

Molekularno-filogenetička i filogeografska analiza populacija vrste *Holandriana holandrii* (C. Pfeiffer, 1828) (Mollusca: Gastropoda) u Hrvatskoj

Lovrenčić, Leona

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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:217:108996>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-31**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Leona Lovrenčić

Molekularno-filogenetička i filogeografska analiza populacija vrste
Holandriana holandrii (C. Pfeiffer, 1828) (Mollusca: Gastropoda) u Hrvatskoj

Diplomski rad

Zagreb, 2015.

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

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno - matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Molekularno-filogenetička i filogeografska analiza populacija vrste *Holandriana holandrii* (C. Pfeiffer, 1828) (Mollusca: Gastropoda) u Hrvatskoj

Leona Lovrenčić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Slatkovodna vrsta puža *Holandriana holandrii* (Pfeiffer, 1828) široko je rasprostranjena na području jugoistočne Europe. Spada u porodicu Melanopsidae koja je vrstama i brojnošću dominirala Panonskim jezerom tijekom kasnog miocena i pliocena. Cilj ovog istraživanja bio je ustanoviti filogenetske i filogeografske odnose populacija ove vrste na temelju analize dva genska biljega, mitohondrijskih gena za COI i 16S rRNA. Filogenetski odnosi rekonstruirani su upotrebom različitih filogenetičkih metoda za svaku gensku regiju zasebno, kao i na konkateniranim setovima sekvenci. Molekularno-filogenetičke analize ustanovile su postojanje tri geografski i genetski odijeljene grupe i dvije podgrupe. Dobivene vrijednosti genetske udaljenosti unutar i između grupa ukazuju na relativno mlade evolucijske linije koje su se razdvojile tijekom pleistocena.

(66 stranica, 24 slike, 18 tablica, 80 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: Melanopsidae, slatkovodni puževi, filogenija, filogeografija, COI i 16S rRNA

Voditelji: Dr. sc. Jasna Lajtner, doc. i Dr. sc. Martina Podnar Lešić

Ocjenitelji: Doc. dr. sc. Jasna Lajtner

Doc. dr. sc. Ana Galov

Doc. dr. sc. Renata Šoštarić

Rad prihvaćen: 05.02.2015.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation thesis

Molecular phylogenetic and phylogeographic analysis of population of *Holandriana holandrii* (C. Pfeiffer, 1828) (Mollusca: Gastropoda) in Croatia

Leona Lovrenčić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Holandriana holandrii (Pfeiffer, 1828) is a freshwater snail, widespread in south-eastern Europe. It belongs to the family Melanopsidae which dominated the Lake Pannon by the number of species and their abundance during the late Miocene and Pliocene. The aim of this research was to determine phylogenetic and phylogeographic relationships of populations of this species based on the analysis of two genetic markers, mitochondrial genes COI and 16S rRNA. Phylogenetic relationships were reconstructed using different phylogenetic methods for each gene region individually as well as for concatenated sets of sequences. Molecular phylogenetic analyses established the existence of three geographically and genetically separated groups and two subgroups. The obtained values of genetic divergence between and within the groups indicate relatively young evolutionary lines which have separated during the Pleistocene.

(66 pages, 24 figures, 18 tables, 80 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: Melanopsidae, freshwater snails, phylogeny, phylogeography, COI i 16S rRNA

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

Reviewers: Dr. Jasna Lajtner, Asst. Prof.

Dr. Ana Galov, Asst. Prof.

Dr. Renata Šoštarić, Asst. Prof.

Thesis accepted: 05.02.2015.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. OSNOVNE ZNAČAJKE KOLJENA MEKUŠCI (MOLLUSCA)	1
1.2. OSNOVNE KARAKTERISTIKE RAZREDA PUŽEVI (GASTROPODA)	2
1.2.1. Slatkovodni puževi	5
1.2.2. Vrsta <i>Holandriana holandrii</i> (C. Pfeiffer 1828)	7
1.3. FILOGENIJA	10
1.4. MOLEKULARNA FILOGENIJA	11
1.5. FILOGENETSKO STABLO	12
1.6. FILOGEOGRAFIJA	15
2. CILJEVI	17
3. MATERIJALI I METODE	18
3.1. MATERIJALI	18
3.1.1. Životinjski materijal	18
3.1.2. Kemikalije korištene u molekularnim analizama	21
3.1.3. Kitovi za izolaciju dna	21
3.1.4. Oligonukleotidne početnice	21
3.2. METODE	22
3.2.1 Izolacija ukupne genomske i mitohondrijske DNA	22
3.2.2. Lančana reakcija polimerazom (eng. Polymerase Chain Reaction)	24
3.2.3. Elektroforetsko razdvajanje fragmenata DNA	25
3.2.4. Pročišćavanje i sekvenciranje	26
3.2.5. Računalne analize nukleotidnih sekvenci	26
4. REZULTATI	32
4.1. SRAVNJIVANJE NUKLEOTIDNIH SEKVENCI	32
4.2. FILOGENETIČKE I FILOGEOGRAFSKE ANALIZE SEKVENCI	35
4.2.1. Analiza gena za COI	35
4.2.2. Analiza gena za 16S rRNA	42
4.2.3. Analiza konkateneranih COI+16S rRNA	47
4.3. PROCJENA VREMENA DIVERGENCIJE	51
5. RASPRAVA	53
6. ZAKLJUČAK	58
7. LITERATURA	59
8. ŽIVOTOPIS	66

POPIS KRATICA

A, T, C, G	adenin, timin, citozin, gvanin; nukleotidi
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
RNA	ribonukleinska kiselina
mtDNA	mitohondrijska DNA
pb	parova baza
kb	kilobaze
rRNA	ribosomalna RNA
tRNA	transportna RNA
numt	nuklearna mitohondrijska sekvenca (eng. <i>nuclear mitochondrial sequences</i>)
NJ	metoda susjednog sparivanja (eng. <i>neighbor joining</i>)
MP	metoda najveće štedljivosti (eng. <i>maximum parsimony</i>)
ML	metoda najveće vjerojatnosti (eng. <i>maximum likelihood</i>)
BA	Bayesian analiza (eng. <i>Bayesian analysis</i>)
COI	podjedinica 1 citokrom C oksidaze
dNTP	deoksiribonukleotid trifosfat
TBE	tris-borat-EDTA
Tris-HCl	tris(hidroksimetil)aminometan-hidroklorid
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
PCR	lančana reakcija polimerazom (eng. <i>polymerase chain reaction</i>)
UV	ultraljubičasto
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
NCBI	National Center for Biotechnology Information
BIC	Bayesian informacijski kriterij (<i>Bayesian Information Criterion</i>)
PD	nekorrigirane genetske udaljenosti (eng. <i>uncorrected pairwise distance</i>)
K2P	korrigirane genetske udaljenosti (eng. <i>Kimura 2-parameter genetic distances</i>)

1. UVOD

1.1. OSNOVNE ZNAČAJKE KOLJENA MEKUŠCI (MOLLUSCA)

Koljeno mekušci (Mollusca) predstavlja iznimno raznoliku i mnogobrojnu skupinu životinja s 81 000 opisanih vrsta. Najveći broj pripada morskim vrstama (55 000), manji broj je kopnenih (20 000), a samo 6 000 pripada slatkovodnim vrstama (Bouchet, 2007). To je stara skupina životinja s dugom evolucijskom povijesti i bogatim fosilnim nalazima vapnenačkih ljuštura kambrijske starosti (Habdija i sur., 2011).

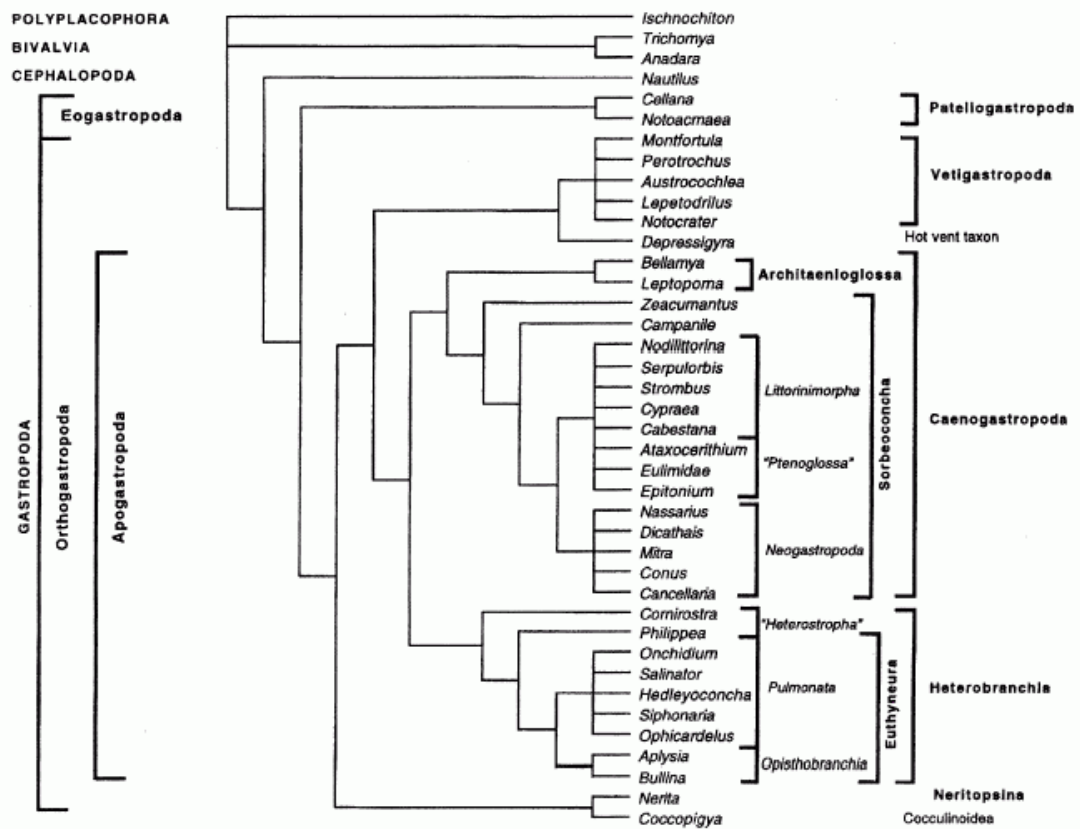
Struktura tijela mekušaca rezultat je evolucije koja je trajala više od 500 milijuna godina i omogućila im prilagodbu na gotovo sva staništa na Zemlji. Postoje značajke koje su uglavnom prisutne u svim razredima, ali mogu biti i reducirane tijekom evolucije (Habdija i sur., 2011). Mekušci su bilateralno simetrične ili sekundarno asimetrične životinje čije je tijelo podijeljeno na ventralno smješteno mišićavo stopalo za pokretanje te dorzalno smješteni plašt i utrobnu vreću s unutrašnjim organima. Kod jednostavnijih mekušaca plašt na površinu tijela izlučuje kutikulu s uložnim vapnenim iglicama ili pločicama koje su kod odvedenijih skupina evoluirale u cjelovitu ljusku. Ljuska je sekundarno reducirana kod nekih puževa i glavonožaca. Kod viših mekušaca između plašta i stopala nalazi se plaštana šupljina s respiratornim organima te izvodima reproduktivnog, ekskrecijskog i probavnog sustava. Puževi plućnjaci koji žive na kopnu umjesto perastih škrga imaju razvijena 'pluća' u obliku razgranjene mreže krvnih žila u epitelu plaštane šupljine. Svi mekušci, osim školjkaša, u ždrijelu imaju radulu koja je građena od sitnih hitinskih zubića za usitnjavanje hrane i usko je specijalizirana ovisno o tipu prehrane. Prisutan je tetraneuralni živčani sustav koji se sastoji od 4 uzdužne živčane vrpce i ganglijskog prstena. Sekundarna tjelesna šupljina ili celom je jako reducirana i ograničen na perikard i gonocel. Optjecajni sustav je otvoren i oksigenirana hemolimfa se izljeva u hemocel oko tjelesnih organa (Habdija i sur., 2011).

Mekušci su sistematski podijeljeni u sedam razreda: Aplacophora (bezljušturaši), Polyplacophora (mnogoljušturaši), Monoplacophora (jednoljušturaši), Gastropoda (puževi), Cephalopoda (glavonošci), Bivalvia (školjkaši) i Scaphopoda (koponošci). Puževi i školjkaši su jedini koji su se uspjeli prilagoditi životu u slatkim vodama, ostali razredi su isključivo morski, a samo puževi su se prilagodili životu na kopnu (Habdija i sur., 2011).

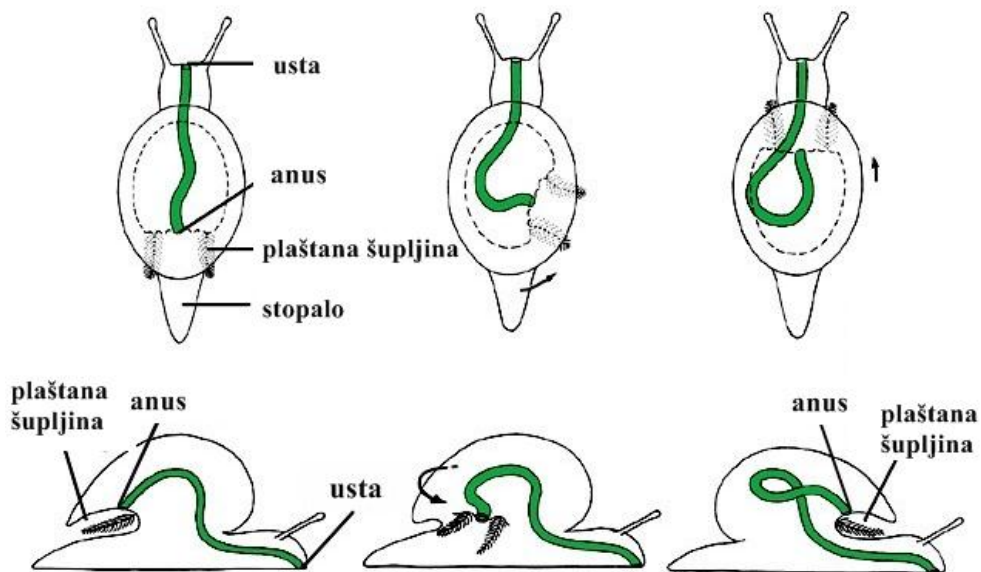
1.2. OSNOVNE ZNAČAJKE RAZREDA PUŽEVI (GASTROPODA)

Etimološko značenje naziva *gastropoda* proizlazi iz grčke riječi „*gaster*“ (*gen. gastros*) što znači želudac i „*pous*“ (*gen. podos*) što znači stopalo. Puževi (Gastropoda) su jedna od faunistički najraznovrsnijih skupina životinja i ujedno najbrojniji razred unutar koljena mekušci (Mollusca). Nastanjuju širok spektar staništa i ekoloških niša te su jedina skupina mekušaca koja je uspjela osvojiti kopno (Ponder i Lindberg, 2008). Najstariji fosilni nalazi puževa potječu iz ranog kambrija i ukazuju da su primarno živjeli u bentosu morskih staništa gdje su se uspjeli prilagoditi različitim tipovima morskog dna. Tijekom svoje evolucije razvili su brojne morfološke, anatomske, fiziološke i etološke prilagodbe na različite životne uvjete. Danas najveći broj vrsta živi u moru, manji broj na kopnu, a najmanji broj vrsta zastupljen je u slatkovodnim staništima.

Recentni puževi podijeljeni su u dva podrazreda: Eogastropoda i Orthogastropoda (Ponder i Lindberg, 2008), ali i dalje se najčešće koristi stara podjela na 3 skupine prema stupnju torzije (Slika 1). Torzija je zajednička karakteristika svih puževa, a predstavlja zakretanje utrobne vreće i plaštanog kompleksa za 180° tijekom embrionalnog razvoja (Habdija i sur., 2011) (Slika 2). Torzija rezultira drugačijim rasporedom unutrašnjih organa u različitim vrsta stoga je prema njenom stupnju napravljena podjela recentnih puževa na prednjoškrznjake (Prosobranchiata), stražnjoškrznjake (Opisthobranchiata) i plućnjake (Pulmonata) (Matoničkin i sur., 1998; Habdija i sur., 2004). Prednjoškrznjacima je plaštani kompleks pomaknut naprijed čime je par škrge došao u položaj ispred srca (Zygobranchia), a zadržali su obje pretklijetke (Diotocardia). U drugih prednjoškrznjaka plaštani kompleks se još više pomicao u lijevo tako da se zadržala samo jedna škrge (Azygobranchia) i samo jedna pretklijetka (Monotocardia). Kod stražnjoškrznjaka dolazi do određenog stupnja detorzije pa su jedna škrge (Azygobranchia) i jedna pretklijetka (Monotocardia) došle u položaj iza srca. Torzija plaštanog kompleksa prisutna je i kod plućnjaka, samo što su kod njih škrge reducirane i zamijenjene spletom krvnih žila (Matoničkin i sur., 1998; Habdija i sur., 2004). Važnost torzije je u povoljnijem anteriornom položaju organa plaštane šupljine čime životinja dobiva čistu vodu za disanje, ali i u koncentraciji osjetljivih organa u prednjem dijelu tijela.



Slika 1. Filogenetsko stablo Gastropoda prema Ponder i Lindberg (1997).



Slika 2. Torzija kod puževa. Preuzeto i prilagođeno sa bioweb.uwlax.edu/bio210/2011/.

Većina puževa ima spiralno savijenu jednodijelnu kućicu koja se sastoji od različitog broja zavoja, od kojih je posljednji zavoj najveći i na njemu se otvara ušće (*apertura*). Ušće kućice prednoškržnjaka zatvara operkulum, tj. poklopac kojeg izlučuje stražnji dio stopala, a služi kao zaštita od predatora i isušivanja. Vršni dio kućice je najstariji, a bazalni dio je najmlađi. Ako se zavoji dotiču u osi spirale nastaje vreteno (*columella*), a ako se ne dotiču, nastaje šuplje vreteno koje s donje strane ima pupak (*umbilicus*) (Matoničkin i sur., 1998; Habdija i sur., 2004). Stijenka kućice građena je od tri sloja: vanjskog sloja (*periostracum*) koji je izgrađen od organske tvari konhina te srednjeg (*ostracum*) i unutarnjeg sloja (*hyostracum*) koji su vapnenački (Habdija i sur., 2011). Kućicu izlučuje rubni dio plašta.

Plašt (*pallium*) obavija cijelo tijelo, osim glave i stopala, a budući da izlučuje kućicu prirastao je uz nježni rub poput nabora. Kod nekih morskih vrsta koje se ukopavaju u supstrat postoji sifon koji predstavlja produžetak plašta kroz koji voda ulazi u plaštanu šupljinu. Između plašta i tijela smještena je plaštana šupljina u kojoj se kod vodenih vrsta nalaze peraste škrge za disanje ili ktenidije. Puževi plućnjaci nemaju prave škrge, već prokrvljen plašt preuzima ulogu dišnog organa (Habdija i sur., 2004, 2011). Između plašta i kućice je izvanplaštana tekućina.

Tijelo puža prekriva jednoslojni epiderm koji se sastoji od trepetljivikavih epitelnih i žljezdanih stanica koje su izrazito važne zbog lučenja sluzi. Sluz štiti od isušivanja, a kopnenim puževima pomaže u kretanju (Habdija i sur., 2011). Epiderm je s kućicom srastao samo na dva mjesta, na rubu plašta i na najstarijem zavoju s unutrašnje strane.

S ventralne strane tijela, puževi imaju dobro razvijeno mišićno stopalo s trepetljivikavim epidermom koji je bogat žlijezdama. Iz stopala izlazi dorzoventralni mišić koji je pričvršćen za vrh kućice, a njegovim stezanjem dolazi do savijanja i uvlačenja stopala u kućicu. Neki puževi na stopalu imaju bisusne žlijezde koje luče bisusne niti za pričvršćivanje za podlogu (Matoničkin i sur., 1998; Habdija i sur., 2004).

U epidermu se nalaze osjetne stanice koje reagiraju na mehaničke i kemijske podražaje, a smještene su po cijeloj površini kože, najgušće na rubovima stopala i ticalima (Matoničkin i sur., 1998). Vrste koje žive u vodi imaju kemoreceptore u obliku osfradija u blizini škrge. Fotoreceptori su smješteni u jamičastim ili mjehurastim očima na ticalima ili blizu njih. Organi za ravnotežu su statocisti i nalaze se na stopalu puža (Habdija i sur., 2004). Živčani sustav čini pet pari ganglija: cerebralni, pedalni, pleuralni, visceralni i parijetalni (Matoničkin, 1998).

Optjecajni sustav je otvoren i njime struji hemolimfa koja prenosi hranjive tvari, metaboličke plinove i ekskrete. Hemolimfa djeluje kao hidroskelet i svojim turgorom sudjeluje u izvlačenju i uvlačenju tijela u kućicu. U hemolimfi je otopljen respiratorni pigment hemocijanin (Habdija i sur., 2004). Srce se nalazi u šupljini koja je obavijena perikardom, a sastoji se od jedne ili dvije pretkljetke koje su zaliscima povezane s mišićavom kljetkom (Habdija i sur., 2011).

U ždrijelu puževa nalazi se radula ili trenica koja je specijalizirana i prilagođena načinu prehrane životinje. Sastoji se od hitinske membrane s brojnim redovima mikroskopskih zubića te hrskavične podloge i mišića. Kod plućnjaka se zubići gotovo ne razlikuju jedan od drugog, a u drugim skupinama postoje razlike koje su važne pri određivanju vrsta (Matoničkin, 1998). Prema vrsti prehrane puževi se dijele na biljojede, mesojede, svejede i detritivore (Habdija i sur., 2004).

Ekskretorni organi su metanefridiji. Vodene vrste izlučuju amonijak preko kože, škrga i metanefridija. Amonijak je topljiv u vodi, a zbog otrovnog učinka odstranjuje se iz tijela u velikim razrjeđenjima. Kopneni puževi su razvili sposobnost resorpcije vode i soli te tako nakupljaju mokraćnu kiselinu koja nije otrovna i izlučuje se iz tijela u krutom stanju (Habdija i sur., 2011).

Prednjoškržnjaci su većinom razdvojena spola, a stražnjoškržnjaci i plućnjaci su dvospolci. Oplodnja je vanjska ili unutarnja. Nakon gastrulacije razvija se plivajuća ličinka trohofora koja sazrijevanjem prelazi u veliger ličinku (Habdija i sur., 2011).

1.2.1. Slatkovodni puževi

Puževi su u više navrata kolonizirali kontinentalne vode. Procjenjuje se da je najmanje 33 - 38 nezavisnih linija puževa uspješno osvojilo slatkovodna staništa (Strong i sur., 2008). Osnova za njihov prelazak iz mora u slatku vodu bila je sposobnost osmoregulacije, ali i sposobnost prilagodbe na stalne promjene u temperaturi, količini i strujanju vode u slatkovodnom okolišu, koje su u suprotnosti s prilično stabilnim uvjetima života u moru. Globalne vruće točke (eng. *hot-spots*) raznolikosti slatkovodnih puževa mogu se klasificirati u četiri glavne kategorije: izvori i podzemna voda, velike rijeke i njihovi pritoci prvog i drugog reda, stara oligotrofna jezera, monsunske močvare i s njima povezane rijeke i pritoci (Strong i

sur., 2008). Najveća raznolikost slatkovodnih puževa je u tropskim područjima, a smanjuje se prema višim geografskim širinama (Slika 3) (Strong i sur., 2008).



Slika 3. Vruće točke raznolikosti slatkovodnih puževa. A-H: Izvori i podzemna voda; I-Q: Jezera; R-X: Rijeke; Y: Monsunske močvare. E: Južni dio Alpi i Balkan; V: Zrmanja. Preuzeto iz Strong i sur. (2008).

Slatkovodna fauna broji oko 4 000 opisanih vrsta puževa koji su prilagođeni širokom spektru staništa (Strong i sur., 2008). U slatkovodnim ekosustavima prisutni su prednjoškrznjaci koji uzimaju otopljeni kisik iz okolne vode i plućnjaci koji izlaze na površinu vode kako bi uzeli atmosferski kisik. Uglavnom se radi o vrstama bentosa koje nastanjuju različite tipove tekućica ili stajaćica. Slatkovodni puževi žive uglavnom na dnu, blizu ruba plitke vode (Pfleger, 1999). Malo je vrsta koje žive u dubokim jezerima ili velikim rijekama, odnosno rijetke su vrste koje dolaze u većim populacijama na dubini većoj od 4 m (Pfleger i Chatfield, 1988).

Povoljnost staništa za normalan rast i razvoj puževa ovisi o brojnim abiotičkim i biotičkim faktorima - temperaturi, salinitetu, pH vrijednosti, koncentraciji kalcijevih iona, količini otopljenog kisika, supstratu, strujanju vode, kompeticiji za hranu, predatorima i parazitima (Glöer, 2002). Slatkovodne puževe karakterizira visoka tolerancija na promjene pH vrijednosti vode, prilagodba na nisku koncentraciju natrijevog klorida u vodi (Glöer, 2002), različita tolerancija na temperaturu, život na manjim dubinama i u vodi s većom količinom kalcijevih iona te u staništima s gustom vegetacijom (Pfleger, 1999). Kisik je važan čimbenik za prednjoškrznjake jer oni uzimaju otopljeni kisik iz vode, a za razliku od njih, plućnjaci mogu uzimati atmosferski kisik s vodene površine penjući se na vodenu vegetaciju ili samo plutajući na površini (Glöer, 2002). Tekućice imaju više kisika nego vode stajaćice (Glöer, 2002) stoga prednjoškrznjaci uglavnom žive u tekućicama s puno kisika, a plućnjaci preferiraju stajaće ili slabo tekuće vode (Pfleger, 1999).

Slatkovodni mekušci predstavljaju jednu od ugroženijih skupina životinja (Lydeard i sur., 2004). Glavni razlozi smanjenja broja vrsta i pada gustoće populacija mogu se pripisati osobinama njihovog životnog ciklusa i antropogenim utjecajima (Strong i sur., 2008). Karakteristike koje čine osjetljive vrste teško prilagodljivima na promjene u okolišu su slaba pokretljivost, uska vezanost za točno određeni tip staništa, ograničen areal, dugo vrijeme spolnog sazrijevanja, niska plodnost i relativno dug životni vijek (Strong i sur., 2008). Štetni antropogeni utjecaji podrazumijevaju intenzivnu poljoprivredu, povećano korištenje kemijskih gnojiva i pesticida, urbanizaciju, pretjerano iskorištavanje i preoblikovanje vodenih površina, invazivne vrste te klimatske promjene popraćene povećanom učestalošću i intenzitetom suša (Cuttelod i sur., 2011).

Taksonomija i sistematika slatkovodnih puževa Europe bila je predmetom brojnih revizija tijekom godina. Klasifikacija slatkovodnih puževa kao i klasifikacija živog svijeta općenito, temelji se isključivo na morfološkim karakteristikama. Osnovni determinacijski kriterij su karakteristike kućice. Problem s kojim se suočavaju znanstvenici je sistematika bazirana većinom na morfologiji koja nije u skladu s rezultatima molekularno-genetičkih analiza. Puževi su poznati po velikoj varijabilnosti u obliku, boji i morfometrijskim značajkama svojih kućica. Povijesno gledajući, karakteristike i morfologija kućica igrale su značajnu ulogu u opisivanju vrsta. Danas je korištenje samo osobina kućica u svrhu taksonomije i sistematike kontraverzno jer one mogu biti pod utjecajem brojnih čimbenika te ovisiti o kompeticiji, parazitizmu, dostupnosti hrane i kalcijevih iona u staništu, tipu supstrata ili salinitetu (Wilke i Falniowski, 2001). Zbog navedenih razloga, razvoj i primjena molekularnih biljega je vrlo bitna u istraživanju taksonomije i sistematike slatkovodnih puževa, ali i puževa općenito. Pri tome se filogenetski odnosi unutar vrste, kao i unutar viših taksonomskih kategorija, pokušavaju razriješiti korištenjem modernih molekularno-bioloških metoda.

1.2.2. Vrsta *Holandriana holandrii* (C. Pfeiffer 1828)

Slatkovodna vrsta puža *Holandriana holandrii* (C. Pfeiffer, 1828) široko je rasprostranjena u tekućicama jugoistočne Europe. Područje rasprostranjenosti obuhvaća slatkovodna staništa u Albaniji, Austriji, Bugarskoj, Mađarskoj, Rumunjskoj, Makedoniji, Sloveniji, Hrvatskoj, Bosni i Hercegovini, Crnoj Gori i Grčkoj (Slika 4). U Hrvatskoj je rasprostranjena u većini rijeka crnomorskog sliva (Dunav, Sava, Drava, Kupa, Mrežnica,

Iako je glavna prijetnja staništu onečišćenje koje narušava njegovu kvalitetu, *H. holandrii* je relativno otporna u odnosu na druge slatkovodne vrste. Na europskoj razini svrstana je u kategoriju najmanje zabrinjavajuće vrste (LC, eng. *Least Concern*) zbog široke rasprostranjenosti na području Balkana (Tomović i sur., 2011). Zaštićena je u Mađarskoj, u Sloveniji se smatra osjetljivom vrstom (VU, eng. *Vulnerable*), a u Austriji je izumrla uslijed degradacije staništa. Vrsta je označena kao dobar indikator organskog onečišćenja (Moog, 2002), a može se koristiti i kao biomarker oksidativnog stresa u okolišu (Vranković i sur., 2012).

Spada u porodicu Melanopsidae koja je vrstama i brojnošću dominirala Panonskim jezerom koje je prekrivalo značajan dio Europe prije 12 - 4 milijuna godina za vrijeme kasnog miocena i pliocena (Geary i sur., 2000; Harzhauser i Mandic, 2008). Recentni predstavnici ove porodice vjerojatno su ostaci te radijacije (Smoleń i Falniowski, 2009). Panonsko jezero nastalo je izolacijom od okolnog morskog područja (Rögl, 1998), a jedna od njegovih ostavština je bogata endemska malakofauna s preko 900 opisanih vrsta (Geary i sur., 2000). Dugi životni vijek jezera te porijeklo faune u reliktnim morskim i okolnim slatkovodnim sustavima smatra se razlogom visoke raznolikosti i velikog broja endema (Geary i sur., 2000). Glavna radijacija melanopsidnih puževa u jezeru odvijala se prije 10 i 8 milijuna godina (Harzhauser i Mandic, 2008). Od ostalih vrsta u porodici *H. holandrii* odvojila se prije oko 9.5 - 10.7 milijuna godina što se poklapa s periodom glavne radijacije melanopsidne faune u Panonskom jezeru. Razmatrajući područje recentne rasprostranjenosti pretpostavlja se da je predak *H. holandrii* živio u južnom ili jugozapadnom dijelu jezera, a predak ostalih vrsta u sjeveroistočnom (Smoleń i Falniowski, 2009).

Filogenetski odnosi unutar porodice Melanopsidae i njen položaj u kontekstu viših taksonomskih kategorija nije u potpunosti razjašnjen, ali većina autora slaže se s monofiletskim porijeklom i položajem unutar natporodice Cerithioidea koja se smatra bazalnom skupinom Caenogastropoda (Smoleń i Falniowski, 2009).

Prema danas važećoj sistematici vrsta *H. holandrii* svrstana je u sistematske kategorije prikazane u Tablici 1. Filogenetski i filogeografski odnosi populacija ove vrste na području rasprostranjenja, ali i na području Hrvatske, su neistraženi. S obzirom da se krško područje zapadnog Balkana smatra vrućom točkom slatkovodne bioraznolikosti moguće je da pojedine populacije predstavljaju divergentne, dugotrajno izolirane genetske linije i kao takve značajno pridonose ukupnoj genetskoj raznolikosti vrste.

Tablica 1. Sistematski položaj vrste *Holandriana holandrii* (Pfeiffer, 1828) prema www.faunaeur.org.

CARSTVO	Animalia
PODCARSTVO	Eumetazoa
KOLJENO	Mollusca
RAZRED	Gastropoda
PODRAZRED	Orthogastropoda
NADRED	Caenogastropoda
RED	Neotaenioglossa
NATPORODICA	Cerithoidea
PORODICA	Melanopsidae
ROD	<i>Holandriana</i>
VRSTA	<i>Holandriana holandrii</i> C. Pfeiffer, 1828

1.3. FILOGENIJA

Filogenija je znanstvena disciplina koja se bavi istraživanjem evolucijske prošlosti različitih taksonomskih kategorija. Proučava srodstvene odnose između i unutar pojedinih taksona na temelju njihovih morfoloških, anatomskih, fizioloških, etoloških, ekoloških, biogeografskih i paleontoloških karakteristika.

Osnova za proučavanje filogenije su homologije, odnosno sličnosti između organizama koje su posljedica nasljeđivanja od zajedničkog pretka. Prilikom opisivanja stupnjeva srodnosti istraživanih taksona, filogenija koristi nekoliko mogućih odnosa između njihovih karakteristika. Apomorfija je izvedeno karakterno stanje koje nije prisutno kod zajedničkog pretka taksona koji se istražuje. Autapomorfija predstavlja izvedeno karakterno stanje specifično za jedan takson, a sinapomorfija je izvedeno karakterno stanje koje dijele dva ili više taksona potomaka, a naslijedili su ga od posljednjeg zajedničkog pretka. Pleziomorfija je ancestralno karakterno stanje prisutno kod zajedničkog pretka taksona koji se istražuje, a simpleziomorfija predstavlja ancestralno karakterno stanje koje dijele dva ili više taksona potomaka. Homoplazija predstavlja sličnosti između pojedinih taksona koje nisu rezultat nasljeđivanja od zajedničkog pretka, već su posljedica paralelizma, reverzne ili konvergentne evolucije (Kalafatić, 1998). Konvergentna evolucija označava pojavu da različiti organizmi uslijed sličnih selektivnih pritisaka neovisno razvijaju slične prilagodbe. Prilikom rekonstrukcije filogenetskih odnosa bitno je razlikovati homologije od homoplazija jer mogu rezultirati krivom interpretacijom rezultata.

1.4. MOLEKULARNA FILOGENIJA

Molekularna filogenija proučava srodstvene odnose između i unutar pojedinih taksona na razini makromolekula, tj. DNA, RNA i proteina. Molekularno-filogenetička analiza je spoj molekularno-bioloških i bioinformatičkih tehnika te obuhvaća izolaciju i umnažanje DNA iz odabranog organizma, sekvenciranje, višestruko sravnjivanje sekvenci proučavanih skupina, određivanje supstitucijskog modela za konstruiranje filogenetskog stabla, rekonstrukciju filogenetskog stabla i u konačnici njegovu analizu.

Ključan element u proučavanju srodstvenih intraspecifičnih i interspecifičnih odnosa jest odabir prikladnog genskog biljega. Genski biljezi su najčešće varijabilni dijelovi molekule DNA koji se lako identificiraju i izoliraju (Schulman i sur., 2004). Mogu se koristiti u detekciji genetske varijabilnosti koja nastaje zbog promjena u nukleotidnom slijedu uslijed djelovanja mutacija. Varijabilnost korištenih genskih biljega mora biti u skladu s taksonomskom razinom na kojoj se analiza provodi. Postoje dva osnovna tipa biljega: visoko konzervirani i varijabilni. Visoko konzervirani genski biljezi prikladniji su u istraživanjima na višim taksonomskim kategorijama, odnosno korisniji su u otkrivanju filogenetskih odnosa između udaljenijih skupina. Izrazito varijabilni biljezi koriste se u istraživanjima na nižim taksonomskim razinama, u otkrivanju filogenetskih odnosa nedavno odvojenih, blisko srodnih skupina (Hwang i Kim, 1999). U filogenetičkim rekonstrukcijama preporuča se korištenje više biljega koji su varijabilne brzine mutacija i različita porijekla (jezgrini, citoplazmatski, spolno vezani...) (Emerson i Hewitt, 2005). Upotreba većeg broja genskih biljega doprinosi vjerodostojnosti podatka i olakšava otkrivanje hibridizacije, lateralnog prijenosa gena, umnožavanja pseudogena i sličnih procesa koji mogu rezultirati krivim zaključcima (Bermingham i Moritz, 1998).

U zoološkim istraživanjima koriste se genski biljezi iz jezgrine ili mitohondrijske DNA (mtDNA). Najčešće korištena metoda za proučavanje animalnih populacija je analiza mtDNA (Moritz, 1994). MtDNA je kružna dvolančana molekula veličine između 15 000 i 20 000 parova baza (pb), a nalazi se u matriksu mitohondrija. Funkcionalno se dijeli na kodirajuću i nekodirajuću regiju. Kodirajuća regija mitohondrijskog genoma životinja sadrži 37 gena: dva za rRNA, 13 za proteine i 22 za tRNA (Tzgaloff i Myers, 1986). Nekodirajući segment mitohondrijskog genoma je kontrolna regija, tzv. D-petlja, koja sadrži ponavljajuće sljedove i važna je za inicijaciju transkripcije i replikacije. Naziva se i hipervarijabilnom regijom jer akumulira točkaste mutacije deset puta više nego jezgrina DNA (Hwang i Kim,

1999). Karakteristike koje mtDNA čine pogodnom za filogenetičke analize su laka izolacija, velik broj kopija, nasljeđivanje po majčinoj liniji, nepostojanje rekombinacije i brža evolucija u odnosu na jezgrinu DNA. Smatra se selekcijski neutralnom, a jednostavna genetička struktura bez ponavljajuće DNA, introna, transpozona i pseudogena pogodna je za različite molekularne analize (Avice, 1987). Za filogenetička istraživanja od posebnog je značaja da mtDNA može osigurati tzv. molekularni sat kojim se mjeri vrijeme proteklo od razdvajanja taksona. Vrijeme divergencije taksona na temelju stupnja genetske divergencije moguće je odrediti jer prema teoriji molekularnog sata, DNA sekvence nakupljaju promjene linearno u vremenu (Zuckerlandl i Pauling, 1965). Međutim, postoje odstupanja od te teorije jer na evolucijsku ratu određenog organizma djeluje niz čimbenika. Biološki čimbenici koji utječu na odstupanje od konstantne evolucijske rate su generacijsko vrijeme, veličina populacije, metabolizam, promjena u funkciji proučavanih proteina, vrsno specifične razlike u svojstvima koja utječu na replikaciju DNA, promjene u intenzitetu prirodnog odabira, veličina organizma, temperatura tijela i način razmnožavanja (Wilke i sur., 2009). Stoga se u svrhu točnije procjene vremena divergencije koriste modeli koji uzimaju u obzir razlike u evolucijskoj rati između pojedinih linija, tzv. relaksirani molekularni sat. Upotreba jezgrine DNA ograničena je sporijom evolucijom i rekombinacijama koje značajno kompliciraju analize podataka (Bermingham i Moritz 1998). Eventualni nedostaci korištenja mtDNA u filogenetičkoj analizi su praćenje isključivo ženske linije zbog uniparentalnog nasljeđivanja te mogućnost krive interpretacije filogenetskih odnosa zbog umnažanja nuklearnih mitohondrijskih sekvenci (numt, eng. *numts*) koje su nehotice uvrštene u analizu. Nuklearne mitohondrijske sekvence predstavljaju dijelove mitohondrijskog genoma koji se ugrađuju u genom jezgre. Nakon integracije mitohondrijske sekvence u genom jezgre ona se ponaša kao pseudogen i brzina njene evolucije se smanjuje i postaje slična onoj okolnih jezgrinih sekvenci.

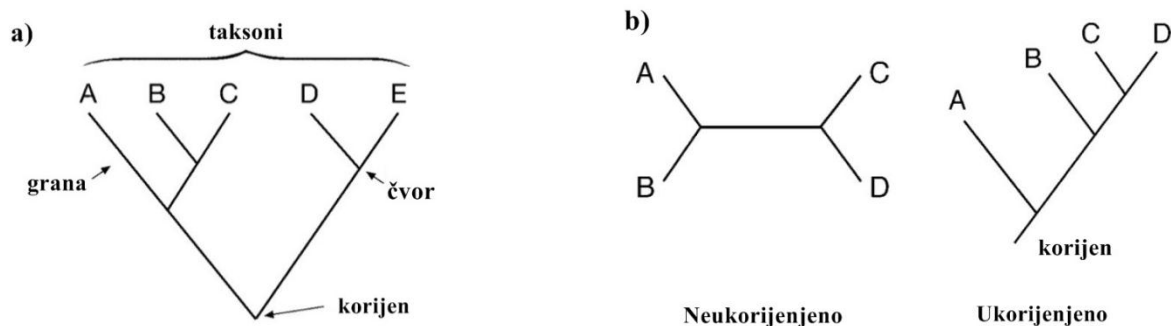
1.5. FILOGENETSKO STABLO

Cilj molekularno-filogenetičkih analiza je rekonstrukcija srodnosti i određivanje vremena koje je proteklo od trenutka kada su organizmi dijelili zajedničkog pretka. Konačni rezultat analiza je taksonomski dijagram poznatiji kao filogenetsko stablo koje prikazuje evolucijske odnose između određenih taksona. Filogenetsko stablo predstavlja najvjerojatnije stablo na osnovu unesenih parametara, modela i pretpostavki.

Filogenetsko stablo sastoji se od čvorova i grana (Slika 6a). Čvorovi predstavljaju taksonomske jedinice koje proučavamo, a mogu biti unutarnji (HTU, eng. *hypothetical taxonomic units*) ili vanjski (OTU, eng. *operational taxonomic units*). Vanjski čvorovi predstavljaju taksone koje proučavamo, a unutarnji njihove hipotetske zajedničke pretke. Razlikujemo vanjske grane koje završavaju taksonima koje proučavamo i unutarnje koje povezuju taksone i njihovog hipotetskog pretka (Hall, 2007). Način grananja predstavlja topologiju stabla tj. odnose među jedinicama u smislu potomka i pretka. Filogenija s bifurkatnim grananjima naziva se dihonomija, a filogenija s multifurkatnim grananjima označava politomiju. Politomija može biti rezultat procesa radijacije u kojem je iz ancestralnog taksona istovremeno evoluiralo više različitih potomaka ili je znak nerazriješene filogenije (Xiong, 2006).

Postoje dva osnovna tipa taksonomskih dijagrama: filogram i kladogram. U filogramu duljina grana odražava evolucijsku udaljenost, tj. predstavlja trajanje evolucijskih procesa u razvojnoj liniji. Dulja grana označava da je od vremena odvajanja prošlo više vremena i da se u makromolekuli nakupilo više promjena. U kladogramu nema informacija o evolucijskoj udaljenosti; vanjski čvorovi su postavljeni na jednakoj udaljenosti stoga takvo stablo prikazuje samo topologiju (Xiong, 2006)

Filogenetsko stablo može biti ukorijenjeno i neukorijenjeno (Slika 6b). Ukorijenjeno stablo sadrži jedinstveni čvor (korijen) koji predstavlja pretka svih taksonomskih jedinica koje proučavamo. Stabla se ukorjenjuju pomoću vanjske skupine (eng. *outgroup*). Vanjska skupina nije član analiziranog taksona, ali je s njim blisko srodna. Neukorijenjena stabla predstavljaju srodstvene odnose između taksona bez stvaranja hipoteza o zajedničkim precima (Hall, 2007). Ukorjenjivanje stabla je važno jer omogućava razlikovanje ancestralnih (pleziomorfni) i izvedenih (apomorfni) osobina, a važno je i u objašnjavanju karaktera evolucije.



Slika 6. a) Osnovna shema i nazivlje filogenetskog stabla. b) Ukorijenjeno i neukorijenjeno stablo.

Preuzeto i prilagođeno iz Xiong (2006).

U opisivanju filogenetskih odnosa između taksonomskih jedinica filogenetskog stabla razlikujemo monofiletsku, parafiletsku i polifiletsku grupu. Svi članovi unutar monofiletske grupe potječu od istog zajedničkog pretka koji je karakterističan samo za tu grupu. Monofiletska grupa definirana je sinapomorfijama i u sistematici se još često naziva kladij (eng. *clades*). Parafiletska grupa definirana je pleziomorfijama i sadrži najmlađeg zajedničkog pretka, ali ne sadrži sve potomke tog pretka. Polifiletska grupa sadrži taksone koji nisu evoluirali od istog zajedničkog pretka i nastaje kao rezultat pogrešne upotrebe homoplazijskih karakteristika u izradi filogenetskih stabala (Li, 1997).

Veća vjerodostojnost rezultata molekularno-filogenetičke analize postiže se korištenjem većeg broja genskih biljega, ali i korištenjem različitih metoda za rekonstruiranje filogenetskog stabla. Četiri osnovna koraka u filogenetičkoj analizi su višestruko sravnjivanje, određivanje supstitucijskog modela, rekonstrukcija filogenetskog stabla i analiza dobivenog stabla (Baxevanis i Oullette, 2001). Metode za rekonstrukciju stabla mogu se podijeliti na metode bazirane na matrici udaljenosti (eng. *distance matrix*) i metode bazirane na stanjima karaktera (eng. *character state*). Metode bazirane na matrici udaljenosti izračunavaju set udaljenosti među parovima sekvenci i koriste samo te fiksne udaljenosti u daljnjim proračunima. Metode bazirane na stanjima karaktera proučavaju nukleotide i aminokiseline (stanja) na pojedinoj poziciji u sravnjenju (karakteru), kao i pojavu insercija i delecija (Li, 1997). Metode prema primijenjenoj strategiji za rekonstrukciju stabla dijelimo na metode koje koriste strategiju postepenog klasteriranja (eng. *stepwise clustering*) ili strategiju iscrpnog pretraživanja (eng. *exhaustive research*) (Baxevanis i Oullette, 2001). Sve metode ovise o postavljenom matematičkom modelu koji opisuje evoluciju proučavanih skupina. Najčešće korištene metode filogenetske rekonstrukcije (Baxevanis i Oullette, 2001):

- Metoda susjednog sparivanja (NJ, eng. *neighbor joining*) (Saitou i Nei, 1987) temelji se na matrici udaljenosti i koristi strategiju postepenog klasteriranja. Princip podrazumijeva pronalaženje susjednih taksonomskih jedinica kako bi se na kraju minimalizirala ukupna duljina stabla.
- Metoda najveće štedljivosti (MP, eng. *maximum parsimony*) (Swofford, 2001) temelji se na stanjima karaktera i koristi strategiju iscrpnog pretraživanja. Zasniva se na principu Okamove oštice kod kojeg se najjednostavnija hipoteza uvijek uzima kao najbolja tj. u okviru filogenetskog stabla nastoji pronaći stablo za čiju je topologiju odgovoran minimalan broj evolucijskih promjena.

- Metoda najveće vjerojatnosti (ML, eng. *maximum likelihood*) (Felsenstein, 1973, 1981) temelji se na stanjima karaktera i koristi strategiju iscrpnog pretraživanja kao i MP. Algoritam proučava vjerojatnost pojavljivanja svake nukleotidne baze ili aminokiseline u ancestralnom izvoru i iz tih vrijednosti rekonstruira vjerojatnost strukture stabla.
- Bayesian analiza (BA, eng. *Bayesian analysis*) (Mau i sur., 1999) je relativno nova metoda stanja karaktera, a temelji se na spoznaji o tzv. naknadnim vjerojatnostima (eng. *posterior probabilities*) tj. vjerojatnostima koje su procijenjene na osnovu nekog evolucijskog modela (eng. *prior expectation*).

Korištenjem tradicionalnih filogenetičkih metoda, evolucijski odnosi između taksona prikazuju se pomoću filogenetskog stabla koje je dobar odabir za prikaz interspecifičnih evolucijskih odnosa. Međutim, osim standardnog prikaza pomoću stabla, odnosi se mogu rekonstruirati izradom filogenetske mreže koja je bolji odabir za prikazivanje intraspecifičnih evolucijskih odnosa (Posada i Crandall, 2001). Intraspecifični set podataka karakterizira nizak stupanj različitosti koji rezultira manjim brojem značajki za filogenetičke analize i smanjenom statističkom snagom tradicionalnih filogenetičkih metoda. Također su prisutni ancestralni haplotipovi koji koegzistiraju s haplotipovima koji su iz njih nastali, ali i stvarna politomija jer iz pojedinačnog ancestralnog haplotipa često nastaje više različitih haplotipova potomaka. Filogenetske mreže uzimaju u obzir pretpostavke populacijske genetike u vezi učestalosti i geografske distribucije haplotipova. Korištenjem haplotipske mreže izbjegnuto je prisilno uklapanje podataka u dihotomsku strukturu, a moguće je dobiti uvid u ukupnu raznolikost haplotipova, učestalost pojedinog haplotipa, različitost između haplotipova (genetska udaljenost) te uvid u izumrle ancestralne ili neuzorkovane haplotipove.

1.6. FILOGEOGRAFIJA

Filogeografija je „područje istraživanja koje se bavi principima i procesima koji upravljaju geografskom distribucijom genealoških linija unutar vrste te između usko srodnih vrsta“ (Avice, 2000). Razvila se iz spoznaje da linije mtDNA u prirodnim populacijama često imaju karakterističnu geografsku distribuciju. Za analizu i interpretaciju koristi spoznaje iz različitih grana biologije, ali primarno se temelji na rezultatima molekularno-filogenetičkih analiza preko kojih proučava evolucijske odnose u geografskom kontekstu. Istraživanjem

genealogije gena mtDNA unutar vrsta postavljene su tri osnovne hipoteze filogeografije (Avice, 1987):

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

Komparativna filogeografija pokušava objasniti mehanizme koji su odgovorni za filogeografske uzorke različitih vrsta na određenom području i utvrditi utjecaj zajedničkih povijesnih faktora. Uspoređivanje uzoraka različitih vrsta i traženje podudarajućih uzoraka može značajno pomoći u razrješavanju povijesti biogeografskih regija (Moritz i Faith, 1998). Komparativna filogeografija smatra se jednim od načina koji omogućava utvrđivanje utjecaja geografije na genetsku komponentu raznolikosti kao jednog od elemenata pri određivanju prioriteta zaštite i gospodarenja (Moritz i Faith, 1998). Genetska raznolikost priznata je kao komponenta prirodne biološke raznolikosti i štiti je nekoliko međunarodnih konvencija i zakona. Filogenetičke i filogeografske analize su odlične za otkrivanje procesa koji su utjecali ili utječu na genetski sastav vrste i njihovim ulaskom u polje konzervacijske biologije omogućena je detekcija evolucijski značajnih jedinica (ESU, eng. *evolutionary significant units*), tj. populacija koje su recipročno monofiletske za alele mtDNA i pokazuju značajnu divergenciju frekvencije alela na jezgrinom lokusu (Moritz, 1994).

2. CILJEVI

- Utvrđivanje molekularno-filogenetskih odnosa populacija vrste *H. holandrii* analizom nukleotidnih sekvenci mitohondrijskih gena za COI i 16S rRNA.
- Utvrđivanje genetske udaljenosti između različitih populacija vrste *H. holandrii*.
- Metodom molekularnog datiranja procijeniti vremena međusobnog odvajanja populacija vrste *H. holandrii* u evolucijskoj prošlosti.
- Utvrđivanje filogeografskog uzorka vrste *H. holandrii* u Hrvatskoj te njegova usporedba s filogeografskim uzorcima dosad analiziranih slatkovodnih vrsta na istom području.

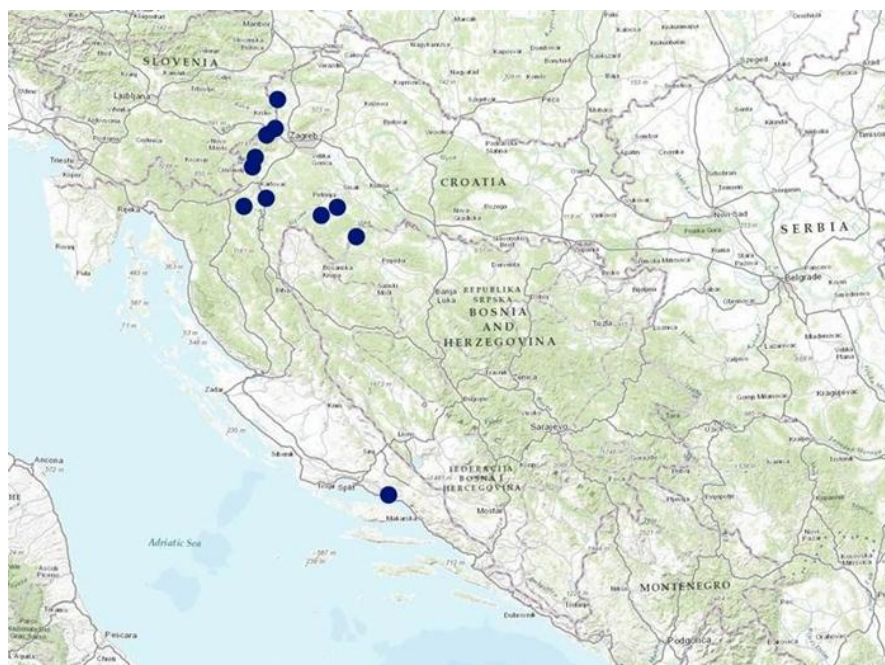
3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

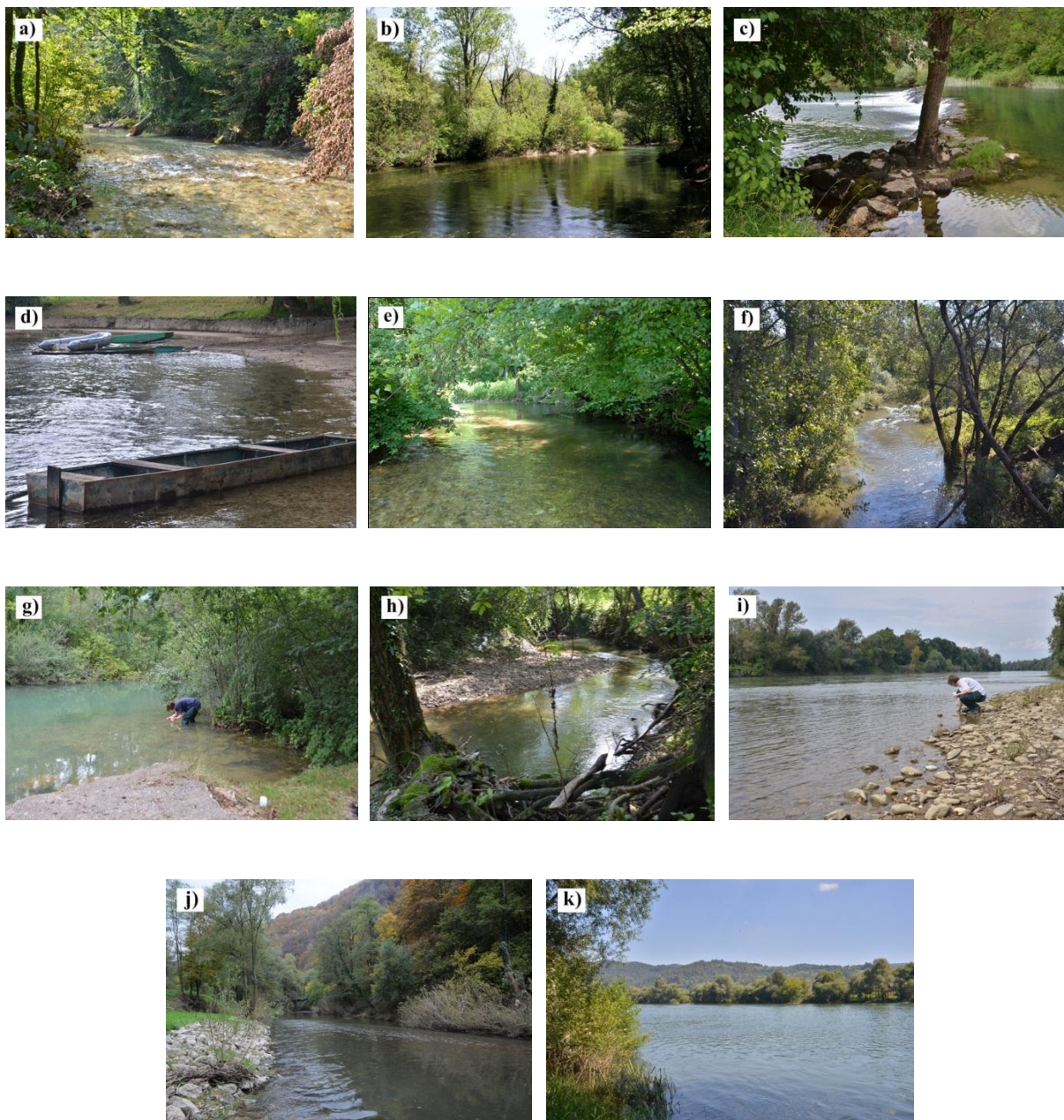
3.1.1. Životinjski materijal

Molekularno-filogenetičke analize provedene su na uzorcima vrste *Holandriana holandrii* sakupljenima na 11 lokaliteta terenskim istraživanjima 2014. godine (Slika 7 i 8, Tablica 2). Za izradu ovog diplomskog rada prvotno su korištene jedinke puža sakupljene na terenskim istraživanjima od 2006. do 2010. godine, ali zbog niza razloga, poput starosti materijala, njegovog neadekvatnog skladištenja, neprikladnosti kita i/ili postupka za izolaciju DNA, oni nisu mogli biti korišteni u daljnjoj analizi i time je količina i raznolikost uzoraka s obzirom na lokalitete smanjena.

Iz sakupljenih jedinki sekcijom je izolirano tkivo stopala. Uzorci tkiva su konzervirani u mikropruветama s 96 %-tnim etanolom i pohranjeni na +4 °C. Svakom uzorku tkiva dodijeljena je jedinstvena oznaka u obliku slova i broja. Dio tkiva korišten je za izolaciju DNA, a ostatak je pohranjen na -80 °C u „Zbirku tkiva za genetičke analize“ Hrvatskog prirodoslovnog muzeja.



Slika 7. Karta s označenim lokalitetima na kojima je provedeno skupljanje uzoraka.



Slika 8. Pregled lokaliteta na kojima je vršeno uzorkovanje: a-Bregana; b-Cetina; c-Korana, d-Kupa; e-Kupčina; f-Maja; g- Mrežnica; h-Petrinjska; i-Sava; j-Sutla; k-Una. Autor fotografija: I. Lajtner.

Tablica 2. Popis populacija i uzoraka vrste *H. holandrii* koji su korišteni u istraživanju.

Broj	Vodotok	Lokalitet	GPS koordinate		Oznaka uzorka
1	Bregana	Grdanjci	5077313,35	432249,7	HGRD-2
					HGRD-3
					HGRD-4
					HGRD-5
2	Cetina	Radmanove Mlinice	4810748,95	521204,5	HCET-1
					HCET-2
					HCET-3
					HCET-4
3	Korana	Vukmanički Cerovac	5030251,175	430455,35	HKOR-1
					HKOR-2
					HKOR-3
4	Kupa	Ozalj	5053250,45	420424,85	HKUP-1
					HKUP-2
					HKUP-3
5	Kupčina	Svrževo	5060864,4	422618,725	HKPC-1
					HKPC-2
					HKPC-3
					HKPC-4
					HKPC-5
					HKPC-6
6	Maja	Dolnjaki	5017448,7	470970,85	HDOL-1
					HDOL-2
					HDOL-3
					HDOL-4
					HDOL-5
7	Mrežnica	Generalski Stol	5023652,8	414430,45	HMRE-1
					HMRE-2
					HMRE-3
					HMRE-4
					HMRE-5
8	Petrinjšica	Prnjavor Čuntićki	5023160,95	483667,9	HPET-2
					HPET-3
					HPET-4
					HPET-5
9	Sava	Ključ Brodovečki	5080774,15	436631,25	HSAV-1
					HSAV-2
					HSAV-3
					HSAV-4
					HSAV-5
10	Sutla	Zelenjak	5102478,4	439254,1	HZEL-1
					HZEL-2
					HZEL-3
					HZEL-4
					HZEL-5
11	Una	Kozibrod	5001741,85	497615,9	HKOZ-1
					HKOZ-2
					HKOZ-3
					HKOZ-4
					HKOZ-5

3.1.2. Kemikalije korištene u molekularnim analizama

- Taq DNA polimeraza (Promega)
- 1 X GoTaq pufer (Promega)
- dNTP mixture (10mM) (Biobasic)
- agaroz: SeaKem LE agarose (Biozym)
- etidijev bromid (EtBr) (Amersham)
- TBE pufer za (0.089M Tris-HCl, 0.098 borna kiselina, 2 mM EDTA, pH 8.4)
- DNA standard za duljinu odsječaka DNA: SimplyLoad®100 bp DNA Ladder (Lonza)

3.1.3. Kitovi za izolaciju dna

- EZ-10 Spin Column Genomic DNA Minipreps Kit (BioBasic)
- One-Tube Tissue DNA Extraction Kit (BioBasic)
- GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich)
- QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)

3.1.4. Oligonukleotidne početnice

Za uspješno umnažanje određenog odsječaka DNA lančanom reakcijom polimeraze (eng. *Polimerase Chain Reaction*, PCR) potrebno je prethodno odabrati početnice (eng. *primers*) koje se dizajniraju pomoću računalnih programa ili „ručno“ (prema slijedu). Početnice su kratke oligonukleotidne sekvence koje uokviruju odsječak DNA kojeg želimo umnožiti. Komplementarne su točno određenom slijedu nukleotida u DNA i označavaju mjesto na kojem će DNA polimeraza započeti sintezu novog lanca. Uspješno dizajnirane početnice duljine su između 18 do 24 pb, sadržavaju oko 45 - 55 % G i C nukleotida te započinju i završavaju G ili C nukleotidom kako bi se osiguralo snažnije sparivanje početnica i DNA kalupa. Prilikom njihove izrade potrebno je izbjeći ponavljanja purinskih i pirimidinskih slijedova nukleotida te komplementarne sekvence dulje od 3 pb unutar samih početnica i između para početnica. Temperatura sparivanja (T_a , eng. *annealing temperature*) treba iznositi između 50 - 65 °C i biti manja za 5 °C od temperature taljenja (T_m , eng. *melting temperature*) (Hećimović, 2007).

Univerzalne početnice LCO-1490 i HCO-2198 korištene u PCR reakciji za umnažanje mitohondrijskog gena COI preuzete su iz literature (Folmer i sur., 1994), a za 16S rRNA korištena je početnica LR-J-12887 (Simon i sur., 1994) te dizajnirana vrsno specifična početnica Hol_16S_fw (Tablica 3).

Tablica 3. Početnice korištene u PCR reakcijama za COI i 16S rRNA.

Gen	Naziv početnice	Sekvenca početnice 5'-3'	Literatura
COI	LCO-1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Folmer i sur., (1994)
	HCO-2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	Folmer i sur., (1994)
16S	Hol_16S_fw	GTACTTTTTGCATCACGATTTAGC	ovo istraživanje
	LR-J-12887	CCGGTCTGAACTCAGATCACG	Simon i sur., (1994)

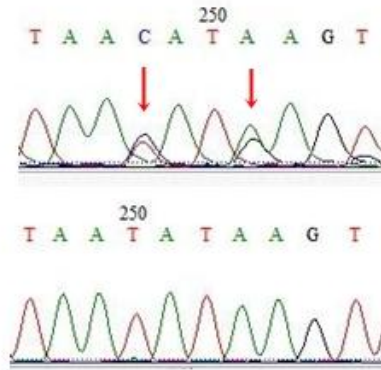
3.2. METODE

3.2.1 Izolacija ukupne genomske i mitohondrijske DNA

Ukupna genomska DNA izolirana je iz tkiva stopala nekoliko jedinki po populaciji korištenjem tri različita kita za izolaciju zbog varijabilne kvalitete rezultata i prisutnosti inhibitora: EZ-10 Spin Column Genomic DNA Minipreps Kit (BioBasic), One-Tube Tissue DNA Extraction Kit (BioBasic) i GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich). Kao najbolji kit za izolaciju ukupne genomske DNA pokazao se EZ-10 Spin Column Genomic DNA Minipreps Kit (BioBasic) stoga je njime izolirana DNA iz većine uzoraka.

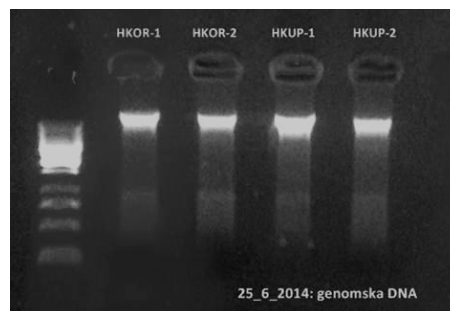
Prilikom umnažanja mitohondrijskih gena iz ukupne genomske DNA postoji opasnost od umnažanja eventualno prisutnih nuklearnih paraloga, a time i pogrešne interpretacije filogenetskih odnosa. Problem se može izbjeći ukoliko se kao kalup za lančanu reakciju polimerazom koristi pročišćena mitohondrijska DNA (Slika 9). U ovom istraživanju mtDNA izolirana je iz 1 jedinke po populaciji kombinacijom diferencijalnog centrifugiranja (Beckman i sur., 1993) i komercijalnog kita. Prilikom diferencijalnog centrifugiranja potrebno je raditi na ledu s otopinama koje su prethodno ohlađene na +4 °C. Prvi korak u izolaciji bila je homogenizacija tkiva u 1 ml otopine za homogenizaciju (25 mM saharoza, 100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7,4). Potom je uslijedilo centrifugiranje pri 1500×g/10min nakon čega se supernatant s mitohondrijima prenio u čistu mikroeprevetu i ponovno centrifugirao pod istim

uvjetima. Nakon centrifugiranja i prenašanja supernatanta, mitohondriji su se istaložili centrifugiranjem pri $13000\times g/20$ min. Završni korak bio je resuspendiranje taloga mitohondrija u puferu za resuspendiranje stanica iz komercijalnog kita QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). U svim izolacijama, ukupna genomska i mitohondrijska DNA eluirane su u 50 μ l pufera i spremljene na -20 °C do daljnje upotrebe.



Slika 9. Prikaz SCF dijagrama dobivenih određivanjem slijeda nukleotida produkata reakcije PCR koji su umnoženi iz istog uzorka (HCET-4). Kao kalup za PCR korištena je ukupna genomska DNA (gore) i pročišćena mtDNA (dolje). Strelice prikazuju dvostruke linije koje su posljedica prisutnosti *numt*-a.

Ukupna genomska DNA izolirana je iz tkiva stopala 51 jedinke puža, a mtDNA izolirana je iz 13 jedinki. Elektroforezom na gelu provjerena je količina i kvaliteta izolirane genomske DNA (Slika 10). U pojedinim uzorcima koncentracija inhibitora PCR reakcije bila je previsoka stoga su za umnažanje putem PCR metode korištene 10x razrijeđene radne otopine izolirane DNA. Većini uzoraka uspješno je izolirana DNA zadovoljavajuće kvalitete i količine.



Slika 10. Agarozni gel nakon elektroforeze izolirane genomske DNA iz jedinki puževa. DNA uzorci pomiješani su s bojom kako bi se lakše pratio tijekom elektroforeze. Korišten je DNA standard SimplyLoad®100 bp za određivanje veličine i kvalitete DNA.

3.2.2. Lančana reakcija polimerazom (eng. Polymerase Chain Reaction)

Molekularno-filogenetski odnosi određeni su na temelju analize fragmenata dva genska biljega, mitohondrijskih gena za 16S rRNA i podjedinicu 1 citokrom C oksidaze (COI). Pri tome su se fragmenti najprije umnožili putem lančane reakcije polimerazom (PCR). PCR predstavlja brzu, specifičnu i osjetljivu metodu umnažanja odabranih sljedova DNA u *in vitro* uvjetima, a odvija se u ciklusima koji uključuju tri osnovna koraka: denaturacija kalupa DNA, specifično vezanje oligonukleotidnih početnica na jednolančane DNA te sinteza komplementarnih lanaca DNA.

Reakcijska smjesa ukupnog volumena 50 μ l sadržavala je 1 X GoTaq pufera, 0.2 mM svakog dNTP, 0.4 μ M obje početnice, 1.25 U *Taq* DNA polimeraze i DNA kalup. Količina DNA kalupa koja je korištena za PCR, nakon razrjeđenja radne otopine 10x, iznosila je otprilike 10 ng. Reakcijska smjesa nadopunjena je destiliranom vodom kako bi ukupni volumen iznosi 50 μ l. Prilikom svake PCR reakcije korištena je negativna kontrola koja nije sadržavala DNA kalup nego vodu, a služila je kao kontrola potencijalne kontaminacije pojedinih kemikalija i pribora.

Prvi korak u PCR reakciji je razdvajanje komplementarnih lanaca DNA denaturacijom pri temperaturi 95 °C. Slijedi sparivanje početnica s kalupom pri temperaturi 50 °C te produljivanje lanaca pri 72 °C koja je optimalna za djelovanje *Taq* polimeraze. Ova tri koraka ponavljaju se ciklički 35 puta što rezultira velikim brojem kopija željenog produkta zbog eksponencijalne prirode reakcije. PCR uvjeti prikazani su u Tablici 4. Posljednji korak je hlađenje uzoraka na temperaturu 4 °C kojim se omogućuje kratkoročno pohranjivanje reakcijske smjese dok se reakcijske epruvete ne izvade iz PCR uređaja.

Tablica 4. Uvjeti PCR reakcije

Korak reakcije	Temperatura/Trajanje
Početna denaturacija	95 °C / 120s
Denaturacija	95 °C / 30s
Sparivanje početnica	50 °C / 30s
Produljivanje lanca DNA	72 °C / 90s
Završno produljivanje lanca DNA	72 °C / 420s
Hlađenje	4 °C / ∞

3.2.3. Elektroforetsko razdvajanje fragmenata DNA

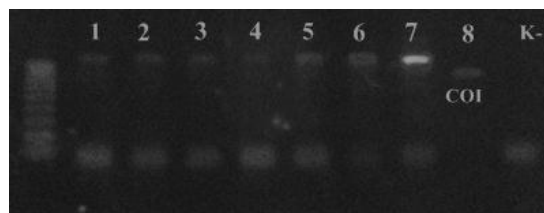
Uspješnost reakcije PCR i veličina dobivenih fragmenata DNA provjeravani su elektroforezom u gelu agaroze. Elektroforeza je metoda koja omogućuje razdvajanje molekula DNA pod utjecajem istosmjernog električnog polja. Negativno nabijene DNA molekule kreću se od negativne katode prema pozitivnoj anodi. Na pokretljivost DNA utječe njena molekularna masa i konformacija, koncentracija agaroze u gelu, jakost i smjer električnog polja, prisutnost interkalirajućih boja te sastav pufera za elektroforezu.

Za potrebe ovog rada korišten je 1 %-tni gel agaroze pripremljen otapanjem 1 g agaroze u 100 ml 1xTBE pufera uz dodatak 100 µl etidij bromida koncentracije 0,5 µg/ml. Etidij bromid je boja koja omogućuje vizualizaciju fragmenata DNA pod UV svjetlom. Njegove se molekule interkaliraju u DNA te pod UV svjetlom fluoresciraju narančasto.

Na gel se nanosilo 5 µl pojedinog uzorka. Elektroforeza se provodila u 1X TBE puferu pri 120 V, u trajanju 30 minuta. Veličina DNA fragmenata određivana je pomoću elektroforetskog standarda poznate veličine fragmenata. Nakon elektroforeze gel je vizualiziran na UV transiluminatoru i fotografiran digitalnim fotoaparatom (Slika 11 i 12).



Slika 11. PCR produkti za gen za COI veličine otprilike 700 pb nakon elektroforeze. U prvoj jažici nalazi se DNA standard SimplyLoad®100 bp. U sljedećim jažicama nalaze se PCR produkti. Negativna kontrola K- nalazi se u posljednjoj jažici.



Slika 12. PCR produkti za gen za 16S rRNA veličine otprilike 1100 pb nakon elektroforeze. U prvoj jažici nalazi se DNA standard SimplyLoad®100 bp. U sljedećim jažicama nalaze se PCR produkti. Negativna kontrola K- nalazi se u posljednjoj jažici.

3.2.4. Pročišćavanje i sekvenciranje

PCR produkti poslani su na pročišćavanje i sekvenciranje u komercijalni servis Macrogen Inc. (Amsterdam, Nizozemska). Sekvenciranje se odvijalo upotrebom LCO-1490 i Hol_16S_fw početnica koje su korištene u amplifikaciji gena. Poslana su ukupno 63 PCR produkta - 19 za 16S rRNA i 44 za COI.

3.2.5. Računalne analize nukleotidnih sekvenci

3.2.5.1. Uređivanje i sravnjivanje nukleotidnih sekvenci

Sekvence dobivene eksperimentalnom obradom označene su jedinstvenim oznakama kao i u procesima izolacije i umnažanja. Autentičnost umnoženih i sekvenciranih nukleotidnih sljedova provjerena je korištenjem programa za lokalno sravnjenje BLAST (eng. *Basic Local Alignment Tool*) (Altschul i sur., 1999). BLAST uspoređuje eksperimentalno dobivenu sekvencu sa sekvencama koje su dostupne u bazi NCBI. U filogenetičke analize i prikaz evolucijskih odnosa uključene su i sve homologne sekvence vrste *H. holandrii* dostupne u banci gena (www.ncbi.nlm.nih.gov.), kao i sekvence vrsta *Melanopsis costata*, *Melanopsis praemorsa*, *Melanopsis parreyssii*, *Semisulcospira libertina* i *Fagotia acicularis* koje su korištene kao vanjska grupa, a pripadaju istoj natporodici kao i *H. holandrii* (Tablica 5, 6).

Tablica 5. Nukleotidne sekvence vrste *H. holandrii* i vanjskih grupa za gen COI, preuzete iz baze GenBank, korištene u molekularno-filogenetičkim analizama.

Naziv sekvence	Pristupni broj	Literaturni navod
Skadarsko jezero (MONF01)	FJ652189	Falniowski i Smolen, (2009)
Skadarsko jezero (MONF02)	FJ652190	Falniowski i Smolen, (2009)
<i>Melanopsis costata</i>	FJ652186	Falniowski i Smolen, (2009)
<i>Melanopsis parreyssii</i>	FJ652185	Falniowski i Smolen, (2009)
<i>Melanopsis parreyssii</i>	FJ652186	Falniowski i Smolen, (2009)
<i>Fagotia acicularis</i>	FJ652187	Falniowski i Smolen, (2009)
<i>Fagotia acicularis</i>	FJ652186	Falniowski i Smolen, (2009)

Tablica 6. Nukleotidne sekvence vrste *H. holandrii* i vanjskih grupa za gen 16S rRNA, preuzete iz baze GenBank, korištene u molekularno-filogenetičkim analizama.

Naziv sekvence	Pristupni broj	Literaturni navod
HolAlb,Skadarsko jezero	AY010314	Lydeard i sur., (2002)
<i>Melanopsis parreyssii</i>	FJ652186	Falniowski i Smolen, (2009)
<i>Melanopsis praemorsa</i>	AY010315	Lydeard i sur., (2002)
<i>Semisulcospira libertina</i>	NC_023364	Zeng i sur., (2013)

Za pregledavanje i uređivanje eksperimentalno dobivenih sekvenci korišten je program Bioedit 7.2.4. (Hall, 1999). Uređivanje sravnjenih sekvenci korištenih u analizi uključivalo je uklanjanje početnica te loše očitanih početaka i krajeva varijabilnih duljina kako bi u daljnjoj analizi ostale samo filogenetički informativne regije. Razlike u očitanim nukleotidima provjerene su pregledavanjem kromatograma pojedinih sekvenci. Sve pogreške sekvenciranja su ručno ispravljene, a prisutne su u obliku pogrešno očitano signal, preklapanja signala dviju baza ili izostavljanja neke od baza. Sekvence loše kvalitete ili nedovoljne duljine izostavljene su iz daljnje filogenetičke analize.

Nukleotidni slijedovi međusobno su sravnjeni u programu Bioedit 7.2.4 pomoću ClustalW višestrukog sravnjivanja (Larkin i sur., 2007). Sravnjenja su napravljena zasebno za grupu sekvenci za gen COI i 16S rRNA te za združeni set podataka koji obuhvaća konkatenirane sekvence dva različita mitohondrijska gena dobivena iz istih jedinki (COI+16S rRNA). Nakon višestrukog sravnjenja i uređivanja svih sekvenci utvrđeni su haplotipovi za sva tri seta podataka. Haplotip predstavlja skupinu sekvenci s identičnim nukleotidnim slijedom. Za filogenetičke analize, ovisno o genskom bilježu, pripremljena su tri seta podataka: 16S rRNA, COI te 16S rRNA+COI.

Nakon pregleda dobivenih nukleotidnih sekvenci, u daljnjim analizama korišteno je ukupno njih 12 za 16S rRNA i 44 za COI (Tablica 7 i 8). Ostale nukleotidne sekvence nisu korištene zbog loše kvalitete ili prekratke duljine.

Nakon višestrukog sravnjenja sekvence iz sva tri seta podataka (COI, 16S rRNA i COI+16S rRNA) kolabirane su u jedinstvene haplotipove korištenjem opcije „*DNA to haplotype collapser and converter*“ online servisa FaBox v.1.41 (Villesen, 2007). Svaki haplotip karakterizira jedinstveni nukleotidni slijed te između sekvenci unutar istog haplotipa ne postoji nikakva genetska udaljenost. U daljnjim molekularno-filogenetičkim analizama korišteni su samo karakteristični haplotipovi kojima su dati nazivi za lakši prikaz na filogenetskim stablima i mrežama.

Tablica 7. Eksperimentalno dobivene nukleotidne sekvence za gen COI korištene u molekularno-filogenetičkim analizama. Sekvence za koje je kao PCR kalup korištena i genomski i pročišćena mtDNA označene su oznakom „*“.

Broj	Vodotok	Naziv sekvence
1	Bregana	HGRD-3
2	Bregana	HGRD-4*
3	Bregana	HGRD-5
4	Cetina	HCET-2
5	Cetina	HCET-3
6	Cetina	HCET-4*
7	Korana	HKOR-1*
8	Korana	HKOR-2*
9	Korana	HKOR-3
10	Kupa	HKUP-1*
11	Kupa	HKUP-2*
12	Kupa	HKUP-3
13	Kupčina	HKPC-4
14	Kupčina	HKPC-5
15	Kupčina	HKPC-6
16	Maja	HDOL-3*
17	Maja	HDOL-4
18	Maja	HDOL-5
19	Mrežnica	HMRE-1
20	Mrežnica	HMRE-4
21	Mrežnica	HMRE-5
22	Petrinjčica	HPET-3*
23	Petrinjčica	HPET-4
24	Petrinjčica	HPET-5
25	Sava	HSAV-3
26	Sava	HSAV-4*
27	Sava	HSAV-5
28	Sutla	HZEL-3*
29	Sutla	HZEL-4
30	Sutla	HZEL-5
31	Una	HKOZ-1
32	Una	HKOZ-3
33	Una	HKOZ-5

Tablica 8. Eksperimentalno dobivene nukleotidne sekvence za gen 16S rRNA korištene u molekularno-filogenetičkim analizama.

Broj	Vodotok	Naziv sekvence
1	Bregana	HGRD-3
2	Cetina	HCET-1
3	Korana	HKOR-2
4	Kupa	HKUP-1
5	Kupčina	HKPC-5
6	Maja	HDOL-3
7	Mrežnica	HMRE-4
8	Petrinjčica	HPET-3
9	Sava	HSAV-3
10	Sutla	HZEL-3
11	Una	HKOZ-3
12	Una	HKOZ-5

3.2.5.2 Filogenetičke i filogeografske analize sekvenci

Filogenetičke analize provedene su na sva tri seta podataka sljedećim statističkim metodama: metoda Bayesian-ovog zaključivanja (BA, eng. *Bayesian analysis*), najveće štedljivosti (MP, eng. *maximum parsimony*), analiza najveće vjerojatnosti (ML, eng. *maximum likelihood*) te susjednog sparivanja (NJ, eng. *neighbour joining*). Programi korišteni za analize srađenih sekvenci i rekonstrukciju filogenetskih stabala su MEGA6 (Tamura i sur., 2013) za NJ, ML i MP analize te MrBayes (Ronquist i Huelsenbeck, 2003) za BA analizu.

Rekonstrukciji filogenetskog stabla prethodi odabir optimalnog evolucijskog modela za svaki genski biljeg. Evolucijski ili nukleotidni supstitucijski modeli pretpostavljaju kojim je načinom došlo do nukleotidnih promjena u sekvencama tijekom evolucijske prošlosti. Primjena različitih evolucijskih modela rezultira različitim rezultatima filogenetičkih analiza. Statistička testiranja odabiru model koji najbolje pristaje uz analizirane podatke, a mogu se podijeliti u dvije skupine: hijerarhijski test udjela vjerojatnosti (hLRT, eng. *hierarchical likelihood ratio test*) te informacijski kriterij (IC, eng. *information criteria*). U ovom radu najpovoljniji evolucijski model za sva tri seta podataka odabran je u programu jModelTest 2.1.5. (Darriba i sur., 2012) prema Bayesian informacijskom kriteriju (BIC, eng. *Bayesian information criterion*) (Tablica 7). Odabrani modeli korišteni su u ML i BA analizi, prilikom izračuna nekorigiranih i korigiranih udvojenih distanci te u procjeni vremena divergencije.

Tablica 9. Evolucijski modeli za COI, 16S rRNA i COI+16S rRNA. HKY (Hasegawa-Kishino-Yano) i TPM3 (Tamura 3 - parameter) uz predloženu G (gama distribucija učestalosti varijacija među ostacima).

Set podataka	Evolucijski model	Literaturni navod
COI	HKY+G	Hasegawa i sur., (1985)
16S rRNA	TPM3+G	Tamura (1992)
COI+16S	TPM3+G	Tamura (1992)

Unutarvrnsne nekorrigirane udvojene (PD, eng. *p-distance, uncorrected pairwise distance*) i korigirane (K2P, eng. *corrected distances, Kimura two-parameter distance*) genetske udaljenosti izračunate su za svaki set podataka u programu MEGA6. Udvojene distance prikazuju genetske udaljenosti između populacija i predstavljaju udio nukleotidnih mjesta na kojima se uspoređivane sekvence razlikuju. Računaju se dijeljenjem broja razlika s ukupnim brojem nukleotida u uspoređivanim sekvencama (Nei i Kumar, 2000). Također, uz pomoć programa MEGA6, određene su vrijednosti sačuvanih mjesta (C; eng. *conserved sites*), varijabilnih mjesta (V, eng. *variable sites*) te parsimonijski informativnih mjesta (Pi, *parsimony informative sites*) za svaki set podataka.

U provedenim filogenetičkim analizama kao podrška grananja unutar stabla korištena je metoda *bootstrap*. Podrška za grananja unutar filogenetskih stabala određena je na temelju 1000 *bootstrap* ponavljanja za MP i ML analizu te na 5000 *bootstrap* ponavljanja za NJ analizu. Kao podrška u BA analizi korištena je metoda *posterior probability*.

Parametri analiza za sva tri seta podataka postavljeni su na isti način. U NJ metodi korištene su udvojene distance, a kao tipovi mutacija u analizu su uključene tranzicije i transverzije. Filogenetsko stablo u MP metodi dobiveno je *Subtree-Pruning-Regrafting* (SPR) algoritmom pri čemu je razina pretrage iznosila jedan, a inicijalno drvo dobiveno nasumičnim dodavanjem sekvenci u 10 replika. U analizi statističkom metodom ML za sva tri seta podataka korišteni su prethodno navedeni supstitucijski modeli, a heuristička metoda odabira stabala je *Nearest-Neighbor-Interchange* (NNI). U BA metodi prvih 20 % stabala isključeno je iz analiza kao *burn in*. Frekvencija baza, učestalost supstitucije, *gamma shape parameter* te udio nepromjenjivih mjesta, podešeni su prema vrijednostima dobivenim jModelTest-om.

U tradicionalnim filogenetskim metodama evolucijski odnosi između taksona prikazuju se pomoću filogenetskog stabla, međutim za prikazivanje intraspecifičnih evolucijskih odnosa često je prikladniji i točniji prikaz u obliku filogenetskih mreža (Posada i

Crandall, 2001). U ovom istraživanju filogenetske mreže konstruirane su metodom statističke parsimonije (eng. *statistical parsimony*) (Templeton i sur., 1992) u programu TCS1.21 (Clement i sur., 2000) i u Network v.4.613 programu korištenjem *median-joining* (MJ) metode (Bandelt i sur., 1999).

Vrijeme divergencije određeno je korištenjem programskog paketa BEAST v1.7.4 (Drummond i sur., 2012) na temelju Bayesian evolucijske analize. Procjena vremena divergencije rađena je za COI set podataka s obzirom da za taj gen u Gastropoda postoje objavljene substitucijske rate (molekularni sat) s intervalima 95 % pouzdanosti pod različitim evolucijskim modelima (Wilke i sur. 2009). Najpovoljniji evolucijski model HKY+G određen je u programu jModeltest prema BIC kriteriju. Međutim, za taj model ne postoji kalibracija stoga je korišten sljedeći optimalan model HKY (Hasegawa-Kishino-Yano). Hipoteza molekularnog sata testirana je metodom najveće vjerojatnosti u programu MEGA6. S obzirom da je hipoteza molekularnog sata bila odbačena, korišten je model nekoreliranog relaksiranog molekularnog sata (*Lognormal uncorrelated relaxed clock*). Primjenjena je prosječna substitucijska rata od 0,0132 mutacije/mjestu/milijun godina uz standardnu devijaciju od 0,0022, HKY substitucijski model, te *coalescent constant size tree prior*. Analiza je provedena tijekom 10 milijuna generacija s uzorkovanjem svakih 1000 generacija, a prvih 1000 (10 %) uzorkovanih stabala izbačeno je iz analize (*burn-in*). Pouzdanost analize provjerena je u programu Tracer v.1.5 (Rambaut i Drummond, 2009). Programom TreeAnnotator v1.7.2 (Drummond i sur., 2012) generirano je konsenzus filogenetsko stablo s izračunatim vremenima divergencije.

Nakon provedenih analiza, dobivena filogenetska stabla su vizualizirana i uređivana računalnim programom FigTree 1.4.2. (Rambaut, 2012) te međusobno uspoređena.

4. REZULTATI

4.1. SRAVNJIVANJE NUKLEOTIDNIH SEKVENCI

Ukupne duljine sravnjenih nukleotidnih sljedova iznosile su: 631 nukleotid za COI, 917 nukleotida za 16S rRNA i 1548 nukleotida za konkatenirani set COI+16S rRNA. Vrijednosti sačuvanih, varijabilnih te parsimonijski informativnih mjesta za svaki set podataka navedene su u Tablici 10.

Tablica 10. Broj analiziranih nukleotida za svaki set podataka (COI, 16S rRNA, COI+16S rRNA) s pripadajućim vrijednostima sačuvanih mjesta (C, eng. *conserved sites*), varijabilnih mjesta (V, eng. *variable sites*) te parsimonijski informativnih mjesta (Pi, eng. *parsimony informative sites*).

Genski biljeg	Broj analiziranih nukleotida	C	V	Pi
COI	631	590	41	32
16S rRNA	917	884	24	12
COI+16S rRNA	1548	1485	54	33

Utvrđeno je ukupno devet različitih haplotipova gena 16S rRNA te 17 haplotipova gena COI, dok su konkatenirani COI+16S rRNA sljedovi rezultirali s 11 različitih haplotipova. (Tablica 11, 12 i 13). Geografska rasprostranjenost i učestalost pojedinih haplotipova za gen COI prikazana je filogenetskom mrežom izrađenom u programu TCS.

Tablica 11. Haplotipovi gena za COI

Broj	Oznaka haplotipa	Sekvence
1	A1	HKUP-2 HKPC-6 HKPC-4 HKPC-5 HKOZ-5
2	A2	HKUP-1
3	A3	HKUP-3
4	A4	HKOR-1 HKOR-2 HKOR-3 HMRE-5 HKOZ-3
5	A5	HMRE-4 HMRE-1
6	A6	HKOZ-1
7	A7	MONF01
8	A8	MONF02
9	B1	HZEL-5 HGRD-5 HGRD-4 HGRD-3 HSAV-5
10	B2	HZEL-3 HZEL-4
11	B3	HPET-3 HPET-4 HPET-5
12	B4	HDOL-3
13	B5	HDOL-4 HDOL-5
14	B6	HSAV-3
15	B7	HSAV-4
16	C1	HCET-3 HCET-2
17	C2	HCET-4

Tablica 12. Haplotipovi gena za 16S rRNA

Broj	Oznaka haplotipa	Sekvence
1	a1	HKOZ-5 HKPC-5 HMRE-4
2	a2	HKUP-1
3	a3	HKOZ-3
4	a4	HKOR-4
5	b1	HGRD-3 HSAV-3
6	b2	HZEL-3
7	b3	HPET-3
8	b4	HDOL-3
9	c1	HCET-1

Tablica 13. Haplotipovi konkateniranih COI i 16S rRNA sekvenci

Broj	Oznaka haplotipa	Sekvence
1	A1a1	HKPC-5 HKOZ-5
2	A2a2	HKUP-1
3	A4a3	HKOZ-3
4	A4a4	HKOR-2
5	A5a1	HMRE-4
6	B1b1	HGRD-3
7	B2b2	HZEL-3
8	B3b3	HPET-3
9	B4b4	HDOL-3
10	B7b1	HSAV-3
11	C1c1	HCET-3

4.2. FILOGENETIČKE I FILOGEOGRAFSKE ANALIZE SEKVENCI

Analizom dobivenih filogenetskih stabala i mreža uočeno je da se haplotipovi analiziranih sekvenci grupiraju u tri grupe kod gena za COI i u četiri grupe kod gena za 16S rRNA. Grupama haplotipova proizvoljno su dodijeljena imena A, B, C i D.

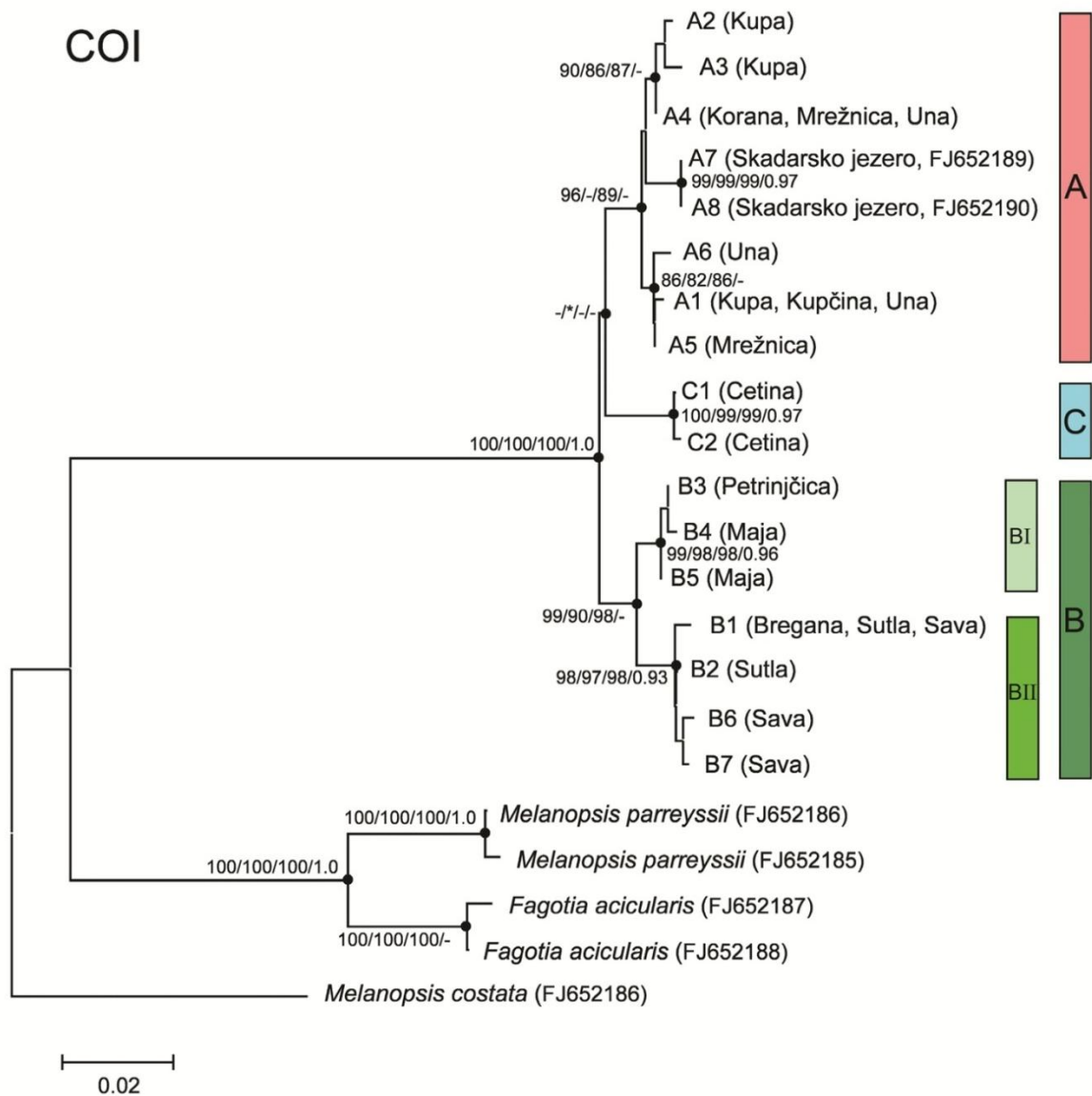
4.2.1. Analiza gena za COI

Za izradu filogenetskih stabala temeljenih na genu za COI korišteni su eksperimentalno dobiveni haplotipovi i sekvence preuzete iz banke gena. U analizu su uključene i sekvence vrsta *Melanopsis costata*, *M. praemorsa*, *M. parreyssii* i *Fagotia acicularis* koje su korištene za ukorjenjivanje stabla.

Sve četiri metode (NJ, MP, ML i BA) rekonstrukcije evolucijskih odnosa na temelju molekularnog biljega COI rezultirale su filogenetskim stablima sa sličnom topologijom, podržanošću i duljinom grana. U rezultatima je prikazano stablo konstruirano NJ metodom koje prikazuje vrijednosti *bootstrap* podrške veće od 70 % za NJ, MP, ML metodu i vrijednost *posterior probability* podrške veće od 90 % za BA metodu (Slika 13).

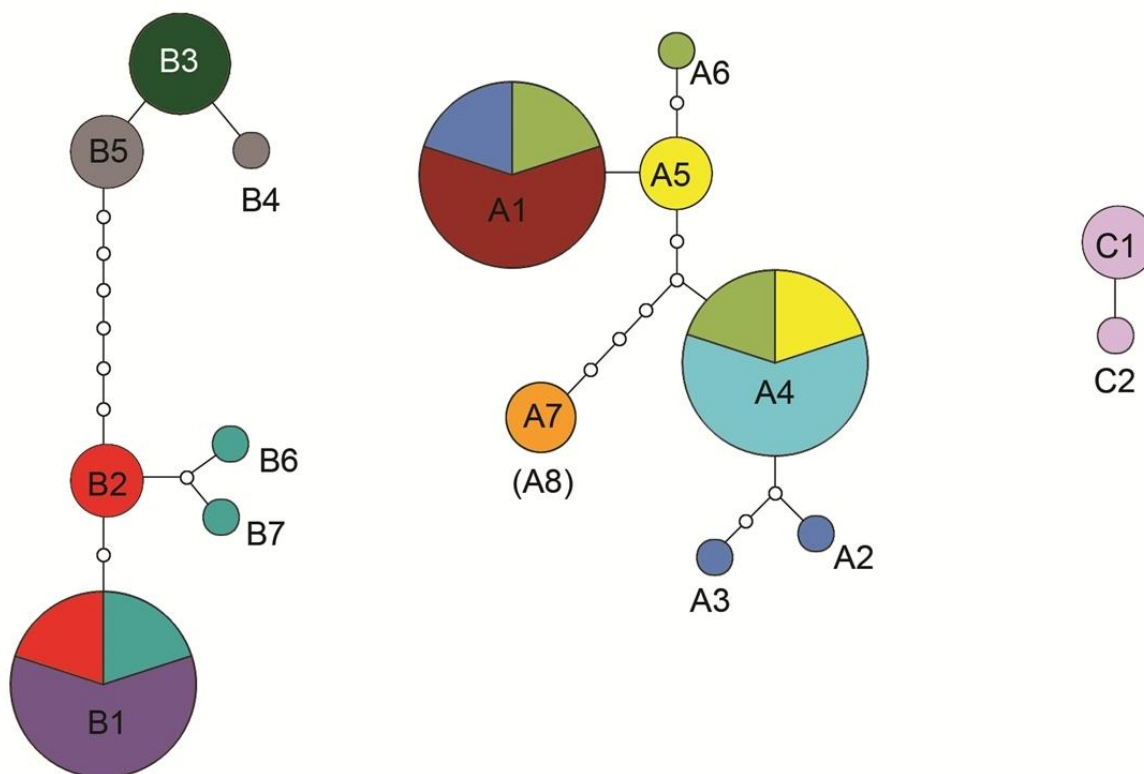
Topologiju stabala karakterizira postojanje tri, uglavnom dobro podržane, grupe unutar vrste *H. holandrii*: grupa A koja obuhvaća uzorke iz Kupe, Kupčine, Korane, Mrežnice i Une, grupa B koja obuhvaća uzorke iz Maje, Petrinjčice, Bregane, Sutle i Save te grupa C koja obuhvaća uzorke iz rijeke Cetine. B grupa nije podržana samo u BA, a grupa A u MP i BA analizi. Filogenetski odnosi između tri glavne grupe nisu se uspjeli razriješiti niti jednom korištenom filogenetskom metodom pa se mogu opisati kao nerazriješena trihotomija. Unutar filogenetske grupe B, s visokom podržanošću, jasno se odvajaju dvije evolucijski odijeljene podgrupe BI (Maja, Petrinjčica) i BII (Bregana, Sutla, Sava). Sekvence uzoraka *H. holandrii* iz Skadarskog jezera preuzete iz banke gena predstavljaju u svim metodama i na svim stablima visoko podržanu odijeljenu podgrupu unutar grupe A. Filogenetski odnosi unutar grupe A nisu razriješeni, tj. odvajanje podgrupa je jako slabo podržano. S izuzetkom podgrupe iz Skadarskog jezera, haplotipovi unutar grupe A nisu geografski korelirani - haplotipovi s istih lokaliteta pojavljuju se unutar različitih podgrupa.

Filogenetska mreža konstruirana je metodom statističke parsimonije s graničnom vrijednosti vjerojatnosti od 95 % na uzorku istraživanih haplotipova i sekvenci vrste *H. holandrii* iz Skadarskog jezera koje su preuzete iz banke gena. Na TCS filogenetskoj mreži jasno se može vidjeti postojanje tri zasebne skupine haplotipova koje odgovaraju grupama A, B i C (Slika 14). Jedna skupina povezuje jedinke iz BI i BII podgrupe koje su međusobno odijeljene sa sedam mutacijskih koraka. Druga skupina povezuje haplotipove grupe A i u njoj je izraženo izdvajanje haplotipa iz Skadarskog jezera s pet mutacijskih koraka. Haplotipovi iz rijeke Cetine jasno se izdvajaju kao zasebna treća skupina. Geografska rasprostranjenost i učestalost haplotiva prikazana je na Slici 15. Isti rezultati dobiveni su korištenjem MJ metode koja rezultira povezivanjem svih haplotipova u jedinstvenu mrežu unutar koje se može izdvojiti postojanje tri odvojene skupine koje odgovaraju trima evolucijski odijeljenim grupama A, B i C (Slika16).

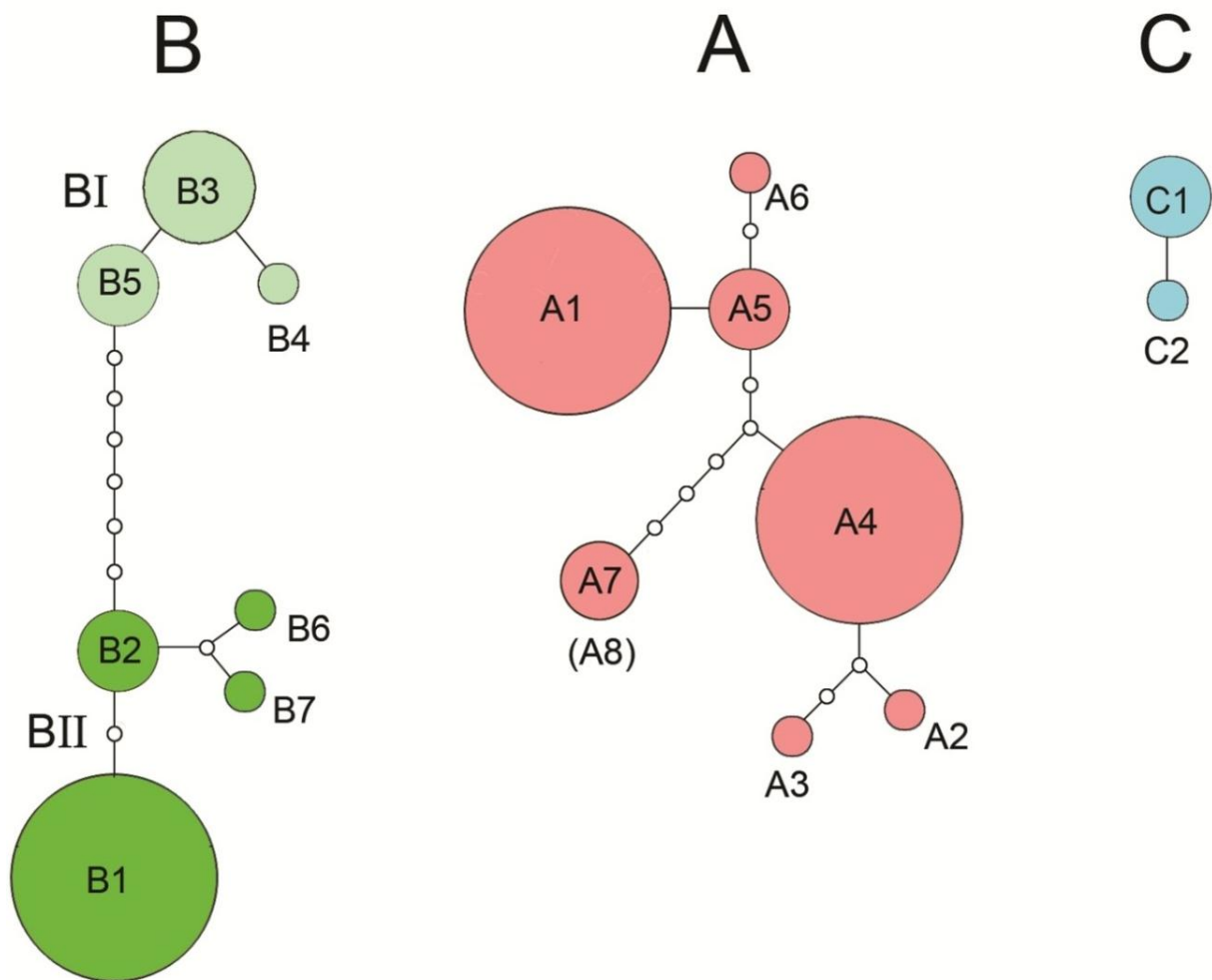


Slika 13. NJ filogenetsko stablo dobiveno analizom gena COI. Na granama su redom označene: *bootstrap* vrijednosti za NJ, MP, ML metodu te vrijednosti *posterior probability* podrške BA metode. Pri tome „*“ označava da grananje ne postoji u određenoj metodi, a „-“ da grananje nije podržano u određenoj metodi. Duljina grana sukladna je broju supstitucijskih promjena (mjerna crta označava 0,02 supstitucije).

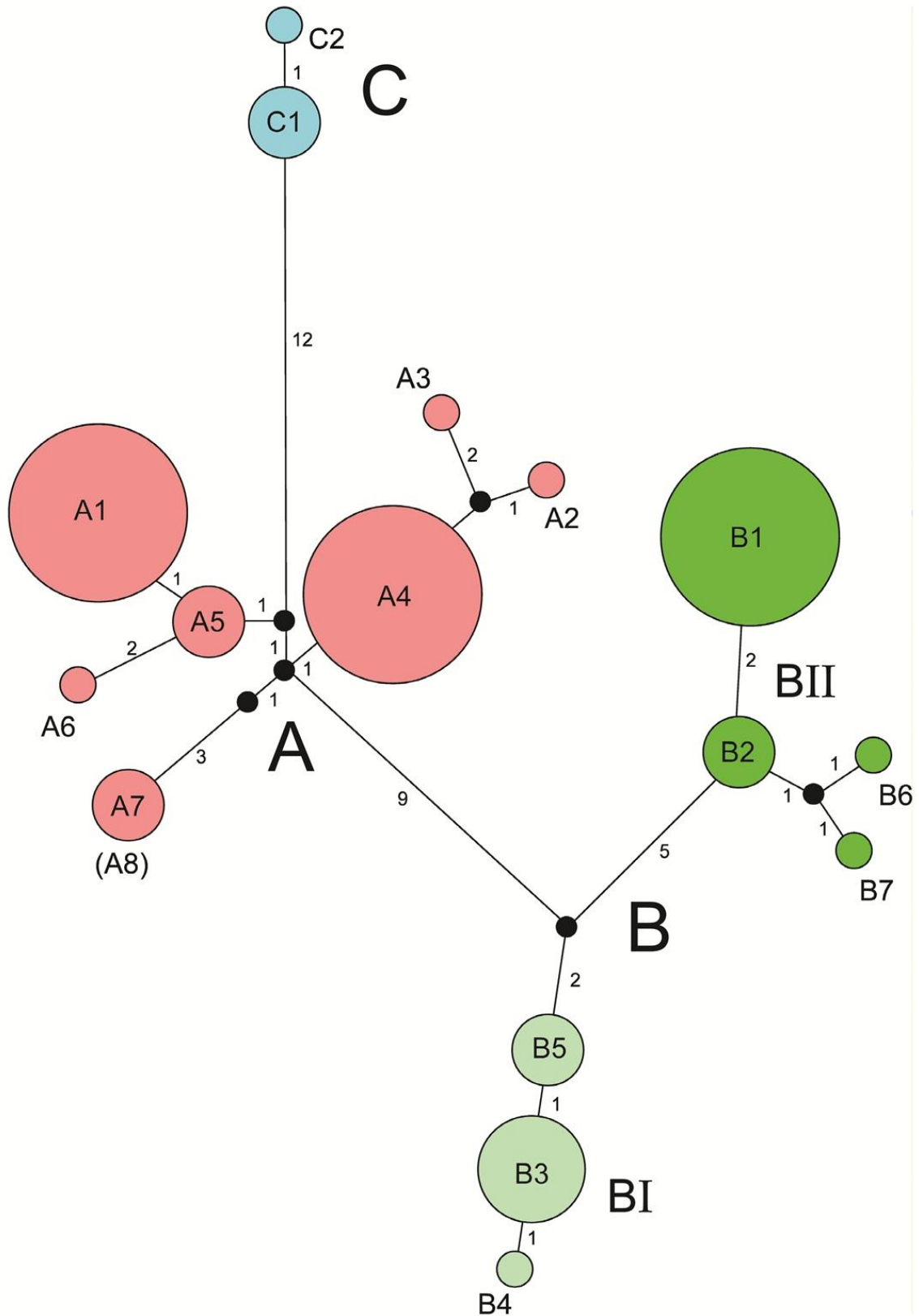
- Kupčina, Svrževo
- Kupa, Ozalj
- Una, Kozibrod
- Mrežnica, Generalski Stol
- Korana, Vukmanički Cerovac
- Skadarsko jezero, Donji Murići
- Cetina, Radmanove mlinice
- Petrinjčica, Prnjavor Čuntićki
- Maja, Dolnjaki
- Sutla, Zelenjak
- Bregana, Grdanjci
- Sava, Ključ Brdovečki



Slika 14. Filogenetska mreža konstruirana metodom statističke parsimonije (TCS mreža) prikazuje geografsku rasprostranjenost i učestalost pojedinih haplotipova gena za COI.



Slika 15. Filogenetska mreža dobivena metodom statističke parsimonije (TCS mreža) na temelju haplotipova gena za COI. Veličina ovala odgovara učestalosti haplotipa, bijele točke predstavljaju haplotipove koji nedostaju (neuzorkovane ili izumrle haplotipove), a crtice označavaju broj mutacijskih koraka.



Slika 16. Filogenetska mreža dobivena metodom MJ na temelju haplotipova gena za COI. Veličina ovala odgovara učestalosti haplotipa, crne točke predstavljaju ancestralne čvorove koji nisu prisutni u uzorku (eng. *median vectors*), a brojevima označavaju broj mutiranih pozicija u sekvencama.

Iz dobivenih vrijednosti nekorigiranih udvojenih (PD) i korigiranih (K2P) genetskih udaljenosti izračunat je njihov raspon unutar i između pojedinih grupa te podgrupa koje su se na filogenetskom stablu odvojile kao zasebne skupine (Tablica 14). Vrijednosti PD i K2P gotovo su jednake. Raspon unutargrupne vrijednosti PD i K2P prema genu za COI iznosi 0,0 - 1,8 %, pri čemu je najviša vrijednost genetske udaljenosti zabilježena unutar grupe B (1,8 %). Raspon međugrupnih vrijednosti PD i K2P u genu za COI je od 2,1 - 3,3 %, pri čemu su najviše vrijednosti genetske udaljenosti između grupe A i B (3,3 %) te grupe B i C (3,2 %). Najniža vrijednost genetske udaljenosti od 2,1 % uočena je između grupe A i C.

Na filogenetskom stablu, unutar grupe B, uočeno je visoko podržano razdvajanje podgrupa BI i BII stoga je između njih izračunat raspon vrijednosti PD i K2P genetskih udaljenosti koji iznosi 1,1 - 1,8 % (Tablica 15).

Tablica 14. Prikaz raspona vrijednosti (u postotcima) nekorigiranih (ispod dijagonale) i korigiranih genetskih udaljenosti (iznad dijagonale, osjenčane plavo) unutar i između grupa A, B i C.

	A	B	C
A	0,0 -1,3 0,0-1,3	2,1-3,3	2,1-2,9
B	2,1-3,3	0,2-1,7 0,2-1,7	2,7-3,2
C	2,1-2,9	2,7-3,2	0,2 0,2

Tablica 15. Prikaz raspona vrijednosti (u postotcima) nekorigiranih (ispod dijagonale) i korigiranih genetskih udaljenosti (iznad dijagonale, osjenčane plavo) unutar i između podgrupa BI i BII.

	BI	BII
BI	0,2-0,3 0,2-0,3	1,1-1,8
BII	1,1-1,7	0,3-0,6 0,3-0,6

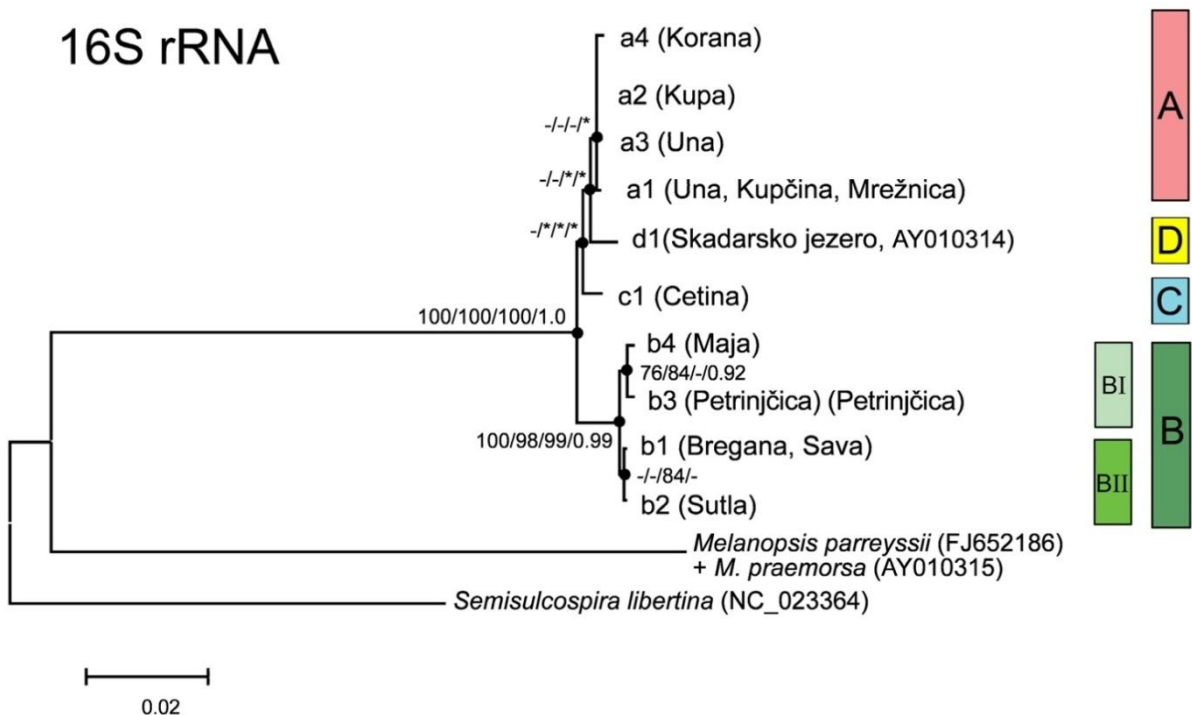
4.2.2. Analiza gena za 16S rRNA

Za izradu filogenetskih stabala koja se temelje na genu za 16S rRNA korišteni su eksperimentalno dobiveni haplotipovi i sekvence preuzete iz banke gena. U analizu su uključene i sekvence vrsta *Melanopsis praemorsa*, *M. parreyssii* i *Semisulcospira libertina* koje su korištene za ukorjenjivanje stabala.

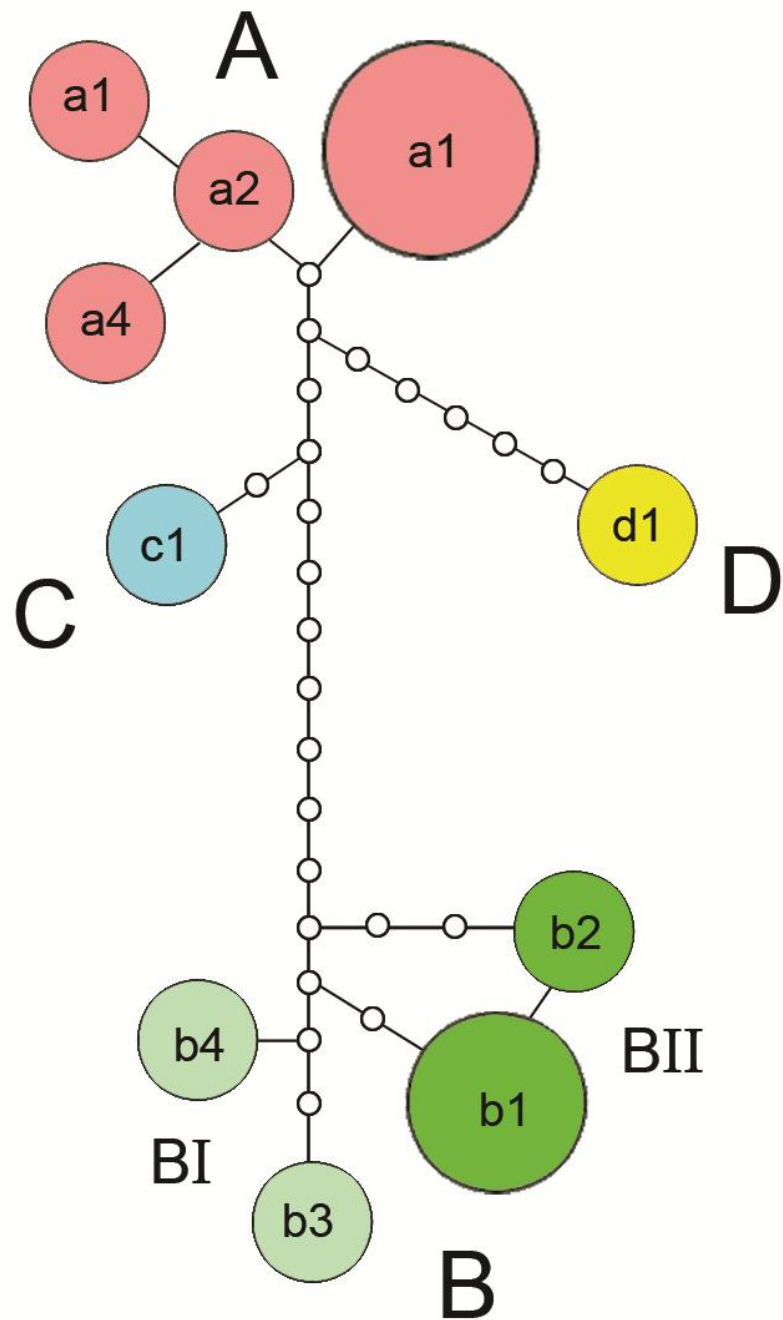
Sve četiri metode (NJ, MP, ML i BA) rekonstrukcije evolucijskih odnosa na temelju molekularnog biljega 16S rRNA rezultirale su filogenetskim stablima sa sličnom topologijom, podržanošću i duljinom grana. U rezultatima je prikazano stablo konstruirano NJ metodom koje prikazuje vrijednosti *bootstrap* podrške veće od 70 % za ML, MP i NJ metodu te vrijednost *posterior probability* podrške veće od 90 % za BA metodu (Slika 17).

Sva filogenetska stabla karakterizira nerazriješena politomija dobro podržane grupe B koja obuhvaća uzorke iz Maje, Petrinjčice, Bregane, Sutle i Save te i svih ostalih haplotipova unutar vrste *H. holandrii* (uzorci iz Kupe, Kupčine, Korane, Mrežnice, Une, Cetine te Skadarskog jezera). Podgrupe unutar grupe B, BI (Maja, Petrinjčica) i BII (Bregana, Sutla, Sava) većinom su nepodržane ili tek slabo podržane. Usporedbom filogenetskih stabala i mreža konstruiranih na temelju gena za 16S rRNA ipak je naznačeno izdvajanje triju zasebnih grupa: grupe A s uzorcima iz Kupe, Kupčine, Korane, Mrežnice i Une, grupe C s uzorkom iz Cetine i grupe D koja predstavlja preuzetu sekvencu vrste *H. holandrii* iz Skadarskog jezera.

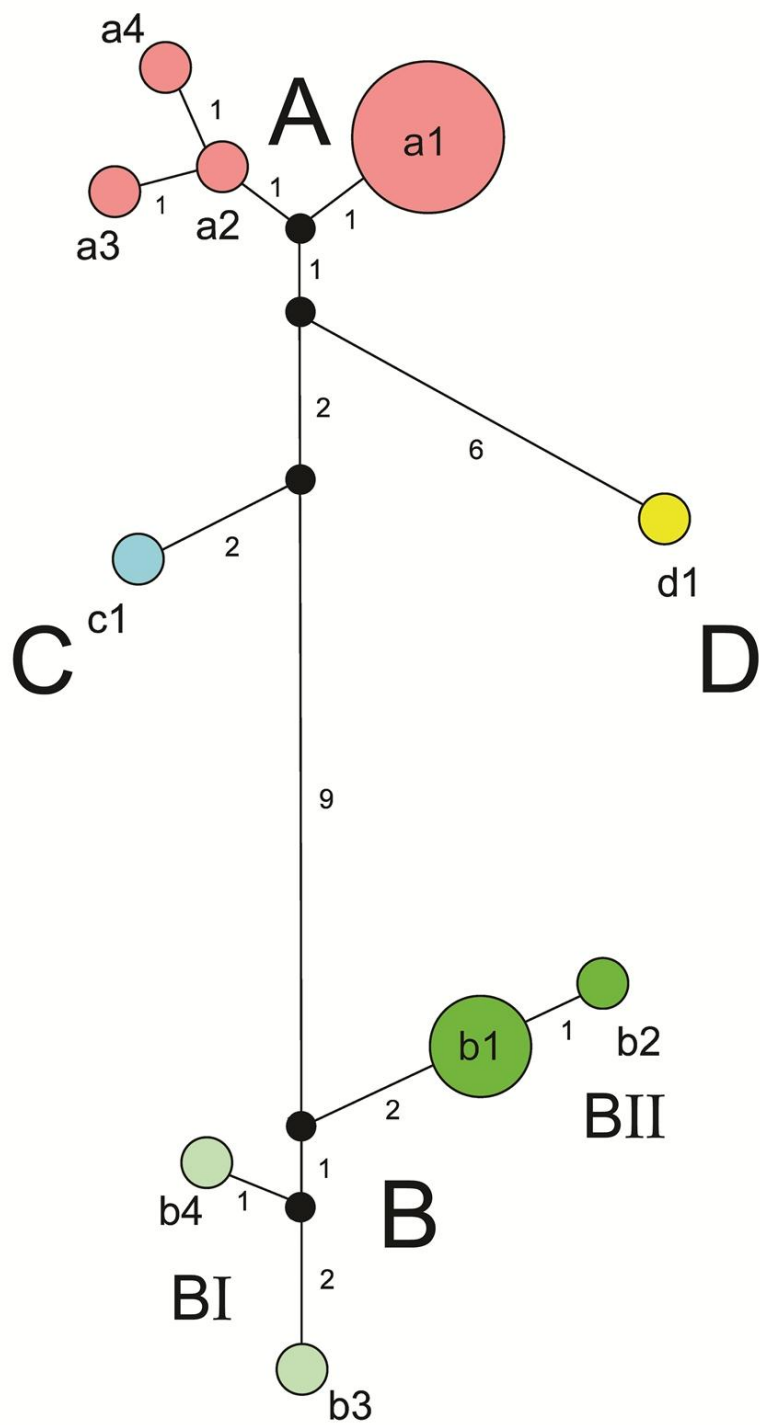
Za razliku od filogenetske mreže za gen COI, analiza gena za 16S rRNA u programu TCS rezultirala je povezivanjem svih haplotipova u jedinstvenu parsimonijsku mrežu unutar koje se može vidjeti postojanje četiri skupine koje odgovaraju grupama A, B, C i D (Slika 18). Analiza gena za 16S rRNA izdvojila je skadarski uzorak kao posebnu liniju koja je od ostalih odvojena za osam mutacijskih koraka. Haplotip iz rijeke Cetine također se odvaja kao zasebna linija. Korištenjem MJ metode konstruirana je jedinstvena mreža unutar koje se može izdvojiti postojanje četiri odvojene skupine koje odgovaraju četirima evolucijski nezavisnim grupama A, B, C i D (Slika 19).



Slika 17. NJ filogenetsko stablo dobiveno analizom gena 16S rRNA. Na granama su redom označene: *bootstrap* vrijednosti za NJ, MP, ML metodu te vrijednosti *posterior probability* podrške BA metode. Pri tome „*“ označava da grananje ne postoji u određenoj metodi, a „-“ da grananje nije podržano u određenoj metodi. Duljina grana sukladna je broju supstitucijskih promjena (mjerna crta označava 0,02 supstitucije).



Slika 18. Filogenetska mreža dobivena metodom statističke parsimonije (TCS mreža) na temelju haplotipova gena za 16S rRNA. Veličina ovala odgovara učestalosti haplotipa, bijele točke predstavljaju haplotipove koji nedostaju, a crtice označavaju broj mutacijskih koraka.



Slika 19. Filogenetska mreža dobivena metodom MJ na temelju haplotipova gena za 16S rRNA. Veličina ovala odgovara učestalosti haplotipova, crne točke predstavljaju ancestralne čvorove koji nisu prisutni u uzorku (eng. *median vectors*), a brojevi označavaju broj mutiranih pozicija u sekvencama.

Iz dobivenih vrijednosti PD i K2P izračunat je njihov raspon unutar i između pojedinih grupa te podgrupa koje su se na filogenetskom stablu odvojile kao zasebne skupine (Tablica 16). Vrijednosti PD i K2P gotovo su jednake. Raspon unutargrupne vrijednosti PD i K2P prema genu za 16S rRNA iznosi 0,0 - 0,3 %, pri čemu je najviša vrijednost genetske udaljenosti zabilježena unutar grupe B (0,3 %). Raspon međugrupnih vrijednosti PD i K2P prema genu za 16S rRNA je od 0,5 - 1,6 %, pri čemu su najviše vrijednosti genetske udaljenosti između grupe B i D (1,6 %) te grupe A i B (1,4 %). Najniža vrijednost genetske udaljenosti od 0,5 % uočena je između grupe A i C.

Na filogenetskom stablu, unutar grupe B, uočeno je visoko podržano razdvajanje podgrupa BI i BII stoga je između njih izračunat raspon vrijednosti PD i K2P genetskih udaljenosti koji iznosi 0,3 - 0,4 % (Tablica 17).

Tablica 16. Prikaz raspona vrijednosti nekorigiranih (ispod dijagonale) i korigiranih genetskih udaljenosti (iznad dijagonale, osjenčane plavo) unutar i između grupa A, B i C.

	A	B	C	D
A	0,1-0,2 0,1-0,2	1,1-1,4	0,5-0,6	0,6-0,7
B	1,1-1,4	0,2-0,3 0,2-0,3	1,1-1,3	1,5-1,6
C	0,5-0,6	1,1-1,2	0	0,8
D	0,6-0,7	1,5-1,6	0,8	0

Tablica 17. Prikaz raspona vrijednosti nekorigiranih (ispod dijagonale) i korigiranih genetskih udaljenosti (iznad dijagonale, osjenčane plavo) unutar i između podgrupa BI i BII.

	BI	BII
BI	0,2 0,2	0,3-0,4
BII	0,3-0,4	0,1

4.2.3. Analiza konkateniranih COI+16S rRNA

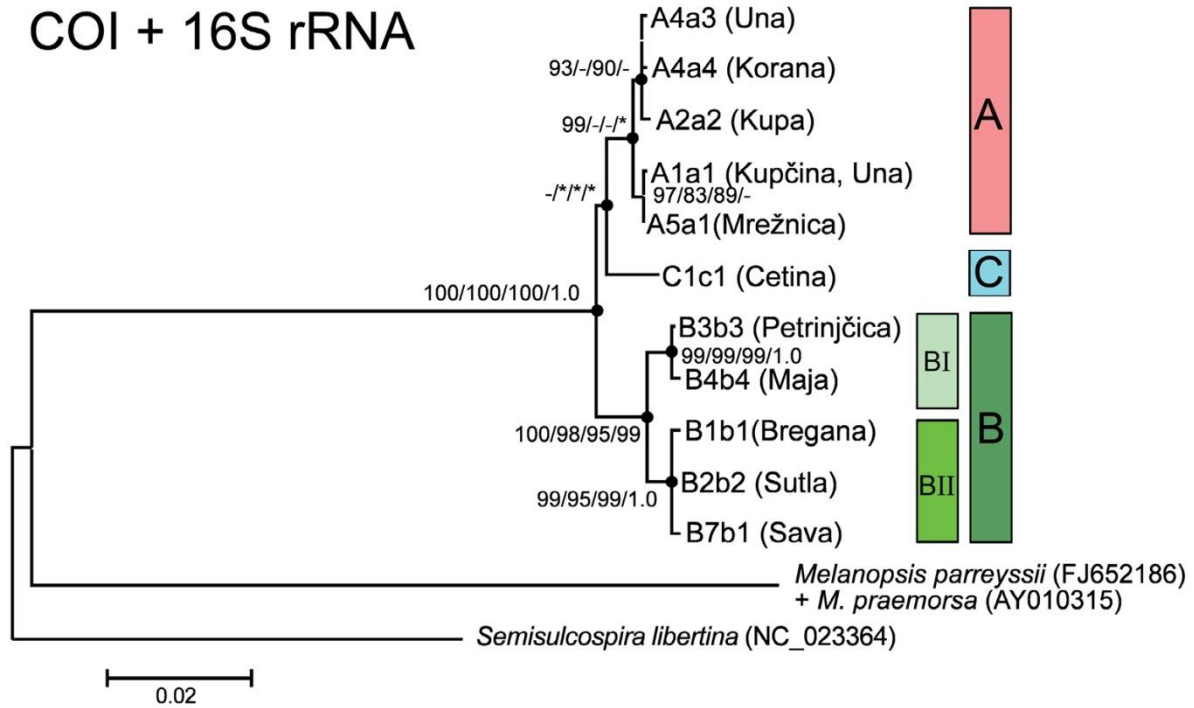
Za izradu filogenetskih stabala, koja se temelje na konkateniranom setu COI+16S rRNA, korišteni su eksperimentalno dobiveni haplotipovi i sekvence preuzete iz banke gena. U analizu su uključene i sekvence vrsta *Melanopsis praemorsa*, *M. parreyssii* i *Semisulcospira libertina* koje su korištene za ukorjenjivanje stabala.

Sve četiri metode (NJ, MP, ML i BA) rekonstrukcije evolucijskih odnosa na temelju spojenih molekularnih biljega COI+16S rRNA rezultirale su filogenetskim stablima sa sličnom topologijom, podržanošću i duljinom grana. U rezultatima je prikazano stablo konstruirano NJ metodom koje prikazuje vrijednosti *bootstrap* podrške veće od 70 % za ML, MP i NJ metodu te vrijednost *posterior probability* podrške veće od 90 % za BA metodu (Slika 20).

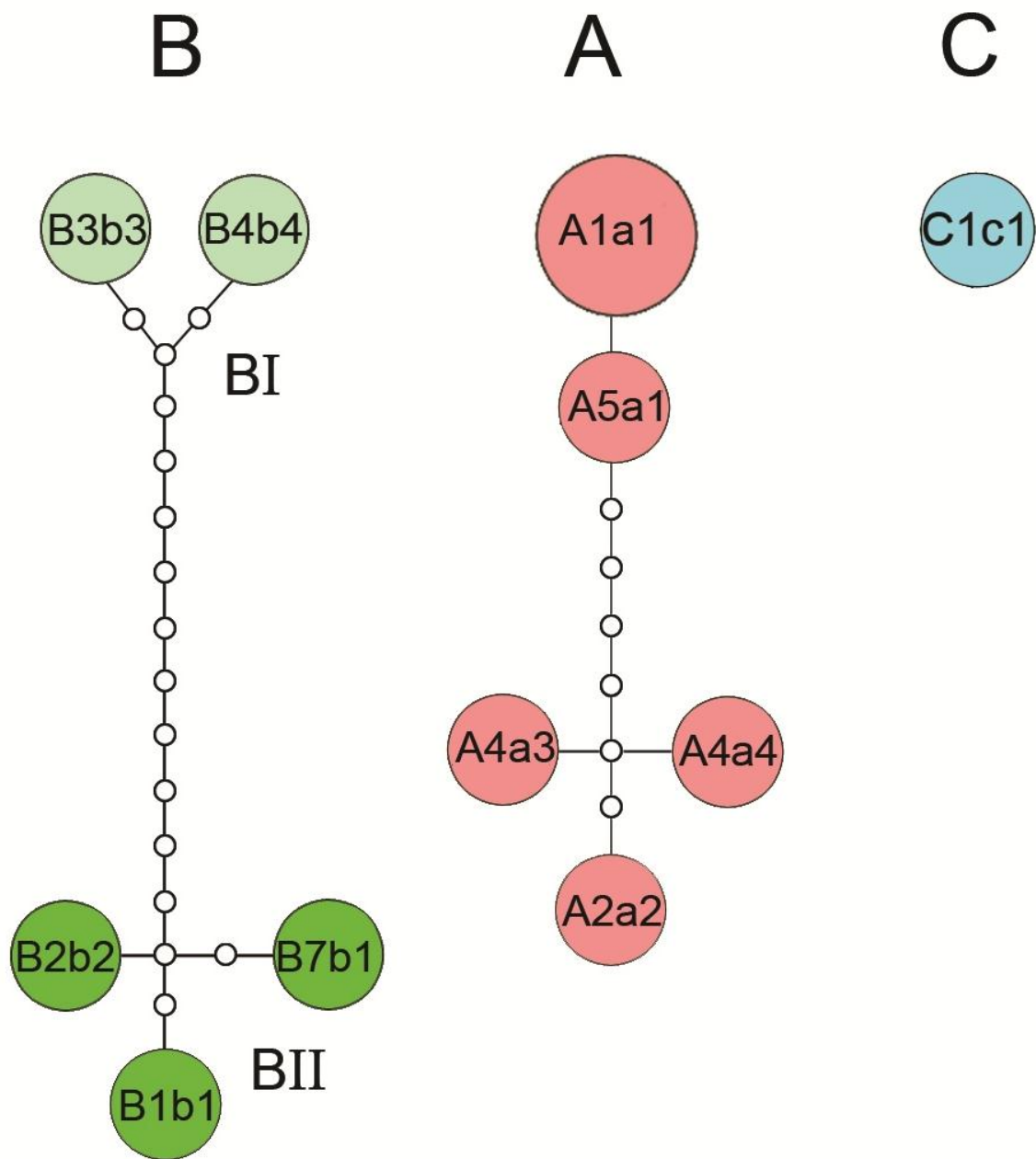
Topologiju svih filogenetskih stabala karakterizira nerazriješena trihotomija grupa A i B te uzorka iz Cetine, s tim da je samo B grupa dobro podržana u svim metodama filogenetske rekonstrukcije. Grupa A podržana je samo u NJ metodi, dok se u stablu konstruiranom BA metodom niti ne pojavljuje kao jedinstvena grupa. S obzirom na slabu podržanost A grupe, rezultat analiza i ovdje je nerazriješena politomija kao što je ranije opisano za 16S rRNA, za razliku od koje se ipak uočava visoko podržano odvajanje grupe B u dvije evolucijski odvojene podgrupe BI (Maja, Petrinjčica) i BII (Bregana, Sutla, Sava).

Na filogenetskoj mreži koja je konstruirana metodom statističke parsimonije može se vidjeti postojanje tri zasebne skupine haplotipova koje odgovaraju grupama A, B i C (Slika 21). Jedna skupina sadrži jedinke iz BI i BII grupe, druga skupina obuhvaća haplotipove grupe A, a uzorak iz Cetine pojavljuje se kao neovisna linija. Isti rezultati dobiveni su korištenjem MJ metode koja je povezala sve haplotipove u jedinstvenu mrežu unutar koje se može izdvojiti postojanje dvije odvojene skupine i haplotipa iz Cetine koje odgovaraju trima evolucijski nezavisnim grupama A, B i C (Slika 22).

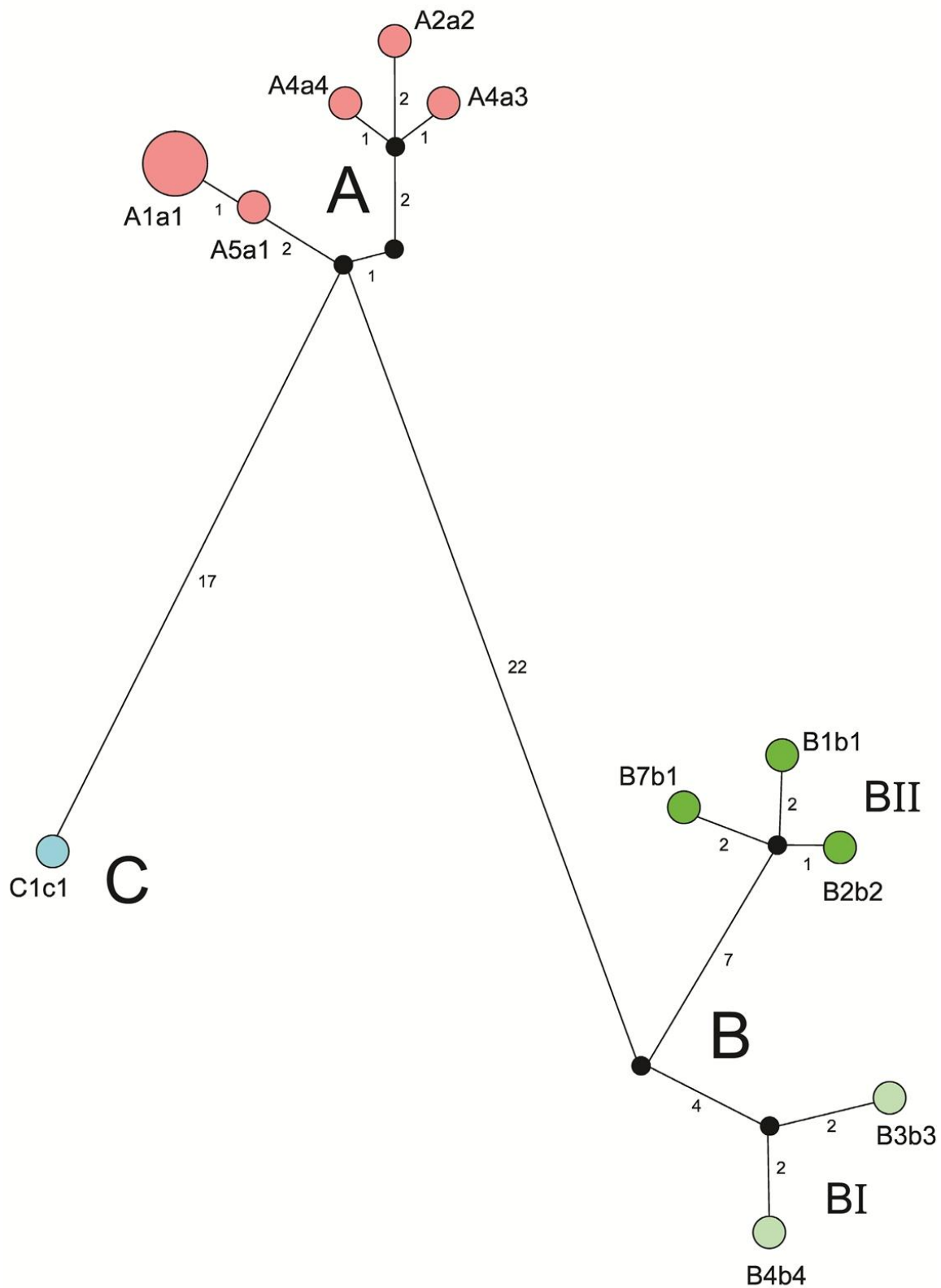
COI + 16S rRNA



Slika 20. NJ filogenetsko stablo dobiveno analizom spojenog seta podataka COI+16S rRNA. Na granama su redom označene: *bootstrap* vrijednosti za NJ, MP, ML metodu te vrijednosti *posterior probability* podrške BA metode. Pri tome „*“ označava da grananje ne postoji u određenoj metodi, a „-“ da grananje nije podržano u određenoj metodi. Duljina grana sukladna je broju supstitucijskih promjena (mjerna crta označava 0,02 supstitucije).



Slika 21. Filogenetska mreža dobivena metodom statističke parsimonije (TCS mreža) na temelju haplotipova spojenog seta podataka COI+16S rRNA. Veličina ovala odgovara učestalosti haplotipova, kružići predstavljaju haplotipove koji nedostaju, a crtice označavaju broj mutacijskih koraka.



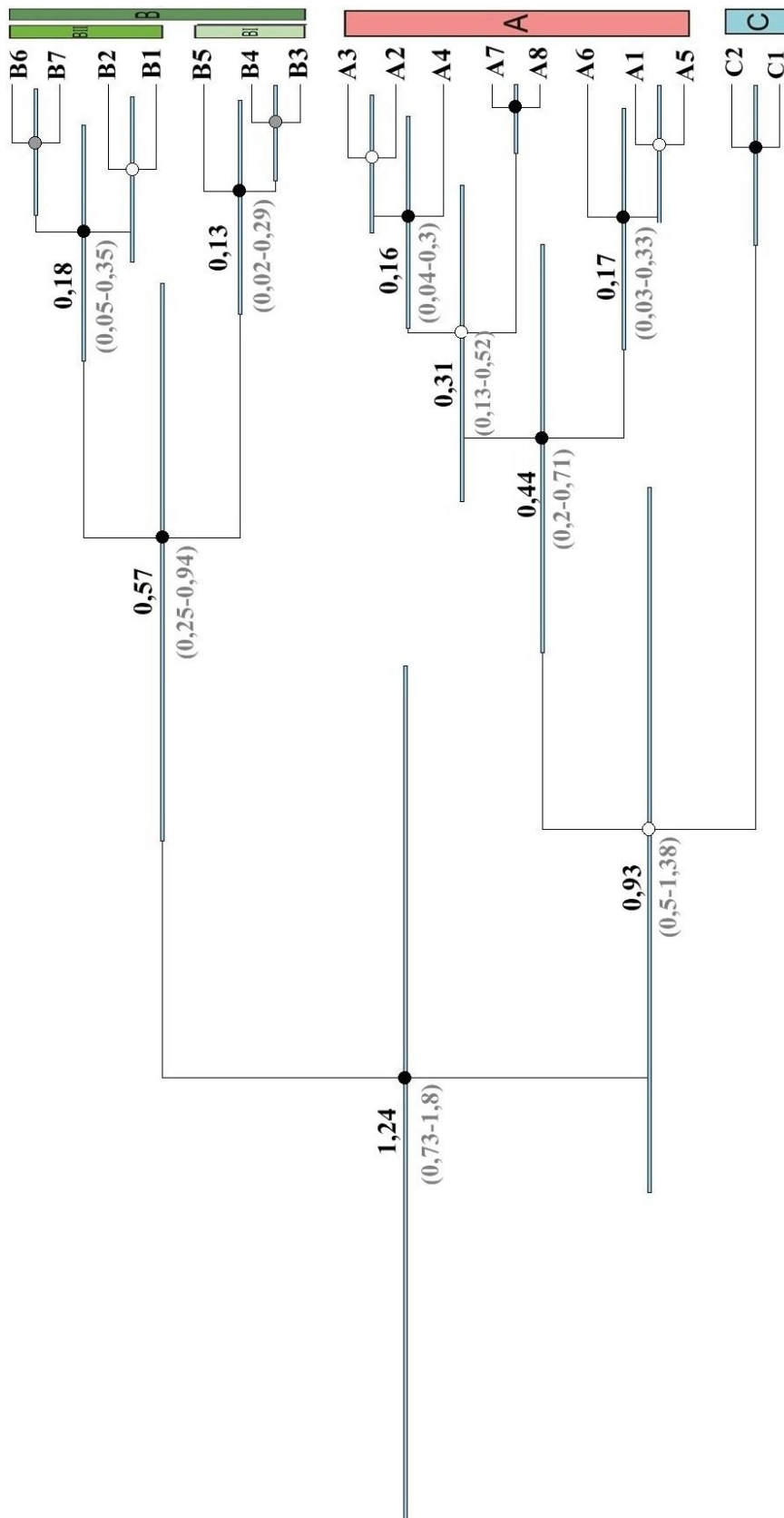
Slika 22. Filogenetska mreža dobivena metodom MJ na temelju haplotipova spojenog seta podataka COI+16S rRNA. Veličina ovala odgovara učestalosti haplotipova, kružići predstavljaju ancestralne čvorove koji nisu prisutni u uzorku (eng. *median vectors*), a brojevi označavaju broj mutiranih pozicija u sekvencama.

4.3. PROCJENA VREMENA DIVERGENCIJE

Vrijednosti procijenjenih vremena odvajanja između grupa i podgrupa prikazana su u Tablici 18. Na Slici 23 prikazano je vremenski kalibrirano filogenetsko stablo za COI. Prema analizi gena za COI do odvajanja grupe B od grupa A i C došlo je prije oko 1,2 milijuna godina. Razdvajanje između A i C grupe nastupilo je prije oko 930 000 godina, a podgrupe BI i BII razdvojile su se prije oko 600 000 godina.

Tablica 18. Procjena vremena divergencije (u milijun godina) na temelju molekularnog sata za COI.

Čvorovi	COI	
	Medijan	95% interval
B/A+ C	1,24	0,73-1,8
A/C	0,93	0,5-1,38
BI/BII	0,57	0,25-0,94
B3+B4/B5	0,13	0,02-0,29
B1+B2/B6+B7	0,18	0,05-0,35
A1+A5+A6/A2+A3+A4+A7+A8	0,44	0,2-0,71
A1+A5/A6	0,17	0,03-0,33
A2+A3+A4/A7+A8	0,31	0,13-0,52
A2+A3/A4	0,16	0,04-0,3



Slika 23. Filogenetsko stablo s procijenjenim vremenima divergencija u milijunima godina za COI. Vrijeme divergencije između grupa i podgrupa izračunato je za gen za COI prema molekularnom satu od 1,32 % promjena po nukleotidu po milijun godina (Wilke i sur. 2009).

5. RASPRAVA

Molekularno-filogenetičke analize populacija vrste *Holandriana holandrii* (Pfeiffer, 1828) pokazale su da je vrsta filogeografski izrazito strukturirana. Ustanovljeno je postojanje tri geografski i genetski različite haplogrupe na istraživanom području: grupe A, B i C. U grupu A spadaju populacije iz rijeke Korane, Kupe, Kupčine, Mrežnice, Une i Skadarskog jezera, a grupu B čine populacije iz Maje, Petrinjčice, Sutle, Save i Bregane. Treću grupu C čine haplotipovi rijeke Cetine koja pripada jadranskom slivu za razliku od ostalih populacija koje pripadaju rijekama crnomorskog sliva. Većina metoda pokazala je visoko podržano odvajanje dviju evolucijski odijeljenih podgrupa unutar grupe B: podgrupe BI (Maja, Petrinjčica) i BII (Bregana, Sutla, Sava). Ustanovljene genetske grupe geografski su korelirane, odnosno grupiraju se u određena geografska područja, s izuzetkom haplotipova iz rijeke Une i Skadarskog jezera. Haplotipovi rijeke Une pripadaju grupi A, a ne geografski bližoj grupi B. Jedno od mogućih objašnjenja takve distribucije jest da su jedinke u Unu stigle iz Korane ponirućim vodama koje otječu podzemljem prema nizvodnom dijelu njenog korita i dijelom prema izvorištu Klokot u slivu rijeke Une. Analize su pokazale da populacija iz Skadarskog jezera pripada grupi A, unatoč velikoj geografskoj udaljenosti i izolaciji. Ne postoji sigurno objašnjenje za prirodne putove rasprostranjivanja vrste prema Skadarskom jezeru, ali neke od mogućih pretpostavki uključuju antropogenu introdukciju ili prijenos puževa pomoću ptica prilikom njihove migracije. Navedeni načini širenja pretpostavljaju se za slučaj neočekivano visoke genetske sličnosti između geografski jako udaljenih i izoliranih populacija puževa roda *Daphniola* (Szarowska i sur. 2014). S druge strane, postoji mogućnost da je u prošlosti postojala veza između rijeka koje se ulijevaju u Skadarsko jezero i rijeka crnomorskog sliva, što će se nastojati razjasniti primjenom novih metoda u budućim istraživanjima.

Utvrđeno je ukupno 17 različitih haplotipova za gen COI, 9 haplotipova za 16S rRNA i 11 za konkatenirani COI+16S rRNA. Najučestaliji haplotipovi su A1 (Kupa, Kupčina, Una), A4 (Korana, Mrežnica, Una) i B1 (Bregana, Sutla, Sava) (Tablica 12, Slika 14). Smatra se da su haplotipovi koji dolaze u visokoj frekvenciji vjerojatno stariji i da od njih nastaje većina novih mutanata. Rijetke varijante predstavljaju nedavne mutante i vjerojatnije je da su povezani s čestim haplotipovima nego s ostalim rijetkim varijacijama. Stariji i učestaliji haplotipovi (A1, A4 i B1) imaju šire geografsko rasprostranjenje.

Za utvrđivanje molekularno-filogenetičkih odnosa unutar vrste *H. holandrii* korištene su analize dva mitohondrijska genska biljega - za COI i 16S rRNA. Iako su kvalitetne nukleotidne sekvence dobivene za oba biljega, rezultati su pokazali da je u određivanju evolucijskih odnosa na razini vrste korisniji gen za COI, dok gen za 16S rRNA nije dovoljno varijabilan, odnosno brzina evolucije mu je otprilike 2 - 4 puta sporija. Gen za COI je informativniji filogenetski biljeg jer sadrži veći broj varijabilnih mjesta koja osiguravaju dovoljan broj informativnih značajki za filogenetske analize pa time i bolje razlučivanje filogenetskih odnosa. U prilog činjenici da je gen COI informativniji idu rezultati analize vrijednosti sačuvanih mjesta (C), varijabilnih mjesta (V) te parsimonijski informativnih mjesta (Pi). Iako je analizirana regija gena za COI sadržavala manje nukleotida od regije gena za 16S rRNA, imala je više Pi i V mjesta (20, odnosno 17 više).

Primjenom različitih metoda konstruirana su stabla sa sličnom topologijom, podržanošću i duljinom grana. Istraživanje je obuhvaćalo intraspecifični set podataka kojeg karakterizira nizak stupanj različitosti i manji broj značajki za analize, stoga je snaga tradicionalnih filogenetskih metoda bila smanjena. U ovom slučaju upotreba kompliciranih metoda i modela pokazala se kontraproduktivnom. Primjena jednostavne metode rekonstrukcije (NJ) rezultirala je boljom razlučenošću filogenetskih odnosa. Kompliciranije filogenetičke metode učinkovitije su u rješavanju dubokih filogenetskih grananja, ali nisu toliko uspješne u razlikovanju nedavno razdvojenih linija (Austerlitz i sur., 2009). Konstrukcija filogenetske mreže pokazala se kao bolji odabir od filogenetskog stabla što je bilo i očekivano s obzirom na mali broj razlika i intraspecifičan set podataka. Općenito se filogenetske mreže smatraju metodom odabira za razrješavanje intraspecifičnih filogenetskih odnosa. Tradicionalne metode rekonstrukcije (npr. ML, MP) zakazuju na razini populacija jer ne uzimaju u obzir nekoliko fenomena koji se ne uklapaju u njihove pretpostavke. Intraspecifični fenomeni zbog kojih tradicionalne metode nisu toliko učinkovite u rekonstrukcije filogenetskih odnosa na razini populacija su nizak stupanj različitosti, prisutnost ancestralnih haplotipova koji koegzistiraju s haplotipovima koji su iz njih nastali, pojava stvarne politomije, prisutnost retikulacije (rezultat evolucijskih procesa koji djeluju na razini populacije, npr. rekombinacija između gena, hibridizacija i homoplazija) i velik set podataka koji obuhvaća velik broj populacija i više predstavnika za svaku populaciju (Posada i Crandall, 2001). Filogenetske mreže napravljene za sva tri seta podataka prikazale su postojanje tri filogenetske grupe unutar vrste *H. holandrii*.

Analiza genetske udaljenosti dala je slične rezultate korištenjem genskih biljega za COI i 16S rRNA, osim što je COI dala više vrijednosti u odnosu na 16S rRNA u slučajevima gdje postoje značajne unutargrupne i međugrupne razlike. Brzina evolucije gena za 16S rRNA je niža stoga su i vrijednosti genetske udaljenosti niže. Nepodudarne vrijednosti genetskih udaljenosti ta dva biljega dobivene su samo između grupe A i C (COI: 2.1 - 2,9; 16S rRNA: 0,5-0,6) te su rezultat sporije evolucije gena za 16S rRNA. Vrijednosti genetske udaljenosti unutar i između grupa ukazuju na relativno mlade evolucijske linije. Pretpostavlja se da nukleotidni nizovi nisu stigli nakupiti značajnije mutacijske promjene i/ili su populacije mogle komunicirati podzemnim vodenim tokovima. Vrijednosti genetske udaljenosti za COI između grupa kreću se u rasponu od 2,1 do 3,3 % između grupa A i B, od 2,1 do 2,9 % između grupa A i C te od 2,7 do 3,2 % između grupa B i C. Dobivene vrijednosti za gen 16S rRNA su 2 - 4 puta niže. Ustanovljena prosječna intergenerička vrijednost genetske udaljenosti između *Melanopsis parreyssii* i *Fagotia acicularis* iznosi samo 5 % stoga se predlaže da se obje vrste stave u rod *Melanopsis* (Smolen i Falniowski, 2009). Sukladno tome, raspon vrijednosti međugrupne genetske udaljenosti od 2,1 do 3,3% kod vrste *H. holandrii* definitivno nije zanemariv. Vrijednosti međugrupne genetske udaljenosti kod vrste *H. holandrii* iznose polovicu intergeneričke vrijednosti između rodova *Melanopsis* i *Fagotia*, stoga su grupe unutar *H. holandrii* dovoljno različite da bi se mogle smatrati evolucijski značajnim jedinicama koje pridonose ekološkoj ili evolucijskoj raznolikosti cijele vrste. Prilikom definiranja vrsta unutar carstva za 5' COI regiju (658pb) uzima se standardna vrijednost od $11,3 \pm 5,3$ % interspecifične genetske udaljenosti (Hebert, 2003). Međutim korištenje samo jedne regije mitohondrijskog gena ne može u potpunosti razlučiti kompleksnost života, pogotovo u slučaju mladih vrsta. Pojava viših intraspecifičnih udaljenosti mogla bi se objasniti geografskom izoliranošću u prošlosti koja se reflektira na fragmentiranje genskih skupova (Hebert, 2003).

Upotrebom molekularnog sata za mitohondrijski gen COI izračunato je vrijeme divergencije između grupa i podgrupa. Sva odvajanja analiziranih skupina dogodila su se u geološkom razdoblju pleistocena koje traje od 2,59 milijuna do 11 700 godina. Razdoblje pleistocena karakterizira konstantna promjena klimatskih i ekoloških uvjeta za vrijeme glacijala i interglacijala. Najstarije odvajanje nastupilo je prije oko 1,2 milijun godina između grupe B i grupa A i C što odgovara početku srednje pleistocenske tranzicije (SPT, eng. *Middle Pleistocene Transition*). SPT označava granicu između ranog i srednjeg pleistocena (1,25-0,70 milijuna godina), a karakterizira je početak intenzivne glacijacije (Clark, 2012).

Podgrupe BI i BII razdvojile su se prije oko 600 000 godina za vrijeme Günz-Mindel interglacijala. Moguće je da je odvajanje grupa povezano sa snažnim klimatskim oscilacijama i promjenama reljefa tijekom glacijala i interglacijala u pleistocenu. Promjene klime i reljefa utjecale su na gubitak kontakta između rezidualnih slatkovodnih površina i na taj način pridonijele genetskoj divergenciji vrste.

Geološki procesi i hidrogeološke promjene imale su velik utjecaj na distribuciju i evoluciju slatkovodne faune u prošlosti. Krško područje Balkana smatra se jednom od vrućih točaka slatkovodne bioraznolikosti. Dramatične ekološke promjene uslijed izmjena perioda glacijala i interglacijala smatraju se uzrokom nastanka mnogih vrsta i podvrsta na ovom području (Hewitt, 2000). Visoka genetska raznolikost rezultat je postojanja krškog reljefa burne geološke prošlosti, hidrogeografskih promjena tijekom okršavanja, fragmentacija i izolacija staništa koje su u konačnici dovele do razdvajanja genetskih linija.

Analizom distribucije pojedinih grupa i podgrupa primjećuje se postojanje određenog filogeografskog uzorka koji se podudara s filogeografskim uzorkom pronađenim kod slatkovodnog raka vrste *Austropotamobius torrentium* (Slika 24).



Slika 24. Karta rasprostranjenosti haplotipova gena COI vrste *H. holandrii* i *A. torrentium*. Oznake korištene na karti za *H. holandrii* su kružići: rozi - grupa A (Kupa, Korana, Kupčina, Mrežnica, Una, Skadarsko jezero), zeleni - grupa B (tamnozeleni - podgrupa BI (Maja, Petrinjčica) i svjetlozeleni - podgrupa BII (Sava, Sutla, Bregana)) i plavi - grupa C (Cetina). Oznake korištene na karti za *A. torrentium* su kvadratići: zeleni - CSE (srednja i jugoistočna Europa), crni - ZV (Zeleni Vir), tamnoplavi - GK (Gorski Kotar), svijetloplavi - ŽBP (Žumberak, Bjelolasica i Plitvice), crveni - LD (Lika i Dalmacija), žuti - BAN (Banovina), ljubičasti - SB (južni Balkan).

Ustanovljene grupe i podgrupe unutar vrste *H. holandrii* podudaraju se s filogrupama rakova, osim što su posljednje puno starijeg postanka (Klobučar i sur., 2013). Najstarije odvajanje kod vrste *A. torrentium* nastupilo je prije oko 5,6 milijuna godina između filogrupa GK (Gorski Kotar) i ZV (Zeleni Vir), a ostale filogrupe odvojile su se za vrijeme pliocena, između 2 i 5 milijuna godina. Diversifikacija najraširenije filogrupe rakova CSE (srednja i jugoistočna Europa) nastupila je u pleistocenu prije milijun godina. Geografski izolirane i duboko divergentne filogrupe rakova nastale su kao rezultat intenzivnih neotektonskih kretanja tijekom pliocena i početkom pleistocena te procesa okršavanja koje je fragmentiralo paleohidrografiju ovog područja (Klobučar i sur., 2013). Grupa A podudara se s grupama ZBP (Žumberak, Plitvice, Bjelolasica) i GK (Gorski Kotar) slatkovodnog raka. Distribucija grupe B poklapa se s distribucijom grupa CSE (srednja i jugoistočna Europa) i BAN (Banovina) koje odgovaraju podgrupama puža BI (Maja, Petrinjčica) i BII (Sava, Sutla, Bregana). Pritom se podgrupa BI podudara s BAN, a podgrupa BII s CSE. Na području Dalmacije, vrsta *H. holandrii* zasad je pronađena samo u rijeci Cetini, a ona se u analizama pokazala kao zasebna grupa. Postojanje posebne haplogrupe na području dalmatinskog krša podudara se s postojanjem haplogrupe LD (Lika i Dalmacija) kod rakova.

U budućim istraživanjima potrebno je povećati set podataka uvođenjem većeg broja jedinki i lokaliteta na području Hrvatske, ali i na području cijelog areala vrste koji obuhvaća jugoistočni dio Europe. Ovim istraživanjem nije obuhvaćeno cijelo područje rasprostranjenja stoga se pretpostavlja postojanje većeg broja neustanovljenih haplogrupa. Daljnjem razrješenju filogenetskih odnosa pomoglo bi dizajniranje para početnica koje bi rezultirale dužim fragmentom COI sekvence te korištenje dodatnih jezgrinih i/ili mitohondrijskih biljega koji evoluiraju sličnom ili brzom ratom. Rezultate molekularno-filogenetičkih analiza potrebno je povezati s analizom morfometrijskih značajki kućice puža i vidjeti mogu li se geografski i genetski izolirane grupe povezati s eventualnim razlikama u morfologiji i anatomiji.

6. ZAKLJUČAK

- Molekularno-filogenetičke analize pokazale su da je vrsta *Holandriana holandrii* (Pfeiffer, 1828) filogeografski izrazito strukturirana.
- Utvrđene su tri geografski i genetski odijeljene grupe: grupe A (Korana, Kupa, Kupčina, Mrežnica, Una, Skadarsko jezero), B (Maja, Petrinjčica, Sutla, Sava i Bregana) i C (Cetina). Unutar grupe B potvrđeno je postojanje dviju evolucijski odijeljenih podgrupa: BI (Maja, Petrinjčica) i BII (Sutla, Bregana, Sava).
- Genetske udaljenosti unutar i između grupa ukazuju na relativno mlade evolucijske linije.
- Odvajanja grupa i podgrupa dogodila su se u geološkom razdoblju pleistocena. Procijenjena vremena divergencije u skladu su s promjenama klime i reljefa tijekom pleistocenskih glacijala i interglacijala.
- Filogeografski uzorak vrste *H. holandrii* podudara se u velikoj mjeri s filogeografskim uzorkom slatkovodnog raka vrste *Austropotamobius torrentium*. Rasprostranjenje ustanovljenih grupa i podgrupa vrste *H. holandrii* podudara se, u području preklapanja, s rasprostranjenjem pojedinih filogrupa rakova, osim što su one starijeg postanka.
- Grupe i podgrupe mogu se smatrati evolucijski značajnim jedinicama jer vrijednosti međugrupne genetske udaljenosti iznose čak polovicu intergeneričke vrijednosti između vrsta *Melanopsis parreyssii* i *Fagotia acicularis*.
- Mitohondrijski gen za COI pokazao se prikladnijim filogenetskim biljegom od mitohondrijskog gena za 16S rRNA zbog većeg broja informativnih mjesta za filogenetička istraživanja ove vrste.
- U budućim istraživanjima trebalo bi proširiti analize na veći broj lokaliteta kako bi se obuhvatio cijeli areal vrste, analizirati veći broj jedinki po lokalitetu, produžiti COI sekvencu i koristiti dodatne jezgrine i/ili mitohondrijske biljege slične ili veće brzine evolucije te rezultate molekularno-filogenetičkih analiza povezati s rezultatima mjerenja morfometrijskih značajki.

7. LITERATURA

- 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.
- Austerlitz F., David O., Schaeffer B., Bleakley K., Olteanu M., Leblois R., Laredo C. 2009. DNA barcode analysis: a comparison of phylogenetic and statistical classification methods. *BMC Bioinformatics* **10**, 10.
- Avise, J. C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press.
- Avise J. C., Arnold J., Ball R. M., Bermingham E., Lamb T., Neigel J. E., Saunders N. C. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual review of ecology and systematics* **18**, 489-522.
- Bandelt H. J., Forster P., Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* **16**, 37-48.
- Baxevanis A. D, Oullette B. F. F. 2001. *Bioinformatics: a practical guide to the analysis of genes and proteins*. Second edition. Wiley-Interscience.
- Beckman K. B., Smith M. F., Orrego C. 1993. Purification of mitochondrial DNA with Wizard Minipreps DNA purification system. *Promega Notes* **43**, 10-13.
- Beran L. 2013. Aquatic molluscan fauna (Mollusca) of the Korana River (Croatia). *Natura Croatica* **22**, 223-234.
- Bermingham E., Moritz C. 1998. Comparative phylogeography. *Molecular Ecology* **7**, 367-369
- Bouchet P. 2007. *Inventorying the molluscan fauna of the world: How far to go?* U: Jordaens K., van Houtte N., van Goethem J., Backeljau T. (ur.) *Abstracts of the World Congress of Malacology*, Antwerp, Belgium.
- Božak K. 2010. *Ekološka uvjetovanost strukture zajednica puževa (Mollusca, Gastropoda) u rijeci Cetini*. Magistarski rad. Sveučilište u Zagrebu, 122 str.

- Clark P. U. 2012. Ice sheets in transition. *Science* **337**, 656-658.
- Clement M., Posada D., Crandall K. A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* **9**, 1657-1659.
- Cuttelod A., Seddon M., Neubert E. 2011. European Red list of Non-marine Molluscs. Luxembourg: Publications Office of the European Union.
- Darriba D., Taboada G. L., Doallo R., Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* **9**, 772.
- Drummond A. J., Suchard M. A., Xie D., Rambaut A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* **29**, 1969-1973.
- Emerson B. C., Hewitt G. M. 2005. Phylogeography. *Current Biology* **15**, 367-371.
- Felsenstein J. 1973. Maximum likelihood and minimum-steps methods for estimating evolutionary trees from data on discrete characters. *Systematic Biology* **22**, 240-249.
- Felsenstein J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* **17**, 368-376.
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology Biotechnology* **3**, 294-299.
- Geary D. H., Magyar I., Müller P. 2000. Ancient Lake Pannon and its Endemic Molluscan Fauna (Central Europe; Mio-Pliocene). *Advances in Ecological Research* **31**, 463-482.
- Gernhard T. 2008. The conditioned reconstructed process. *Journal of Theoretical Biology* **253**, 769-778.
- Glöer P. 2002. Die Süßwassergastropoden Nord- und Mitteleuropas, Bestimmungsschlüssel, Lebensweise, Verbreitung. Die Tierwelt Deutschlands, 73 Teil, Conchbooks, Hackenheim.
- Habdija I., Lajtner J., Belinić I. 1995. The contribution of gastropod biomass in macrobenthic communities of a karstic river. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie* **80**, 103-110.

- Habdija I., Primc Habdija B., Radanović I., Vidaković J., Kučinić M., Špoljar M., Matoničkin R., Miliša M. 2004. Protista - Protozoa i Metazoa- Invertebrata. Funkcionalna građa i praktikum, knjiga 3, prvo izdanje, Meridijani, Samobor.
- Habdija I., Primc Habdija B., Radanović I., Špoljar M., Matoničkin Kepčija R., Vujčić Karlo S., Miliša M., Ostojić A., Sertić Perić M. 2011. Protista – Protozoa i Metazoa- Invertebrata. Strukture i funkcije. Alfa, Zagreb.
- 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.
- Hall B. G. 2007. *Phylogenetic Trees Made Easy: A How-To Manual, Third Edition*. Sinauer Associates Inc, Sunderland, str.173.
- Hebert P. D. N., Ratnasingham S., DeWaar J.R. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **270**, 596-599
- Hećimović K. S. 2007. Lančana reakcija polimerazom. U: Ristov A. A., Brozović A., Mađarić B. B. Četković H., Bosnar H. M., Hranilović D., Hećimović K. S., Radan M. N., Mihaljević N., Slade N., Vujaklija D. (ur.): *Metode u molekularnoj biologiji*, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, 361-366.
- Hewitt G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* **405**, 907-913.
- Harzhauser M., Mandić O. 2008. Neogene lake systems of Central and South-Eastern Europe: Faunal diversity, gradients and interrelations. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **260**, 417-434.
- Hasegawa M., Kishino H., Yano T. 1985. Dating of human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* **22**, 160-174.
- Ronquist F., Huelsenbeck J. P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**, 1572-1574.
- Hwang U. W., Kim W. 1999. General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *The Korean journal of parasitology* **37**, 215-228.

- Kalafatić M. 1998. Osnove biološke evolucije. Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Kerovec M., Mihaljević Z., Stanković I. 2008. 6. Makrozoobentos kao pokazatelj ekološkog stanja tekućica, knjiga 3/1. U: Habdija I. i sur. (ur.) Ekološko istraživanje površinskih kopnenih voda u Hrvatskoj prema kriterijima okvirne direktive o vodama. Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 134 pp.
- Klobučar G., Podnar M., Jelić M., Franjević D., Faller M., Štambuk A., Gottstein S., Simić V., Maguire I. 2013. Role of the Dinaric Karst (western Balkans) in shaping the phylogeographic structure of the threatened crayfish *Austropotamobius torrentium*. *Freshwater Biology* **58**, 1089-1105.
- Larkin M. A., Blackshields G., Brown N. P., Chenna R., McGettigan P. R., McWilliam H., Valentin F., Wallace I. M., Wilm A., Lopez R., Thompson J. D., Gibson T. J., Higgins D. G. 2007. ClustalW ad ClustalX version 2. *Bioinformatics* **23**, 2947-2948.
- Li W. H. 1997. *Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, str. 475.
- Lydeard C., Holznagel W. E., Glaubrecht M., Ponder W. F. 2002. Molecular phylogeny of a circum-global, diverse gastropod superfamily (Cerithioidea: Mollusca: Caenogastropoda): pushing the deepest phylogenetic limits of mitochondrial LSU rDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **22**, 399-406.
- Lydeard C., Cowie R. H., Bogan A. E., Bouchet P., Cummings K. S., Frest T. J., Herbert D. G., Hershler R., Gargominy O., Perez K., Ponder W. F., Roth B., Seddon M., Strong E. E., Thompson F. G. 2004. The global decline of non-marine mollusks. *BioScience* **54**, 321-330.
- Matoničkin I., Habdija I., Primc Habdija B. 1998. Beskralješnjaci. *Biologija nižih beskralješnjaka*. Školska knjiga, Zagreb.
- Mau B., Newton M., Larget B. 1999. Bayesian phylogenetic inference via Markov chain Monte Carlo methods. *Biometrics* **55**, 1-12.
- Mihaljević Z., Kerovec K., Mrakovčić M., Primc-Habdija B., Plenković-Moraj A., Alegro A. 2011. Testiranje bioloških metoda ocjene ekološkog stanja (Okvirna direktiva o vodama, 2000/60/EC) u reprezentativnim slivovima panonske i dinaridske ekoregije.

- Biološki odsjek, Prirodoslovno - matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 350 str.
- Moog O. 2002. *Fauna Aquatica Austriaca*, 2nd Edition Wasserwirtschaftskataster, Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft, Vienna.
- Moritz C. 1994. Defining 'evolutionary significant units' for conservation. *Trends in Ecology & Evolution* **9**, 373-375.
- Moritz C., Faith D. P. 1998. Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. *Molecular Ecology* **7**, 419-429.
- Nei M., Kumar S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*, Oxford University Press, New York.
- Pfleger V., Chatfield J. 1988. *A guide to snails of Britain and Europe*. Blitz Editions, Leicester.
- Pfleger V. 1999. *A Field Guide in Colour to Molluscs*. Blitz Editions, Leicester.
- Ponder W., Lindberg D. R. 1997. Towards a phylogeny of gastropod molluscs: an analysis using morphological characters. *Zoological Journal of the Linnean Society* **119**, 83-265.
- Ponder W., Lindberg D. R. 2008. *Phylogeny and Evolution of the Mollusca*. University of California Press, Berkeley.
- Posada D., Crandall, K. A. 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology & Evolution* **16**, 37-45.
- Posada D., Crandall K. A. 2001. Selecting the best-fit model of nucleotide substitution. *Systematic Biology* **50**, 580-601.
- Rambaut A. 2012. *Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology: FigTree* [Online].
- Rambaut A., Drummond A.J. 2009. *Tracer v.1.5*. [Online].
- Rögl F. 1998. Palaeogeographic considerations for Mediterranean and Paratethys seaways (Oligocene to Miocene). *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien*, 279-310.

- Saitou N., Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 406-425.
- Schulman A. H., Flavell A. J., Ellis T. H. N. 2004. The application of LTR retrotransposons as molecular markers in plants. *Methods in Molecular Biology* **260**, 145-173.
- Simon C., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H., Flook, P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America* **87**, 651-701.
- Smoleń M., Falniowski, A. 2009. Molecular phylogeny and estimated time of divergence in the central European Melanopsidae: *Melanopsis*, *Fagotia* and *Holandriana* (Mollusca: Gastropoda: Cerithioidea). *Folia Malacologica* **17**, 1-9.
- Strong E. E., Gargominy O., Ponder W. F., Bouchet P. 2008. Global diversity of gastropods (Gastropoda; Mollusca) in freshwater. *Hydrobiologia* **595**, 149-166.
- Swofford D. L. 2001. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Version 4.0. beta10. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates.
- Szarowska M., Hofman S., Osikowski A., Falniowski A. 2014. *Daphniola* Radoman, 1973 (Caenogastropoda: Truncatelloidea) at East Aegean Islands. *Folia Malacologica* **22**, 269–275.
- Tamura K. 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C content biases. *Molecular Biology and Evolution* **9**, 678-687.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**, 2725-2729.
- Templeton A. R., Crandall K. A. i Sing C. F. 1992. A Cladistic Analysis of Phenotypic Associations With Haplotypes Inferred From Restriction Endonuclease Mapping and DNA Sequence Data. III. Cladogram Estimation. *Genetics* **132**, 619-633
- Tomović J., Vavrova L., Seddon M.B. 2011. *Amphimelania holandrii*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. <www.iucnredlist.org>.

- Tzgaloff A., Myers A. M. 1986. Genetics of mitochondrial biogenesis. *The Annual Review of Biochemistry* **55**, 249-285.
- Villesen P. 2007. FaBox: an online toolbox for fasta sequences. *Molecular Ecology Notes* **7**, 965-968.
- Vrankovic J., Labus-Blagojevic S., Csanyi B., Makovinska J., Cvetkovic O., Gacic Z., Paunovic M. 2012. Antioxidant enzymes and GST activity in natural populations of *Holandriana holandrii* from the Bosna River. *Turkish Journal of Biology* **36**, 477-485.
- Wilke T., Falniowski A. 2001. The genus *Adriohydrobia* (Hydrobiidae: Gastropoda): polytypic species or polymorphic populations? *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **39**, 227-234.
- Wilke T., Schultheiß R., Albrecht, C. 2009. As Time Goes by: A Simple Fool's Guide to Molecular Clock Approaches in Invertebrates. *American Malacological Bulletin* **27**, 25-45.
- Xiong J. (2006). *Essential Bioinformatics*. Cambridge University Press, Published in the United States of America by Cambridge University Press, New York. The Edinburgh Building, Cambridge, UK.
- Zeng T., Yin W., Xia R., Fu C., Jin, B. 2014. Complete mitochondrial genome of a freshwater snail, *Semisulcospira libertina* (Cerithioidea: Semisulcospiridae). *Mitochondrial DNA*, 1-2.
- Zuckerandl E., Pauling L. 1965. Molecules as Documents of Evolutionary History. *The Journal of Theoretical Biology* **8**, 357-366.

Internetski izvori

www.biolib.cz, pristupljeno 5. siječnja 2015.

www.bioweb.uwlax.edu/bio210/2011/, pristupljeno 7. ožujka 2015.

www.faunaeur.org, pristupljeno 7. ožujka 2015.

8. ŽIVOTOPIS

Leona Lovrenčić

- M. Bakliže 6, 49223 Sveti Križ Začretje, Hrvatska
- 091 554 7704
- leona.lovrencic@gmail.com

Datum i mjesto rođenja:

- 21.11.1990., Zagreb

Završeno obrazovanje:

- Diplomski studij eksperimentalne biologije, Biološki odsjek; Prirodoslovno - matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- Preddiplomski studij biologije; Biološki odsjek; Prirodoslovno - matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- Gimnazija A. G. Matoša, Zabok
- Osnovna škola Sveti Križ Začretje

Fakultetski angažman:

- Demonstratorica na Botaničkom zavodu iz kolegija „Morfologija i anatomija bilja“ (ak. god. 2010./2011.) i na Zoologijskom zavodu iz kolegija „Malakologija“ (ak. god. 2014./2015.)

Vannastavni program:

- Član Udruge studenata biologije - BIUS (2009.-2015.)
- Suvoditeljica Sekcije za leptire Udruge studenata biologije - BIUS (2012./2013.)
- Sudjelovanje na istraživačko-edukacijskim projektima Udruge studenata biologije - BIUS: otok Hvar (2011.), Dinara (2012.), Grabovača (2015.)
- sudjelovanje u popularno-znanstvenoj manifestaciji „Noć biologije“ (2011., 2012., 2014.)
- laboratorijska stručna praksa iz područja molekularne evolucije, Prirodoslovno matematički fakultet, Zagreb (2013.)
- volontiranje u Eko-centru *Caput Insulae-Beli* (2006., 2009.)

Nagrade:

- osvojeno 1. mjesto na državnom natjecanju iz biologije u kategoriji istraživačkog rada (Podgora, 2008.)
- dobitnik posebne Rektorove nagrade za manifestaciju Noć biologije (2012.)
- dobitnik stipendije za nadarene studente tijekom cijelog preddiplomskog i diplomskog studija