 0,004881 |
| | lcpl | 2 | 0,316178 | 0,315430 | 0,316925 | 0,001057 |
| | lclw | 2 | 0,364248 | 0,346837 | 0,381659 | 0,024623 |
| | lclh | 2 | 0,228559 | 0,213018 | 0,244100 | 0,021978 |
| | dcef | 2 | 1,162215 | 1,134274 | 1,190155 | 0,039514 |
| | lcef | 2 | 1,178811 | 1,146563 | 1,211059 | 0,045605 |
| | rol | 2 | 0,315891 | 0,308159 | 0,323623 | 0,010935 |
| | apex | 2 | 0,105640 | 0,102495 | 0,108785 | 0,004448 |
| | row | 2 | 0,183000 | 0,169777 | 0,196224 | 0,018701 |
| | hew | 2 | 0,380591 | 0,354574 | 0,406608 | 0,036793 |
| | cgw | 2 | 0,599339 | 0,580337 | 0,618341 | 0,026873 |
| | cpw | 2 | 0,679448 | 0,667729 | 0,691167 | 0,016573 |
| | hel | 2 | 0,556832 | 0,555630 | 0,558034 | 0,001699 |
| | arl | 2 | 0,443168 | 0,441966 | 0,444370 | 0,001699 |
| | arw | 2 | 0,215781 | 0,213082 | 0,218480 | 0,003817 |
| | cph | 2 | 0,549271 | 0,545516 | 0,553027 | 0,005311 |
| | cew | 2 | 0,496548 | 0,496131 | 0,496966 | 0,000590 |
| | abw | 2 | 0,636241 | 0,623122 | 0,649359 | 0,018552 |
| | abl | 2 | 1,033682 | 0,994538 | 1,072825 | 0,055358 |
| | abh | 2 | 0,321142 | 0,305462 | 0,336823 | 0,022176 |
| | tel | 2 | 0,387377 | 0,379609 | 0,395145 | 0,010986 |
| | tew | 2 | 0,327843 | 0,325691 | 0,329995 | 0,003044 |
| | tl | 2 | 2,678065 | 2,589440 | 2,766689 | 0,125334 |
| | alfa | 2 | 1,485918 | 1,464415 | 1,507422 | 0,030411 |

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

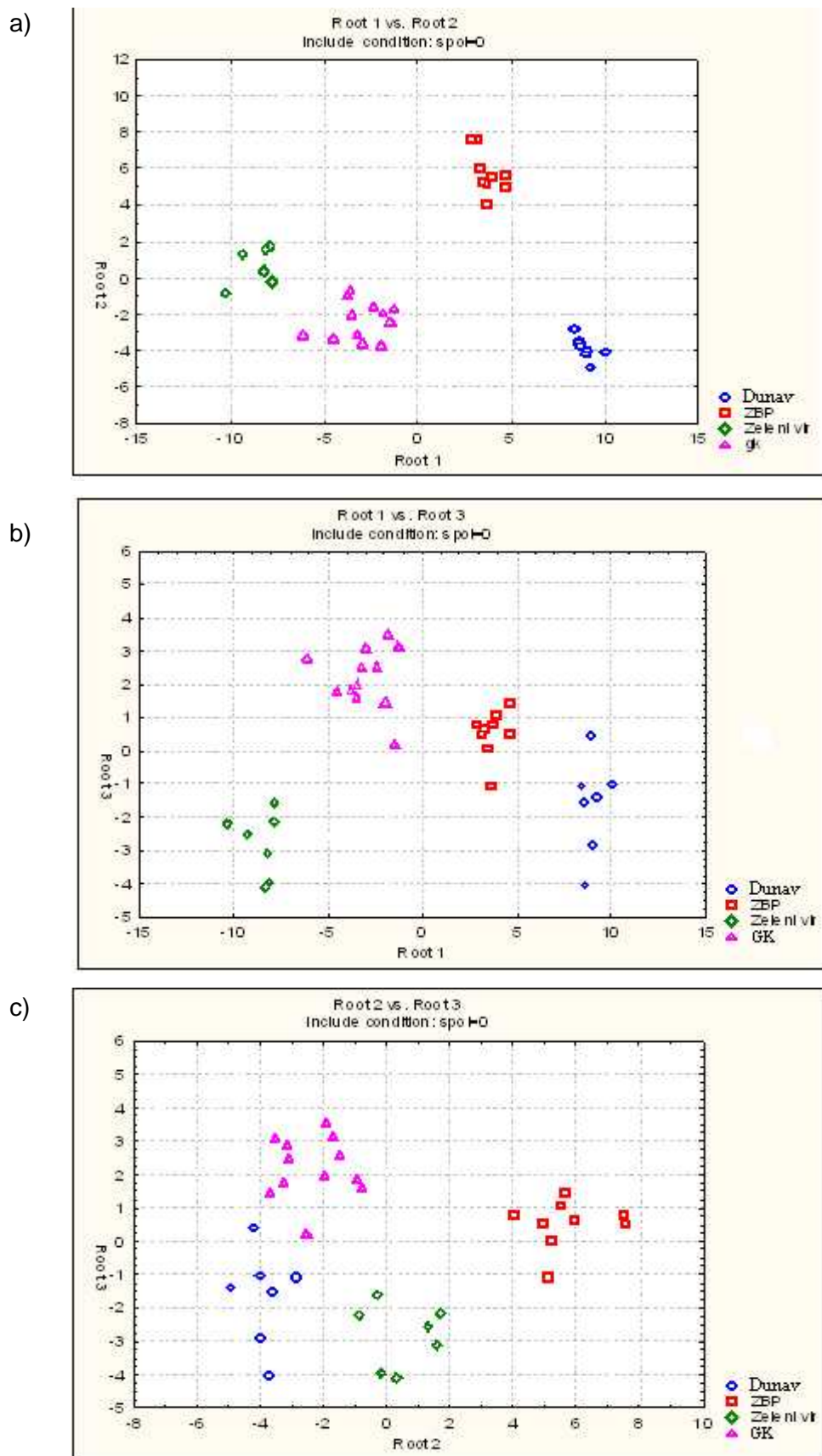
| Morf. zna ajka | Root 1 (diskriminantna funkcija) | Root 2 (diskriminantna funkcija) | Root 3 (diskriminantna funkcija) |
|----------------------------------|--|--|--|
| apex | -1,82490 | -1,22919 | -0,49063 |
| rol | -2,35994 | 0,34750 | -0,86924 |
| lcpl | -2,46832 | -0,38323 | -0,25919 |
| lcfi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

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

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

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

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



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

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

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

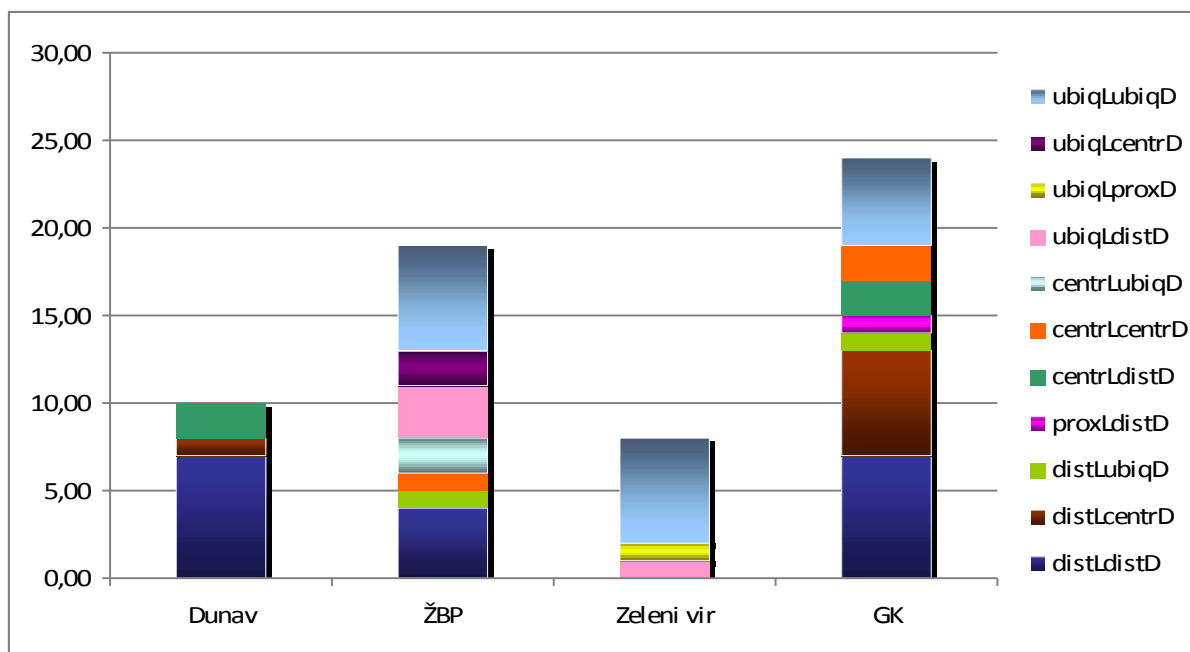
Sve su merističke značajke bilježene i za lijevu i za desnu stranu tijela raka (osim rostralne kreste). Iako je Spearmanovim koeficijentom korelacije utvrđena simetrija na distribucija broja trnaca na telzonu, broja trnaca na skafofodu te položaja trnova na trećem maksilipedu (Prilog IV), obratni su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

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

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

| | Dunav | ŽPB | Zeleni vir | GK |
|------------|---|--|---------------------|----|
| Dunav | / | | | |
| ŽPB | telztrnciL, telztrnciD, scafopodLkvrg | / | | |
| Zeleni vir | scafopodDtrn, scafopodLtrn | telztrniL, scafopodDtrn, scafopodLtrn, MLVU, MDVU | / | |
| GK | telztrnciL, scafopodDtrn, scafopodLtrn, MLVD | scafopodDtrn, scafopodLtrn | telztrnciL, MLVU | / |

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



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

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

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

RASPRAVA

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

5.1. MOLEKULARNO – FILOGENETIČKE ANALIZE

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

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

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

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

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

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

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

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

| Taxonomic Hierarchy | 16S | 12S | COI | 18S | 28S | Astacin |
|---------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------|
| Within Species | 0.000-0.068 (0.025) | 0.003-0.006 (0.005) | 0.002-0.004 (0.003) | - | - | 0.0276 |
| Among Species | 0.002-0.147 (0.057) | 0.03-0.16 (0.09) | 0.059 | - | - | 0.0236 |
| Among Genera | 0.100-0.195 (0.133) | 0.09-0.16 (0.12) | 0.117 (0.026) | 0.005-0.038 (0.155) | 0.012-0.228 (0.074) | 0.027-0.140 |
| Among Superfamilies | 0.233-0.250 (0.242) | 0.19-0.28 (0.23) | 0.20-0.32 (0.25) | 0.037-0.060 (0.047) | 0.179-0.291 (0.232) | - |

Geneti ku raznolikost pojedinih populacija potonog raka na području Parka prirode Žumberak – Samoborsko gorje potvrđuje i nukleotidna raznolikost (p - vrijednost) izračunata na 100km (Tablica 11). Ovako izražena, ona je najveća za haplogrupu GK, a izuzetno je velika i za populaciju Zeleni vir gdje je za 16S sekvencu identična vrijednosti grupe Dunav koja pokriva višestruko veće područje, a za COI sekvencu je skoro jednaka vrijednosti za grupu GK koja je također veća površine u odnosu na Zeleni vir.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5.2. MORFOMETRIJSKE I MERISTIČKE ZNAČAJKE

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5.3. PRIJEDLOZI ZA ZAŠTITU

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

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

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

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

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

ZAKLJUČAK

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

LITERATURA

- Ackefors, H.** (1998) The culture and capture crayfish fisheries in Europe. *World aquaculture*, **29** (2): 18-24, 64-67
- Albrecht, H.** (1983) Die Protostacidae n. fam., fossile Vorfahren der Flußkrebse? *Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie Monatshefte*, **1983**: 5–15
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J.** (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* **215**: 403-410.
- Altschul, S.F., Madden T. L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller, W. & Lipman, D. J.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Avise, J.C., Arnold, J., Bstl, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Negel, J.E., Reeb, C.A. & Saunders, N.C.** (1987) Interspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu.Rev.Ecol.Syst.* **18**: 489-522.
- Baric, S., Höllrigl, A., Kerschbamer, C., Füreder, L., Petutschnig, J., Dalla Via, J.** (2005a) Update of the molecular phylogeny of the *Austropotamobius pallipes* species complex by including specimens from South Tyrol (Italy) and Carinthia (Austria). *European native crayfish in relation to land-use and habitat deterioration with a special focus on Austropotamobius torrentium*, CRAYNET, Vol. 4. (eds L. Füreder & S. Souty-Grousset) *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, **376-377**, 599-612
- Baric, S., Höllrigl, A., C., Füreder, L., Dalla Via, J.** (2005b) Mitochondrial and microsatellite DNA analyses of *Austropotamobius pallipes* in South Tyrol (Italy) and Tyrol (Austria) *European native crayfish in relation to land-use and habitat deterioration with a special focus on Austropotamobius torrentium*, CRAYNET, Vol. 4. (eds L. Füreder & S. Souty-Grousset) *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, **376-377**, 627-636
- Bohl, E.**, (1987) Comparative studies on crayfish brooks in Bavaria (*Astacus astacus* L., *Austropotamobius torrentium* Schr.). *Freshwater crayfish*, **7**, 287-294
- Bohl, E.**, (1997) An isolated population of the white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes*) in the principality of Liechtenstein. *Bull. Fr. Pêche Piscic* **347**, 701-712
- Bohl, E.**, (1999) Crayfish stock situation in Bavaria (Germany) – attributes, threats and chances, *Freshwater crayfish*, **12**, 765-777
- Bott, R.** (1950) Die Flusskrebse Europeas (Decapoda, Astacidae). *Abhandlungen der Senckenbergischen Naturforschenden Gesellschaft*
- Brown, W.M., Prager, E.M., Wang, A. & Wilson, A.C.** (1982) Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. *J.Mol.Evol.* **18**: 225-239.
- Buzjak, N.** (2002) Speleološke pojave u parku prirode «Žumberak-Samoborsko gorje». *Geoadria* vol **7/1**, 31-49
- Clary, D.O., Wolstenholme, D.R.** (1985) The mitochondrial genome of the Honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics*, **133**: 97-117.
- Cook, B.D., Page, T.J., Hughes, J.M.** (2008) Importance of cryptic species for identifying «representative» units of biodiversity for freshwater conservation. *Biological conservation* **141**: 2821-2831

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

- Hall, T.A.** (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**: 95-98.
- Hancock, J.M., Tautz, D. & Dover, G.A.** (1988) Evolution of the secondary structures and compensatory mutations of the ribosomal RNAs of *Drosophila*. *Mol.Biol.Evol.* **5**: 393-414.
- Harhoglu, M.M., Güner, U.** (2006) Studies on the recently discovered crayfish, *Austropotamobius torrentium*, in Turkey: morphological analysis and meat yield. *Aquaculture research*, 2006, **37**, 538-542
- Hasegawa, M., H. Kishino, & T. Yano.** (1985) Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, **22**: 160-174.
- Hasiotis, S.T.** (1999) The origin and evolution of freshwater crayfish based on crayfish body and trace fossils. *Freshwater Crayfish*, **12**, 49-70
- Hewitt, GM.** (1999) Post-glacial recolonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society*, **68**: 87-112.
- Hewitt, GM.** (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Natura*, **405**: 907-913.
- Hillis, D.M. & Dixon, M.T.** (1991) Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q.Rev.Biol.* **66**: 411-453
- Hobbs, H.H. Jr** (1988) Crayfish distribution, adaptive radiation and evolution. *Freshwater Crayfish: Biology, Management and Exploitation*, (eds D.M. Holdich & R.S. Lowery), pp. 52-82. Croom Helm, London
- Holdich DM i Lowery RS** (1988) Freshwater crayfish – biology, management and exploitation. University Press, Cambridge, pp 498.
- Holdich D. M.** (1999) Negative aspects of crayfish introductions. In: *Crayfish in Europe as alien species – how to make the best of a bad situation?* (eds F. Gherardt & D.M. Holdich), *Crustacean Issues*, **11**: 31-47 (A.A. Balkema, Rotterdam)
- Holdich D. M.** (2002) Present distribution of Crayfish in Europe and some adjoining countries. *Bulletin Francais de la Pêche et de la Pisciculture* **367**, 611-650
- Holdich D. M.** (2003) Crayfish in Europe – an overview of taxonomy, legislation, distribution, and crayfish plague outbreaks, In: *Management & conservation of crayfish, Proceedings of a conference, Nottingham (November 2002)*, (eds D.M. Holdich & P.J. Sibley): 17-34 (Environment agency, Bristol)
- Holdich DM, Haffner P & Noël PY** (2006). Species Files. In: Atlas of Crayfish in Europe, Souty-Grosset C, Holdich DM, Reynolds JD and Haffner P (eds.), pp. 66-71. Publications Scientifiques, Paris, France
- Huner, J.V., Lindquist, O.V., Konunen, H.** (1995) Sexual dimorphism and yield of edible products from a stunted, by commercial standards, population of noble crayfish (*Astacus astacus* Linne) in central Finland. *Freshwater Crayfish*, **8**, 668-679
- Huxley, T.H.** (1880) The Crayfish: An Intruduction in the Study of Zoology

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

- Mallatt, J.M., Garey, J.R. & Shultz, J.W.** (2004) Ecdysozoan phylogeny and Bayesian inference: first use of nearly complete 28S and 18S rRNA gene sequences to classify the arthropods and their kin. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **31**: 178–191.
- Margulis, L.** (1970) Origin of Eukaryotic Cells, *Yale University Press*, USA.
- Mau, B., Newton, M.A. i Larget, B.** (1997) Bayesian phylogenetic inference via Markov chain Monte Carlo methods. *Molecular Biology and Evolution* **14**: 717-724
- Mau, B., Newton, M. & Larget, B.** (1999) Bayesian phylogenetic inference via Markov chain Monte Carlo methods. *Biometrics* **55**: 1-12.
- Moore, W.S.** (1995) Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution* **49**: 718-726.
- Moritz, C.** (1994) Defining 'evolutionary significant units' for conservation. *Trends Ecol Evol* **9**: 373-375
- Narodne novine** (2005) Zakon o zaštiti prirode, 70/05
- Narodne novine** (2006) Pravilnik o proglašavanju divljih svojti zaštićenim i strogo zaštićenim 07/06
- Nei M., Kumar S.** (2000) Molecular Evolution and Phylogenetics, Oxford University Press, New York.
- Nyström, P., Brönmark, C., Granéli, W.** (1996). Patterns in benthic food webs: a role for omnivorous crayfish? *Freshwater Biol.* **36**, 631-646
- Ortmann, A.E.** (1897) Ueber "Bipolarität" in der Verbreitung mariner Tiere. *Zoologische Jahrbucher, Abteilung Systematik*, **9**, 571-95
- Palumbi, S.R. & Benize, J.** (1991) large mitochondrial DNA differences between morphologically similar Penaeid shrimp. *Mol Marine Biol Biotechnol.* **1**: 27-34.
- Park prirode Žumberak-Samoborsko gorje** (2009) – web stranica (www.pp-zumberak-samoborsko-gorje.hr)
- Patterson, C.**, ed (1987) Molecules and morphology in Evolution: Conflict or Compromise? Cambridge: Cambridge University Press
- Pechenik, Jan A.** (2000) Biology of the Invertebrates, 4th edition, McGraw-Hill Foundation, USA
- Pretzmann, G.**, (1987) A contribution to a historic analysis of Mediterranean freshwater decapoda chorology. *Invest Pesq* **51**: 7-25
- Pršir, N.** (2005) Rasprostranjenost rakova iz porodice Astacidae na području Parka prirode Žumberak-Samoborsko gorje, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu
- Radović, J.** (2000) An overview of the state of biological and landscape diversity of Croatia : 1-158 (Ministry of Environmental Protection and Physical Planning, Zagreb)
- Rannala, B. i Yang, Z.** (1996) Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *J.Molecular Evolution* **43**: 304-311

- Renz, M., Breithaupt, T.** (2000) Habitat use of the crayfish *Austropotamobius torrentium* in small brooks and in Lake Constance, Southern Germany, *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, **356**, 139-154
- Ronquist, R.** (1997) Dispersal-vicariance analysis: A new approach to the quantification of the historical biogeography. *Syst.Biol.* **46**: 195-203.
- Rögl, F.** (1998) Paleographic consideration for Mediterranean and Paratethys seaways (Oligocene to Miocene). *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien* **99A**, 279-310
- Sacheri, I.J., Nichols, R.A. i Brakfield, P.M.** (2006) Morphological differentiation following experimental bottlenecks in the butterfly *Bicyclus anynana* (Nymphalidae). *Biol.J.Linn.Soc.* **89** 107-115
- Saraste, M.** (1990) Structural features of cytochrome oxidase. *Q Rev Biophys.* **23**: 331–366.
- Scholtz, G.** (1993) Teloblast in decapod embryos: an embryonic character reveals monophyletic origin of freshwater crayfish (Crustacea, Decapoda). *Zoologischer Anzeiger*, **230**, 45-54
- Schubart, C.D., Huber, M.G.J.** (2006) Genetic comparisons of German populations of the stone crayfish, *Austropotamobius torrentium* (Crustacea, Astacidae), *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, **380-381**, 1019-1028
- Simon, C., Frat, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. & Flook, P.** (1994) Evolution, weighing and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann.Ent.Soc.Am.* **87**: 651-701
- Sinclair, E.A., James W.F., Buhay J., Crandall, K.A.** (2004) Proposal to complete a phylogenetic taxonomy and systematic revision for freshwater crayfish (Astacoidea). *Freshwater Crayfish* **14**: 21-29.
- Sint, D., Dalla Via, J., Füreder, L** (2005) Morphological variations in *Astacus astacus* L and *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet) populations. In: *European native crayfish in relation to land-use and habitat deterioration with a special focus on Austropotamobius torrentium* CRAY-NET, Vol.4, (eds L. Füreder, C. Souty-Grosset) *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, **376-377**, 637-652
- Sint, D., Dalla Via, J., Füreder, L.** (2006) The genus *Austropotamobius* in the Ausserfern region (Tyrol, Austria) with an overlap in the distribution of *A.torrentium* and *A.pallipes* populations, *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, **380-381**, 1029-1040
- Sint, D., Dalla Via, J., Füreder, L.** (2007) Phenotypical characterization of indigenous freshwater crayfish populations, *Journal of Zoology* **273**, 210-219
- Skurdal, J., Taugbøl, T.** (2002) *Astacus*. In: *Biology of freshwater crayfish*: 467-510 (ed D.M.Holdich), Oxford, Blackwell Science
- Soulé M.E., Mills, L.S.** (1992) Conservation genetics and conservation biology: a troubled marriage. In: Saundlund OT (eds K. Hindar, A.H.D. Brown) *Conservation of Biodiversity for Sustainable Development*. Scandinavian University Press: Oslo, Scandinavia, pp 55-69
- Starobogatov, Ya.I.** (1995) Taxonomy and geographical distribution of crayfish of Asia and east Europe (Crustaceae:Decapoda:Astacidae). *Arthr. sel.* **4 (3)**, 3-25

- Streissl, F. & Hödl, W.** (2002) Growth, morphometrics, size at maturity, sexual dimorphism and condition index of *Austropotamobius torrentium* Shcrank. *Hydrobiologia* **477**, 201-208
- Stucki, T.P., Romer, J.** (2001) Will *Astacus leptodactylus* displace *Astacus astacus* and *Austropotamobius torrentium* in Lake Ägeri, Switzerland? *Aquat.sci.*, **63**, 477-489
- Swain,D.P., Foote, C.J.** (1999) Stock and chameleons: the use of phenotypic variation in stock identification. *Fish.Res.* **43**, 113-128
- Taugbøl, T. & Skurdal, J.** (1999) Monitoring of crayfish populations, In: *Nordic-Baltic workshop on freshwater crayfish research and management* (ed T. Taugbøl): 109-115
- Taylor, C.A.** (2002) Taxonomy and conservation of native crayfish stocks. *Biology of Freshwater Crayfish*. 236-257, *Blackwell Science*
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G.** (1997) The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, **25**: 4876-4882.
- Trontelj, P., Machino Y., Sket B.** (2005) Phylogenetic and phylogeographic relationships in the crayfish genus *Austropotamobius* inferred from mitochondrial COI gene sequences. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, **34**: 212-226.
- Troschel, H.J., Dehus, P.** (1993) Distribution of of crayfish species in the federal republic of Germany, with special reference to *Austropotamobius pallipes*. *Freshwater Crayfish* **9**, 390-398
- Troschel, H.J., Schulz, U., Berg, R.** (1995) Seasonal activity of stone crayfish *Austropotamobius torrentium*, *Freshwater Crayfish* **10**, 196-199
- Utevsky, S.Y. & Trontelj, P.** (2004) Phylogenetic relationships of fish leeches (Hirudinea, Piscicolidae) based on mitochondrial DNA sequences and morphological data. *Zoologica Scripta*, **33**, 4,: 375–385.
- Verovnik, R., Sket, B., Trontelj, P.** (2004) Phylogeography of subterranean and surface populations of water lice *Asellus aquaticus* (Crustacea, Isopoda), *Molecular Ecology* **13**, 1519-1532
- Verovnik, R., Sket, B., Trontelj, P.** (2005) The colonization of Europe by the freshwater Crustacean *Asellus aquaticus* (Crustacea, Isopoda) proceeded from ancient refugia and was directed by habitat connectivity, *Molecular Ecology* **14**, 4355-4369
- Vandamme, A-M.**, (2004) Basic concepts of molecular evolution, In: *The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny*, (eds M. Salemi & A.-M. Vandamme) Cambridge: Cambridge University Press
- Wahlberg, N., Braby, M.F., Brower, A.W.Z., de Jong, R., Lee, M-M., Nylin, S., Pierce, N.E., Sperling, .A.H., Vila, R., Warren, A.D. & Zakharov, E.** (2005) Synergistic effects of combining morphological and molecular data in resolving the phylogeny of butterflies and skippers. *Proc. R. Soc. B.* **272**: 1577–1586.
- Wares, J.P., Cunningham, C.W.** (2001) Phylogeography and historical ecology of the north Atlantic intertidal. *Evolution*, **55**: 2455-2469.

Waters, J.M. & Roy, M.S. (2004) Phylogeography of a high-dispersal New Zealand sea-star: does upwelling block gene-flow? *Molecular Ecology* **13**: 2797–2806.

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

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

PRILOZI

PRILOG I. Spearmanov koeficijent korelacija za mužjake

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

PRILOG II. Spearmanov koeficijent korelacija za ženke.

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

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

a)

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

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

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

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

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

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

b)

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

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

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

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