

# Utjecaj zaražavanja patogenom *Aphanomyces astaci* (Schikora, 1906) na mortalitet i rast mramornog raka *Procambarus virginalis* (Lyko, 2017)

---

Vukelić, Mara

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:118133>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-16**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Mara Vukelić

**Utjecaj zaražavanja patogenom  
*Aphanomyces astaci* Schikora, 1906 na  
mortalitet i rast mramornog raka  
*Procambarus virginalis* Lyko, 2017**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Mara Vukelić

**The effect of infection with pathogen  
*Aphanomyces astaci* Schikora, 1906 on  
mortality and growth of marbled crayfish  
*Procambarus virginalis* Lyko, 2017**

Master thesis

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen u Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta i u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehničkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod voditeljstvom doc. dr. sc. Sandre Hudina. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra znanosti o okolišu.

*Hvala **mentorici Sandri Hudini** na stručnom vodstvu, savjetima i strpljenju pri izradi ovog diplomskog rada. Zahvaljujem joj na vremenu i velikom trudu koje je uložila onda kada ja nisam mogla. Hvala za uvijek opuštenu i prijateljsku radnu atmosferu.*

*Hvala **Ani** na svojoj pomoći, odrađenom poslu i za svakog slikanog raka i upisanu bilješku.*

*Hvala **Dori** što mi je uvijek nesebično i spremno pomogla u laboratoriju i izvan njega.*

*Hvala **Pauli** i ostatku ekipe s PMF-a i PBF-a koji su pomogli i pokazali kolegijalnost.*

*Hvala prijateljicama **Marini** i **Valeriji** na svemu.*

*Ne stane na ovaj papir sve što vam želim reći.*

*Učinile ste moje studiranje i život toliko boljim i ljepšim.*

*Hvala **tati, mami** i **bratu***

*na ljubavi, podršci i svemu što ste mi pružili i omogućili.*

*Hvala mom **Davidu**.*

*Hvala ti što me uvijek slušaš, podupireš i što si tu za mene. Za svaku ohrabrujuću i lijepu riječ te bezuvjetno strpljenje i ljubav.*

*Hvala ti što toliko vjeruješ u mene, to me čini jačom osobom.*

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

**Utjecaj zaražavanja patogenom *Aphanomyces astaci* Schikora, 1906 na mortalitet i rast mramornog raka *Procambarus virginalis* Lyko, 2017**

Mara Vukelić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

**Sažetak:**

Mramorni rak (*Procambarus virginalis*, Lyko 2017) je invazivna strana vrsta slatkovodnog raka u Hrvatskoj i svijetu. Predstavlja prijetnju autohtonim vrstama rakova jer je mogući vektor širenja patogena *Aphanomyces astaci*, Schikora, 1906, uzročnika bolesti račje kuge, koja je smrtonosna za autohtone vrste. Iako ovaj patogen ne uzrokuje značajnu smrtnost kod mramornih rakova, obrana od njega zahtijeva ulaganje energije u imunski sustav što ograničava njezinu dostupnost za procese kao što su rast i razmnožavanje. Cilj istraživanja je bio ispitati kako opetovano zaražavanje juvenilnih jedinki mramornog raka patogenom *A. astaci* utječe na njihov prirast dužine i težine. Prvi dio istraživanja sastojao se od uzgoja patogena i zaražavanja manjeg broja juvenilnih jedinki različitim koncentracijama zoospora kako bi se utvrdile optimalne (subletalne) koncentracije za daljnje zaražavanje. U drugom dijelu zaražavanje je provedeno na većem broju jedinki, te su analizirane razlike u prirastu dužine i težine između kontrolne skupine i dvije skupine zaražavane odabranim koncentracijama zoospora. Po završetku eksperimenta, jedinke su usmrćene i iz kutikule i uropoda im je izolirana DNA u čijim uzorcima se provjeravala prisutnost patogena. Rezultati pokazuju da zaražavanje subletalnim koncentracijama patogena ima značajan utjecaj na prirast dužine i težine kod mramornih rakova, te ukazuju da postoji kompromis između ulaganja energije u rast i imunski sustav kod ove vrste.

**Ključne riječi:** kompromis, imunski odgovor, prirast, koncentracija zoospora, račja kuga

**Rad sadrži:** VI + 42 stranice, 5 tablica, 12 slika, 97 referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

**Voditeljica rada:** doc. dr. sc. Sandra Hudina

Ocjenitelji:

Doc. dr. sc. Sandra Hudina  
Prof. dr. sc. Ivana Maguire  
Doc. dr. sc. Ivan Čanjevac  
Prof. dr. sc. Blanka Cvetko Tešović

Rad prihvaćen: 2.9.2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master Thesis

### **The effect of infection with pathogen *Aphanomyces astaci* Schikora, 1906 on mortality and growth of marbled crayfish *Procambarus virginalis* Lyko, 2017**

Mara Vukelić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

#### **Summary:**

Marbled crayfish (*Procambarus virginalis*, Lyko 2017) is an emerging invasive alien species in Croatia and globally. It threatens native species of crayfish because it is carrier of pathogen *Aphanomyces astaci*, Schikora 1906, the causative agent of crayfish plague which is a highly lethal disease for native crayfish. Although marbled crayfish is generally resistant to crayfish plague, defence from it requires investment of energy in immune system. This consequently leads to trade-offs with other processes like growth and reproduction. The main goal of this research was to determine whether repeated infection of juvenile marbled crayfish with pathogen *A. astaci* affects their growth rate. In the first part of the research, optimal (sublethal) concentrations for further infections were determined. In the second part, infection trials using two different zoospore concentrations were performed repeatedly on a higher number of individuals and differences in growth rates were compared between control group and two experimental groups. At the end of the experiment, crayfish were killed and DNA was isolated from cuticle and uropods and tested for the presence of *A. astaci* by PCR. Results showed that pathogen infection had significant effect on growth rate of marbled crayfish which indicates that trade-offs between energy investment in growth and immune response occur in this species.

**Keywords:** trade-off, immune response, growth, zoospore concentration, crayfish plague

**Thesis contains:** VI + 42 pages, 12 figures, 5 tables, 97 references

Original language: Croatian

Thesis is deposited in Central Biological Library.

**Supervisor:** Dr. Sandra Hudina, Asst. prof.

Reviewers:

Asst. Prof. Sandra Hudina  
Prof. Ivana Maguire  
Asst. Prof. Ivan Čanjevac  
Prof. Blanka Cvetko Tešović

Thesis accepted: 2.9.2021.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. Značajke životnog ciklusa.....	1
1.2. Važnost i ugroženost slatkovodnih ekosustava.....	2
1.3. Uloga deseteronožnih rakova u slatkovodnim ekosustavima.....	3
1.4. Slatkovodni rakovi infrareda Astacidea.....	4
1.4.1. Slatkovodni rakovi infrareda Astacidea u Hrvatskoj.....	5
1.5. Modelni organizam - mramorni rak.....	5
1.5.1. Porijeklo mramornog raka.....	6
1.5.2. Biologija mramornog raka.....	6
1.5.3. Rasprostranjenost mramornog raka u Europi i svijetu.....	9
1.6. Račja kuga.....	10
1.6.1. Životni ciklus patogena <i>Aphanomyces astaci</i> .....	10
1.6.2. Obrana rakova od račje kuge.....	11
1.7. Ciljevi istraživanja.....	13
<b>2. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>14</b>
2.1. Uzgoj ulovljenih rakova u laboratorijskim uvjetima.....	14
2.2. Produkcija zoospora patogena <i>A. astaci</i> .....	15
2.3. Određivanje optimalnih radnih koncentracija te praćenje utjecaja zaražavanja različitim koncentracijama spora račje kuge na preživljavanje juvenilnih jedinki mramornog raka ...	16
2.3.1. Prva faza pokusa.....	16
2.3.2. Druga faza pokusa: provedba pokusa zaražavanja odabranim koncentracijama patogena i usporedba prirasta dužine i težine, te mortaliteta između zaraženih skupina i kontrolne skupine.....	18
2.4. Izolacija DNA.....	19
2.5. PCR-test za detekciju patogena <i>A. astaci</i> .....	20
2.6. Elektroforeza u agaroznom gelu.....	21



2.7. Statistička obrada podataka .....	22
<b>3. REZULTATI .....</b>	<b>23</b>
3.1. Utjecaj zaražavanja različitim koncentracijama spora račje kuge na preživljavanje juvenilnih jedinki mramornog raka i određivanje optimalnih radnih subletalnih koncentracija .....	23
3.2. Utjecaj zaražavanja odabranim koncentracijama patogena na mortalitet, te prirast dužine i težine.....	24
3.3. Provjera prisutnosti patogena <i>A. astaci</i> .....	26
<b>4. RASPRAVA.....</b>	<b>28</b>
<b>5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>32</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>33</b>
<b>ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>42</b>

# 1. UVOD

## 1.1. Značajke životnog ciklusa

Teorija o životnom ciklusu (*engl.* life history theory) pokušava objasniti na koji način evolucija oblikuje organizam kako bi se on uspješno razmnožavao. Da bismo razumjeli životni ciklus i njegovu evoluciju moramo shvatiti kako na njega utječu vanjski i unutarnji čimbenici te njihova interakcija. Vanjski podrazumijevaju utjecaj okoliša na preživljavanje i razmnožavanje organizma, a unutarnji podrazumijevaju kompromise (*engl.* trade-offs) između značajki životnog ciklusa (*engl.* life history traits) poput veličine pri rođenju, stope rasta, dobi i veličine pri kojima organizam dostiže spolnu zrelost, veličine i broja potomaka, fekunditeta, mortaliteta i životnog vijek (Reznick 1992, Stearns 2000).

Različiti metabolički procesi omogućuju organizmima samoregulaciju, rast i razmnožavanje. Resursi, odnosno količina energije koja pokreće te procese je ograničena kod svakog organizma, te je on uvijek suočen s kompromisom kada se radi o raspodijeli resursa. Ako dođe do njihove preraspodjele i većeg ulaganja u jednu značajku životnog ciklusa, npr. razmnožavanje, znači da je manje resursa na raspolaganju za ulaganje u neke druge značajke, npr. rast, samoregulaciju ili imunosni odgovor (English i Bonsall 2019). Dakle kompromis je negativna korelacija između značajki životnog ciklusa (Reznick 1992).

Imunološka ekologija postaje sve više istraživana grana biologije, pogotovo s naglaskom na važnost kompromisa između imunosnih funkcija i ostalih značajki životnog ciklusa (Rantala i Roff 2005). Iako na tom području još uvijek ima puno nepoznanica (Lee 2006), postoji konsensus kako je imunosni odgovor energetski jako "skup" jer svaki organizam ima određenu količinu energije koju mora preraspodijeliti kako bi se obranio od okolišnih stresora (Lochmiller i Deerenberg 2000) poput npr. patogena i raznih zagađivala (Schultz i Grieder 1987). To znači da primjerice obrana organizma od patogena dovodi do kompromisa s drugim procesima koji zahtijevaju energiju, kao što su rast, razmnožavanje ili termoregulacija (Lochmiller i Deerenberg 2000).

Puno istraživanja je zabilježilo negativnu korelaciju između imunosnog odgovora i značajki životnog ciklusa (van der Most i sur. 2011, Schwenke i sur. 2016). Tako su na primjer Martin i suradnici (2003) izazvali stanični imunosni odgovor kod običnog vrapca *Passer domesticus* Linnaeus, 1758 i izračunali da on troši 4.2 kJ dnevno što je jednako količini energije koja je

potrebna za produkciju pola jajeta kod ove vrste. Zaključili su da imunosni odgovor uzrokuje potrošnju energije što može negativno utjecati na neke značajke životnog ciklusa, npr. smanjiti broj jaja u leglu, što ujedno znači i smanjenje fitnesa jedinki. Iako je kod mnogih vrsta utvrđena negativna korelacija između imunosnog odgovora i značajki životnog ciklusa, kod nekih vrsta povezanost nije utvrđena (Ojala i sur. 2005). Dodatno, istraživanja su pokazala da se sposobnost organizma da se obrani od bolesti ne može tretirati kao jedna osobina jer je imunosni odgovor kompleksan. Neke vrste u isto vrijeme pokazuju i pozitivnu i negativnu korelaciju između značajki životnog ciklusa i različitih vrsta imunosnog odgovora (Rantala i Roff 2005).

U ovom istraživanju pokušat ću utvrditi možemo li uočiti povezanost između imunosnog odgovora i stope prirasta dužine i težine juvenilnih jedinki invazivne vrste mramornog raka *Procambarus virginalis* Lyko, 2017 koje će biti izlagane patogenu račje kuge *Aphanomyces astaci* Schikora, 1906. Mramorni rak je nedavno sistematski klasificirana vrsta slatkovodnih deseteronožnih rakova (Lyko, 2017), a slatkovodni deseteronožni rakovi su ključne vrste slatkovodnih ekosustava (Parkyn i sur. 2001). Otprilike jednoj trećini svih slatkovodnih deseteronožnih rakova prijete izumiranje, a jedan od razloga je ugroženost njihovog staništa, slatkovodnih ekosustava (Richman i sur. 2015).

## **1.2. Važnost i ugroženost slatkovodnih ekosustava**

Slatkovodni ekosustavi zauzimaju manje od 1% Zemljine površine, ali unatoč maloj površini, kada se promatraju na globalnoj razini, predstavljaju vruće točke biološke raznolikosti (*engl.* biodiversity hotspots) (Strayer i Dudgeon 2010). U njima živi oko 10% svih poznatih vrsta i oko 30% svih vrsta kralježnjaka (Strayer i Dudgeon 2010). Ovi ekosustavi su jedni od temeljnih resursa za život ljudi jer su izvor čiste i pitke vode, hrane i energije, održavaju klimatsku ravnotežu na lokalnoj i globalnoj razini te su bitni za rekreaciju, zdravlje, dobrobit i samu egzistenciju ljudi (Albert i sur. 2021). Imaju neprocjenjivu ekonomsku, zdravstvenu, kulturološku, znanstvenu i edukativnu vrijednost, te su pod izrazito velikim ljudskim pritiskom. Oko jedne trećine slatke vode na cijelom svijetu prolazi kroz poljoprivrednu, industrijsku ili urbanu infrastrukturu. Otprilike jedna petina obradive površine na našem planetu je opremljena sustavima za navodnjavanje, a procjenjuje se da će do sredine ovoga stoljeća to biti jedna trećina, kako bi se mogla zadovoljiti potreba brzorastuće ljudske populacije za hranom (Albert i sur. 2021). Očuvano je manje od 25% slatkovodnih močvara iz predindustrijskog razdoblja, a očekuje se da će do sredine ovoga stoljeća to biti manje od 10% (Albert i sur. 2021). Takvo

prekomjerno iskorištavanje je dovelo do ozbiljne degradacije slatkovodnih ekosustava i njihove biološke raznolikosti (Darwall i sur. 2018) te se slatkovodni ekosustavi smatraju ugroženijima od kopnenih i morskih (Strayer i Dudgeon 2010, Darwall i sur. 2018, Albert i sur. 2021).

Strayer (2006) opisuje slatkovodne ekosustave kao otoke u moru kopna i slane vode. Poput otoka u oceanu, svako slatkovodno stanište je manje ili više izolirano od drugog takvog staništa te puno slatkovodnih vrsta ima mali areal rasprostranjenosti. Upravo ovakva fragmentiranost jako ograničava njihovu mogućnost migracije i onemogućava im širenje areala kao odgovor na promjene u okolišu (npr. klimatske promjene, zagađenje) zbog čega su jako osjetljive na utjecaj čovjeka. Izgradnja brana, navodnjavanje, ribolov, unošenje invazivnih stranih vrsta i mnoge druge aktivnosti imaju direktan negativan utjecaj na slatkovodne ekosustave i vrste koje žive u njima. Osim toga, sve aktivnosti koje se odvijaju u nekom porječju odražavaju se i mogu negativno utjecati na rijeke i jezera, npr. krčenje šuma, izgradnja industrijskih postrojenja, divlja odlagališta otpada, prskanje usjeva pesticidima, gnojidba umjetnim gnojivima te općenita koncentracija ljudskih aktivnosti i naselja oko rijeka i jezera (Strayer 2006).

Zbog svega navedenoga, došlo je do ozbiljnog pada rasprostranjenosti i abundancije mnogih slatkovodnih vrsta. Living Planet indeks (LPI) za slatkovodne ekosustave, koji se temelji na promatranju 3424 populacije kod 881 slatkovodne vrste kralježnjaka, pokazuje prosječno opadanje abundancije slatkovodnih populacija kralježnjaka za 81% u periodu od 1970. do 2012. godine (WWF 2016). LPI za slatkovodne beskrležnjake još nije razvijen što samo potvrđuje da je znanje o ovoj skupini, iako poprilično veliko i značajno, puno manje nego znanje o kralježnjacima. Međutim, slatkovodni beskrležnjaci nisu s pravom zanemareni jer imaju jako važnu ulogu u normalnom funkcioniranju slatkovodnih ekosustava (Strayer 2006).

### **1.3. Uloga deseteronožnih rakova u slatkovodnim ekosustavima**

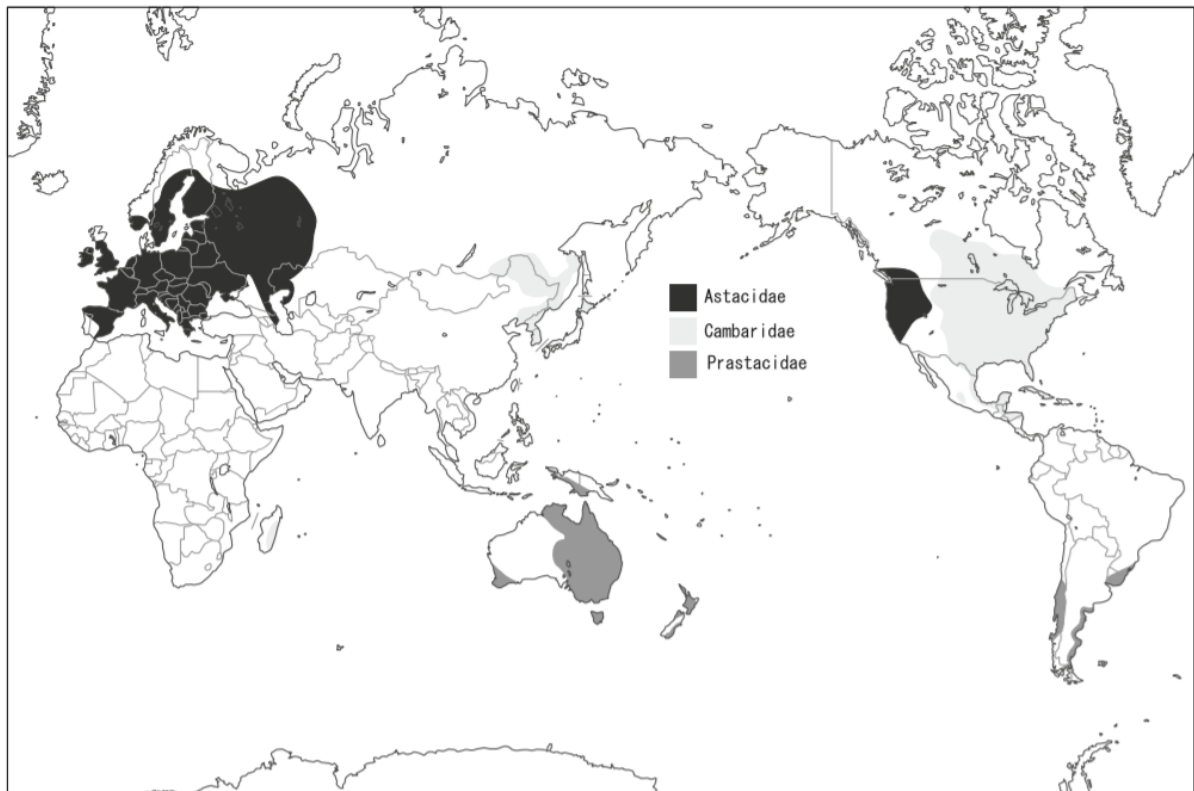
Deseteronožni slatkovodni rakovi su među najvećim pridnenim beskrležnjacima u slatkovodnim ekosustavima (Reynolds i sur. 2013, Richman i sur. 2015). Cijeli životni vijek provode u istom staništu bez mogućnosti većih migracija za razliku od primjerice nekih slatkovodnih kukaca. Osim što su puno veći od ostalih vrsta pridnenih beskrležnjaka, žive duže od većine njih (Reynolds i sur. 2013). Često zauzimaju više trofičkih razina te mogu biti i predatori i biljojedi i detritivori, ali su i sami hrana mnogim vodenim i kopnenim životinjama. Zbog toga su bitni za održavanje trofičke ravnoteže i ključni su organizmi u hranidbenim mrežama slatkovodnih ekosustava (Parkyn i sur. 2001, Maguire 2010, Reynolds i sur. 2013).

Oni su indikatorske vrste jer mogu pokazati kvalitetu vode nekog staništa te su bioindikatorske vrste zato što ukazuju na bioraznolikost staništa. Prateći trend njihovih populacija mogu se donositi zaključci o promjenama u populacijama drugih vrsta. Zbog toga mogu biti i krovne vrste čijom bi se zaštitom očuvao i veliki broj drugih vrsta koje dijele isto područje (Reynolds i sur. 2013). Nazivaju ih i "inženjerima" ekosustava jer svojim pokretima i hranidbenim aktivnostima utječu na akumulaciju i eroziju sedimenta čime mogu direktno utjecati na populacije i strukturu zajednica bentosa kao i na preživljavanje jajašaca riba (Statzner i Fievet 2000). Na kraju su i jedne od rijetkih vrsta beskraljeznjaka koje se mogu smatrati istinskim karizmatičnim vrstama jer u isto vrijeme privlače pozornost i interes ljudi i imaju veliku ekološku važnost (Reynolds i sur. 2013).

Iako su jako bitni za staništa u kojima žive, slatkovodni deseteronožni rakovi imaju veliki invazivni potencijal. Imaju iznimnu fiziološku, reproduktivnu i bihevioralnu plastičnost. Veliki broj vrsta može tolerirati suboptimalne koncentracije kisika i povišeni salinitet, a kod nekih je prisutna pojava isključivo ženskih klonova kao i međuspolova. Sve navedeno može uvelike pomoći u daljnjem širenju nekih vrsta ukoliko se prenesu izvan prostora svoje prirodne rasprostranjenosti (Reynolds i sur. 2013).

#### **1.4. Slatkovodni rakovi infrareda Astacidea**

Prema klasifikaciji Crandalla i De Gravea (2017) u infraredu Astacidea postoji 659 vrsta slatkovodnih deseteronožnih rakova (682 uključujući podvrste) koje su raspoređene u dvije natporodice: Astacoidea (porodice Astacidae, Cambaridae i Cambaroididae) i Parastacoidea (porodica Parastacidae). Rasprostranjeni su uglavnom u umjerenim širinama sjeverne i južne polutke, a sežu do tropa jedino u Sjevernoj Americi, na Madagaskaru i u Australoaziji (Reynolds i sur. 2013). Centri raznolikosti su im u sjeveroistočnom dijelu Apalači gorja na sjevernoj polutci i u jugoistočnoj Australiji na južnoj polutci (Crandall i Buhay 2008). Natporodica Astacoidea rasprostranjena je na sjevernoj polutci (Azija, Europa i Sjeverna Amerika), a Parastacoidea na južnoj (Madagaskar, Južna Amerika, Australija) (Slika 1).



**Slika 1.** Rasprostranjenost autohtonih vrsta slatkovodnih deseteronožnih rakova (preuzeto iz Kawai i Crandall 2016)

#### 1.4.1. Slatkovodni rakovi infrareda Astacidea u Hrvatskoj

Na području Hrvatske su prisutne četiri autohtone vrste slatkovodnih deseteronožnih rakova porodice Astacidae. To su: riječni rak *Astacus astacus* Linnaeus, 1758, potočni rak *Austropotamobius torrentium* Schrank, 1803, uskoškari rak *Pontastacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823 i bjelonogi rak *Austropotamobius pallipes* Lereboullet, 1858. Osim autohtonih vrsta, prisutne su i alohtone vrste porijeklom iz Sjeverne Amerike. Jedna vrsta iz porodice Astacidae - signalni rak *Pacifastacus leniusculus* Dana, 1852 i dvije vrste iz porodice Cambaridae: bodljobrati rak *Faxonius limosus* Rafinesque, 1817 i mramorni rak *Procambarus virginalis* Lyko, 2017 (Maguire i sur. 2018, Žganec i sur. 2020).

#### 1.5. Modelni organizam - mramorni rak

Mramorni rak je neobična i evolucijski mlada vrsta. Karakteriziraju ga autoploidija i obavezna partenogeneza što je tipično za biljke, ali jako rijetko u životinjskom svijetu. Moguće

je da se kao vrsta odvojio tek prije tridesetak godina, a njegovo porijeklo je dugo vremena bilo nepoznato znanstvenicima (Vogt i sur. 2015).

### **1.5.1. Porijeklo mramornog raka**

Martin i suradnici (2010) su ustanovili da mramorni rak potječe od sjevernoameričke vrste *Procambarus fallax* Hagen, 1870, ali pošto se partenogeneza ne uklapa u klasičnu teoriju specijacije, predložili su da se mramorni rak taksonomski ne gleda kao odvojena vrsta ili podvrsta već kao partenogenetski oblik vrste *Procambarus fallax* i da mu znanstveno ime bude *Procambarus fallax* Hagen, 1870 forma *virginalis*. Međutim, ovaj naziv nije u skladu s pravilima ICZN-a (engl. *International Code of Zoological Nomenclature*) te su naveli da ga se može ustanoviti kao novu vrstu ukoliko se bude uklapao u koncept vrsta kojeg su donijeli Birky i Barraclough (2009) za organizme koji se razmnožavaju nespolno (engl. *Evolutionary Genetic Species Concept*).

Istraživanje Vogta i suradnika (2015) pokazalo je da je mramorni rak reproduktivno izoliran od vrste *P. fallax*, da postoje značajne genomičke i epigenetičke razlike između te dvije vrste te da mramorni rak ima značajno veću stopu rasta i fekunditeta (drugačije značajke životnog ciklusa). Rezultati su također pokazali da ima jedinstveno porijeklo, da se sve populacije, bez obzira na rasprostranjenost, mogu uklopiti u isti klaster s obzirom na fenotipska, genotipska i epigenetska obilježja i da su geografski izolirane od prirodnog staništa vrste *P. fallax*. Ovi podaci upućuju na visoke šanse za odvojenu evoluciju ove dvije vrste u budućnosti te potvrđuju da se mramorni rak uklapa u koncept vrsta za organizme koji se nespolno razmnožavaju. Vogt i suradnici (2015) su zato predložili su da se mramorni rak gleda kao zasebna vrsta koja je potekla od vrste *P. fallax*. Na kraju je i odvojen kao takav (Lyko, 2017), a znanstveni naziv mu je *Procambarus virginalis*. To ga čini jedinom vrstom od 15000 vrsta u redu deseteronožnih rakova (Decapoda) koja se razmnožava isključivo partenogenetski (Vogt 2020).

### **1.5.2. Biologija mramornog raka**

Naziv mramorni rak, vrsta je dobila zbog karakterističnog uzorka obojenja karapaksa koji podsjeća na mramor (Slika 2) (Hossain i sur. 2018). Životni ciklus mramornog raka se sastoji od embrionalnog, juvenilnog i odraslog stadija (Seitz i sur. 2005). Juvenilni uključuje otprilike 15 stadija između kojih se jedinka presvlači, a odrasli period započinje razmnožavanjem i karakteriziraju ga faze reprodukcije i rasta između kojih se jedinka presvlači. Mramorni rak,

kao i ostale vrste deseteronožnih rakova ne raste kontinuirano, već prilikom presvlačenja (Vogt 2020). U povoljnim uvjetima mogu doseći dužinu od 12 cm (od vrha rostruma do kraja telzona), ali većina odraslih ostane znatno manja (Vogt i sur. 2004) te su obično dugački od 3 do 10 cm (Scholtz i sur. 2003). Prirast dužine i težine ovisi o temperaturi (Jones i sur. 2009), pri čemu je temperaturni optimum vrste u rasponu 18-25°C. Maksimalan rast ostvaruju pri 25°C, a stopa smrtnosti je najmanja pri 20°C i uvjetima kratkog dana. Mogu izdržati temperature niže od 8°C i veće od 30°C nekoliko mjeseci, ali se stopa smrtnosti povećava u takvim uvjetima, a reprodukcija prestaje (Vogt i sur. 2004). Veselý i suradnici (2015) su dokazali da mramorni rakovi mogu izdržati vrlo niske temperature od 2 do 3°C oko tri mjeseca. To im je omogućilo uspostavljanje populacija u lentičkim ekosustavima umjerenog klimatskog pojasa i olakšalo širenje u Europi gdje su postali ozbiljna prijetnja slatkovodnim ekosustavima. Dobro toleriraju i sušne uvjete te mogu preživjeti ukopani u blatu bez površinske vode, a zabilježeno je da na kopnu bez vode mogu preživjeti 3 dana (Jones i sur. 2009).



**Slika 2.** Mramorni rak

Scholtz i suradnici (2003) su pokazali da se mramorni rak razmnožava partenogenezom što znači da se potomci razvijaju iz neoplođene jajne stanice, a Martin i suradnici (2007) utvrdili su da se radi o apomiktičkoj partenogenezi jer jajna stanica ne prolazi kroz proces mejoze. Rezultat ovakvog razmnožavanja su potomci koji su genetički u potpunosti identični klonovi majke. Pošto je partenogeneza usko povezana s poliploidijom, Martin i suradnici (2015) su otkrili da je ova vrsta triploidna, odnosno da ima tri seta kromosoma.

Mramorni rakovi sazrijevaju ranije i pri manjoj veličini tijela u usporedbi s većinom drugih vrsta europskih deseteronožnih slatkovodnih rakova, već u prvoj godini života, između 141. i



255. dana (Seitz i sur. 2005). Optimalan fotoperiod za razmnožavanje odgovara uvjetima kratkoga dana – 6 sati svjetla i 18 sati mraka. U jako povoljnim uvjetima mogu se razmnožavati kroz cijelu godinu s razmacima između razmnožavanja od samo 8–9 tjedana. Žive 3 do 4 godine, a broj jaja se povećava s godinama i povećanjem veličine tijela ženke (Vogt i sur. 2004). Broj jajašaca može iznositi od 50 do 700 u jednom leglu (Hossain i sur. 2018), ali većina manjih jedinki liježe između 50 i 150 jajašaca (Vogt i sur. 2004). Imaju manji promjer jajašaca, kraći period do izlijeganja i veći broj potomaka u usporedbi s većinom europskih vrsta (Seitz i sur. 2005). Sve navedeno, uz partenogenetski način razmnožavanja, upućuje na to da su mramorni rakovi vrste r-selekcije (Seitz i sur. 2005) dok je većina autohtonih vrsta rakova uglavnom k-selekcije (imaju nižu stopu rasta, manji broj potomaka, kasnije postižu spolnu zrelost i duže žive) (Chucholl 2012).

Istraživanje Liptaka i suradnika (2019) daje prvi uvid u trofičku ekologiju mramornog raka u slatkovodnim lentičkim ekosustavima. Kao najbitniji izvor hrane za njega su se pokazale alge i detritus, a zoobentos i makrofiti kao manje bitni. Također navode da je mramorni rak bitan izvor hrane za ribe koje su predatori na vrhu hranidbenog lanca, a manje bitan za ribe koje su svejedi. Imaju bitnu ulogu u ekosustavu jer mogu koristiti energiju sa samog dna hranidbenog lanca i prenositi je na više trofičke razine. Mogućnost prehrane na različitim trofičkim razinama omogućuje mramornom raku lakšu prilagodbu novim staništima (Liptak i sur. 2019).

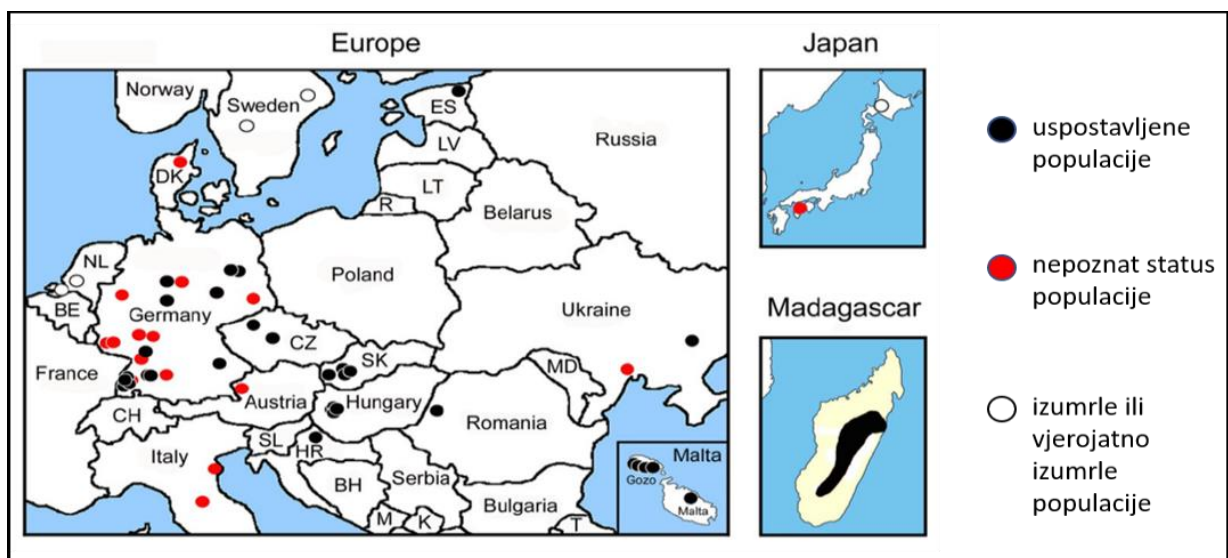
Zbog svih karakteristika navedenih ranije u tekstu (visoka tolerancija na promjene u okolišu, raznovrsna prehrana, rano spolno sazrijevanje, kratko generacijsko vrijeme, visoki fekunditet), ali prvenstveno zbog načina razmnožavanja (dovoljna samo jedna jedinka za uspostavu cijele nove populacije) (Scholtz i sur. 2003), mramorni rak se danas navodi kao invazivna strana vrsta i predstavlja veliku prijetnju slatkovodnim ekosustavima i autohtonim vrstama rakova. Uz navedene karakteristike, mramorni rak je potencijalni prijenosnik bolesti račje kuge na koju je otporan (Chucholl 2015), za razliku od europskih autohtonih vrsta rakova (Makkonen i sur. 2012). Sukladno navedenome, mramorni rak je uvršten na popis invazivnih stranih vrsta koje izazivaju zabrinutost u Europskoj uniji (tzv. "Unijin popis"). Ovaj popis je dio Uredbe EU br. 1143/2014 Europskog parlamenta koja je prenesena u nacionalno zakonodavstvo Republike Hrvatske (Zakon o sprječavanju unošenja i širenja stranih te invazivnih stranih vrsta i upravljanju njima NN 15/18, 14/19). Vrste s liste se ne smiju namjerno unositi na područje Unije, držati, uzgajati, prevoziti u, iz ili unutar Unije, stavljati na tržište, upotrebljavati ili razmjenjivati, razmnožavati, uzgajati ili puštati u okoliš. Potrebno je ishoditi dozvole za njihovo držanje, te zemlje članice moraju za vrste s popisa osigurati mjere za rano otkrivanje i

provođenje hitnih mjera za kontrolu širenja, te mjere učinkovitog upravljanja uspostavljenim populacijama kako bi se kontroliralo i usporilo njihovo daljnje širenje (MINGOR 2020).

Zbog svih karakteristika koje ga čine uspješnom invazivnom vrstom, mramorni rak se također pokazao i kao iznimno dobar i važan modelni organizam u različitim disciplinama biologije (Vogt i sur. 2004, Hossain i sur. 2018, Vogt 2020). Upravo zato što je riječ o invazivnoj stranoj vrsti koja se lako uzgaja, ima visoki fekunditet, kratko generacijsko vrijeme, te partenogenetski način razmnožavanja, mramorni rak je izabran kao modelni organizam u ovom istraživanju.

### 1.5.3. Rasprostranjenost mramornog raka u Europi i svijetu

Mramorni rak je prvi put zabilježen 1995. godine u Njemačkoj kao akvaristička vrsta i ubrzo je postao vrlo popularan među uzgajivačima. Širio se po Njemačkoj prodajom u akvaristici i kao kućni ljubimac (Vogt 2020). Zbog svog nespornog načina razmnožavanja, jedinke se vrlo brzo i lako namnože u akvarijima, a to često dovodi do njihove prodaje ili puštanja u divljinu. U kasnim 1990-ima su se proširili iz Njemačke diljem svijeta, te su do danas zabilježene uspostavljene populacije mramornog raka u prirodi u 14 europskih zemalja, na Madagaskaru i u Japanu (Slika 3) (Vogt 2020).



**Slika 3.** Nalazi mramornog raka u prirodi (od 13.8.2019.) (prilagođeno prema Vogt 2020)

Mramorni rak je postao jedna od najopasnijih vrsta invazivnih stranih vrsta slatkovodnih rakova zbog toga što se lako razmnožava (dovoljna je samo jedna jedinka za uspostavu nove populacije na novom području) i jer je prijenosnik bolesti račje kuge (Patoka i sur. 2016). S obzirom na to da se unatoč genetskoj uniformnosti uspješno prilagodio različitim staništima, od tropskih do

umjereno hladnih (Vogt 2020) i da je uspješan u kompeticiji s drugim invazivnim stranim vrstama rakova s kojima ulazi u agonističke interakcije, čak iako su te vrste veće (Jimenez i Faulkes 2010, Hossain i sur. 2019a, Vogt 2020), očekuje se daljnje povećanje areala ove vrste (Veselý i sur. 2015, Patoka i sur. 2016).

Mramorni rak je prvi put zabilježen u Hrvatskoj 2013. godine u jezeru Šoderica blizu Koprivnice, kamo je najvjerojatnije unesen namjernim puštanjem (Samardžić i sur. 2014, Dobrović i sur. 2021). Za sada je to jedina lokacija u Hrvatskoj na kojoj je vrsta pronađena, ali budući da je jezero udaljeno od rijeke Drave samo 400 metara, postoji velika opasnost za njeno daljnje širenje (Samardžić i sur. 2014).

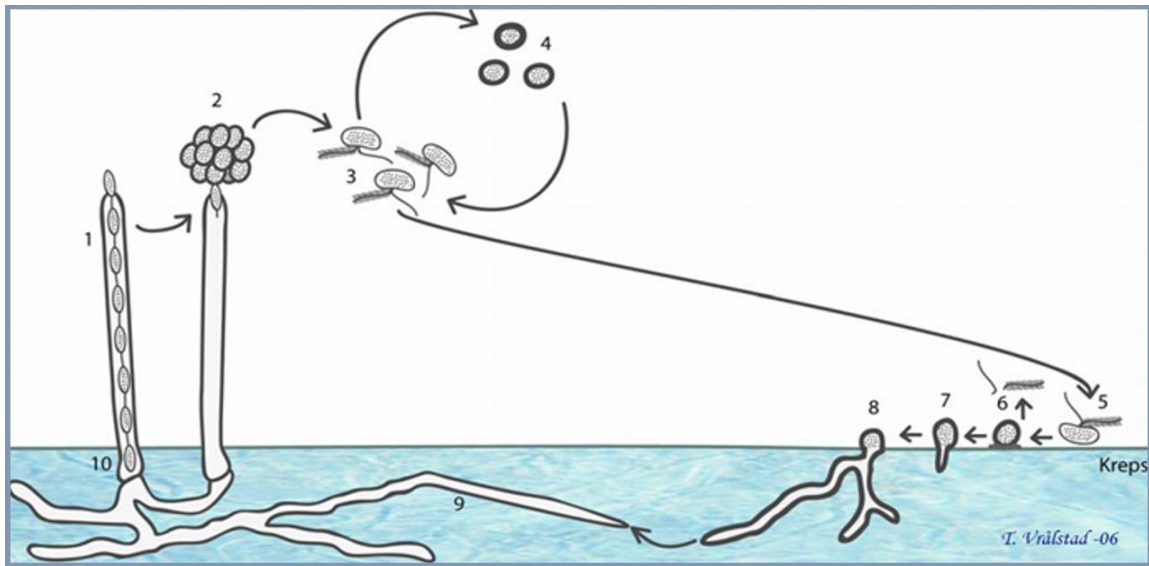
## **1.6. Račja kuga**

Račju kugu uzrokuje patogen *Aphanomyces astaci* koji spada u razred Oomycetes (red Saprolegniales), skupinu organizama koji se nazivaju vodene plijesni (Vrålstad i sur. 2011). To je obligatni parazit na slatkovodnim rakovima koji je ko-evoluirao sa sjevernoameričkim vrstama slatkovodnih deseteronožnih rakova. Kao rezultat toga, oni uglavnom žive u uravnoteženom odnosu iako zaraza u određenim uvjetima može negativno utjecati na njih (Svoboda i sur. 2016). S druge strane, *A. astaci* je jedan od najopasnijih patogena u europskim slatkovodnim ekosustavima (Jussila i sur. 2014) jer kod europskih autohtonih vrsta rakova, koje su jako podložne zarazi, izaziva smrtonosnu bolest račju kugu (Maguire i sur. 2016).

### **1.6.1. Životni ciklus patogena *Aphanomyces astaci***

*A. astaci* ima nespolni način razmnožavanja koji je prilagodba na parazitski način života. Nakon što vegetativne hife, koje rastu u tijelu raka domaćina, izbiju iz kutikule i dođu u kontakt s vodom započinje sporulacija novih spora u sporangijima (Slika 4-1). Te primarne spore izlaze kroz vrh hife, pretvaraju se u ciste i formiraju kuglaste nakupine (Slika 4-2). Iz svake ciste izlazi sekundarna zoospora koja pomoću dva biča pliva u vodi tražeći novog domaćina (Slika 4-3). Ukoliko ne nađe domaćina dolazi do RZE ciklusa (Repeated zoospore emergence) što je još jedna prilagodba na parazitski način života. Zoospora se pretvara u cistu koja će se pak opet pretvoriti u novu zoosporu (Slika 4-4 i Slika 4-3). Ovaj ciklus omogućuje *A. astaci* potragu za domaćinom do tri puta. Kada zoospora pronađe odgovarajućeg domaćina pretvara se u cistu koja proklije (Slika 4-7) te njene hife prodiru u kutikulu (Slika 4-8) i micelij se širi unutar raka i uzrokuje bolest račju kugu (Slika 4-9) (Cerenius i Söderhäll 1984). U kasnijem stadiju bolesti

ili nakon uginuća raka dolazi do nove produkcije sporangija (Slika 4-10) (Oidtmann i sur. 2002).



**Slika 4.** Životni ciklus *A. astaci*. Iz sporangija (1) izlaze primarne zoospore i pretvaraju se u ciste (2). Iz cista izlaze zoospore (3), koje se ako ne nađu domaćina pretvaraju u ciste, a potom opet u zoospore (4), a ako ga pronadu (5) prelaze u cistu (6). Cista klija (7) i prodire u kutikulu raka (8) te se micelij širi u unutrašnjosti domaćina (9). Neposredno prije ili nakon smrti raka, hife izbijaju izvan tijela domaćina i dolazi do nove sporulacije (10) (preuzeto iz Vrålstad i sur. 2006).

Vidljivi znakovi infekcije kod sjevernoameričkih vrsta mogu uključivati pojavu melanizacije iako ju mogu izazvati i drugi uzroci i nije pouzdan pokazatelj da se radi o infekciji patogenom *A. astaci*. Kod vrsta koje su podložne račjoj kugi tijekom infekcije može doći do promjena u ponašanju: jedinke su aktivne preko dana i izlaze iz svojih skrovišta, imaju smanjen refleks za bijeg i progresivnu paralizu, te često ne mogu uspravno stajati (OIE 2019).

### 1.6.2. Obrana rakova od račje kuge

Hemociti su ključni u imunosnoj obrani kod rakova. Proizvodi ih hematopoetsko tkivo smješteno u dorzalnog i/ili dorzolateralnog dijelu želuca i u očnoj arteriji (Söderhäll 2016), a s obzirom na prisutnost granula u citoplazmi dijele se na hijaline, semigranularne i granularne hemocite. Svi tipovi hemocita sudjeluju u staničnoj obrani kod rakova. Hijalini hemociti su uglavnom odgovorni za fagocitozu, semigranularni za aktivaciju enkapsulacije, a granularni za aktivaciju sustava profenoloksidaze (proPO) i citotoksičnost (Johansson i sur. 2000).

Aktivacijom proPO sustava nizom kaskadnih reakcija dolazi do aktivacije katalitički neaktivne profenoloksidaze u enzimatski aktivnu fenoloksidazu koja je odgovorna za melanizaciju hifa (Söderhäll i Cerenius 1998). Kod sjevernoameričkih vrsta koje su otporne na račju kugu proPO sustav je uvijek aktiviran, a parazit *A. astaci* je otporan na produkte koji nastaju aktivnošću fenoloksidaze. Zbog toga parazit ne može dovoljno narasti i razviti micelij, a domaćin ne može ubiti parazita toksičnim tvarima te su oni u svojevrsnoj ravnoteži (Cerenius i sur. 2003). Tu ravnotežu može narušiti bilo kakav dodatni stres kod već zaraženog raka, npr. ozljeda ili zaražavanje drugim patogenom, te zbog oslabljenog imunosnog sustava rak može razviti račju kugu i uginuti (Söderhäll i Cerenius 1992, Diéguez-Uribeondo i Söderhäll 1993, Svoboda i sur. 2016). Kod vrsta koje su podložne zarazi proPO sustav se aktivira tek u prisutnosti patogena i ne postoji ravnoteža između napada patogena i obrane domaćina te se hife parazita samo djelomično melaniziraju. Unutar nekoliko dana dolazi do značajnog rasta hifa koje se šire domaćinom i on obično podlegne infekciji (Cerenius i sur. 2003).

Utvrđeno je da postoji pet grupa genotipova kod *A. astaci*: A, B, C, D i E (Minardi i sur. 2019). Genotip A je prvotno izoliran iz europske vrste *A. astacus*. Pretpostavlja se da je to genotip koji je prvi unesen u Europu oko 1860-ih. Genotip B (PsI) i genotip C (PsII) su izolirani iz vrste *P. leniusculus* (Huang i sur. 1994, Viljamaa-Dirks i sur. 2013). U genotip D (Pc) spadaju sojevi koji su izolirani iz vrste *Procambarus clarkii* Girard, 1852 i on je prilagođeniji toplijim uvjetima u odnosu na genotipove A, B i C (Diéguez-Uribeondo i sur. 1995). Genotip E (Or) predstavlja sojeve izolirane iz vrste *F. limosus* (Kozubíková i sur. 2011). Mramorni rak nema specifični soj *A. astaci* čiji je nositelj, ali je potvrđeno da je domaćin genotipa D (Pc) – originalno izoliranog kod vrste *P. clarkii* (Keller i sur. 2014).

## 1.7. Ciljevi istraživanja

U ovom istraživanju cilj je bio vidjeti kako će zaražavanje subletalnim koncentracijama patogena *A. astaci*, uzročnikom bolesti račje kuge, utjecati na rast (prirast dužine i težine), te hoće li uzastopno zaražavanje uzrokovati smrtnost juvenilnih jedinki mramornog raka *P. virginalis* u laboratorijskim uvjetima. To je postignuto kroz dvije faze:

1. Određivanjem optimalnih radnih koncentracija te praćenjem utjecaja zaražavanja različitim koncentracijama spora račje kuge na preživljavanje juvenilnih jedinki mramornog raka. U ovoj su fazi određene dvije optimalne koncentracije za daljnja zaražavanja (niža i viša koncentracija).
2. Izlaganjem rakova odabranim koncentracijama patogena određenih pod (1), te usporedbom mortaliteta te prirasta dužine i težine između zaraženih skupina i kontrolne skupine koja nije bila izložena patogenu.

Hipoteze:

1. Zaraza će značajno smanjiti prirast dužine i težine zaraženih naspram kontrolnih jedinki.
2. Različite doze tj., koncentracije zoospora različito će utjecati na prirast dužine i težine i na mortalitet.

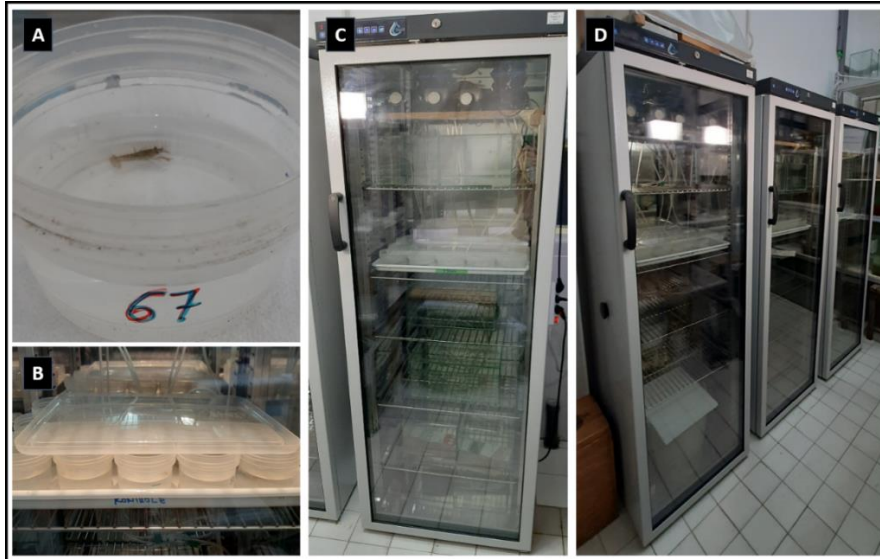
## 2. MATERIJALI I METODE

Za potrebe istraživanja jedinke mramornih rakova su ulovljene na terenu u jezeru Šoderica u Koprivničko-križevačkoj županiji (GPS koordinate: N 46°14'12.6" E 16°54'49.8") gdje postoji uspostavljena populacija ove vrste u prirodi (Samardžić i sur. 2014; Dobrović i sur. 2021). Jedinke su prenesene u laboratorij, a za njihovo držanje ishođena je dozvola tadašnjeg Ministarstva zaštite okoliša i energetike, danas Ministarstvo gospodarstva i održivog razvoja (broj dopuštenja; KLASA: UP/I-612-07/19-43/01, URBROJ: 517-05-1-1-20-6, 10. veljače 2020.).

### 2.1. Uzgoj ulovljenih rakova u laboratorijskim uvjetima

Juvenilne jedinke mramornih rakova korištene u istraživanju su prikupljene sa ženke koja je iz jezera Šoderice prenesena u laboratorij. Svaka juvenilna jedinka je stavljena u plastičnu posudu označenu brojem (Slika 5-A) u 100 ml vode, a u svaku posudu je stavljena pumpa za zrak te su sve prekrivene poklopcem kako bi se spriječila evaporacija vode. Sve jedinke su stavljene u termokabinet (ST 6 COMF, Poljska) na temperaturu od 20°C (Slika 5-B i C). Ova je temperatura izabrana jer je unutar temperaturnog optimuma vrste, a u literaturi navedena kao temperatura pri kojoj je mortalitet jedinki najniži (Vogt i sur. 2004). Kako bi se izbjegla kontaminacija između različitih eksperimentalnih skupina, jedinke koje su zaražavane patogenom *A. astaci* držane su u jednom termokabinetu, a kontrolne jedinke u druga dva termokabineta (Slika 5-D).

Jedinke su držane u termokabinetima tri tjedna prije početka samog eksperimenta te su bile adaptirane na laboratorijske uvjete. Zajedno s mag. oecol. Anom Dobrović i doc. dr. sc. Sandrom Hudina sam svim jedinkama mijenjala vodu jednom tjedno i hranila ih dva puta tjedno istom količinom hrane – 1 perlica JBL NovoPrawn hrana za manje škampe. U ovim sam aktivnostima sudjelovala koliko god su epidemiološke prilike vezane uz COVID-19 pandemiju dopuštale boravak studenata u laboratorijima.



**Slika 5.** Držanje rakova u laboratoriju: A – posuda s rakom, B – posude u termokabinetu s poklopcem, C – termokabinet, D – odvojeni termokabineti za zaražene rakove i kontrole.

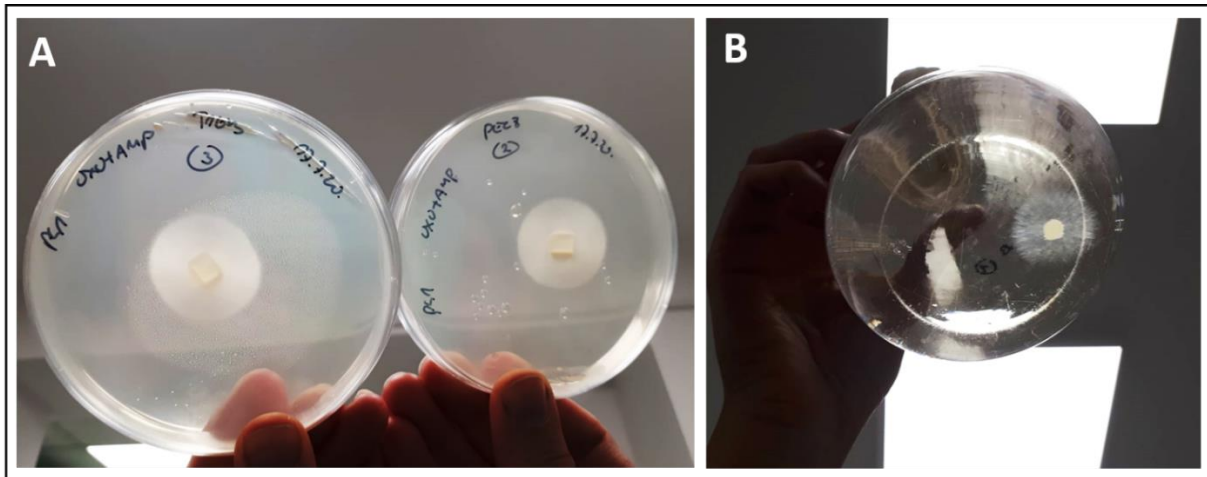
## 2.2. Produkcija zoospora patogena *A. astaci*

*A. astaci* izolat PEC8, soj B, PsI genotip je dobiven od suradnika u Francuskoj, prof. dr. sc. Frédérica Grandjeana, a uzgojen je na PG-1 krutoj i tekućoj hranjivoj podlozi (Unestam, 1965) u koje su dodani antibiotici oksolinska kiselina (SIGMA 0-00877) i ampicilin (SIGMA A 9518) koncentracije 10 mg/l, kako bi se spriječio rast bakterija.

Produkciju zoospora sam radila prema protokolu Makkonen i suradnika (2012) uz pomoć mag. oecol. Ane Dobrović. Nakon što sam pripremila tekući PG-1 medij, razdijelila sam ga u 12 Erlenmeyerovih tikvica volumena 300 ml, po 45 ml u svaku tikvicu. Zatim sam u svaku tikvicu ubacila jedan komadić agara PG-1 s *A. astaci* hifama (Slika 6-B) veličine 4x4 mm koji sam izrezala s krute hranjive podloge (Slika 6-A) na kojoj je *A. astaci* uzgajana. Tako pripremljene tikvice zatvorila sam čepom od vate i ostavila na temperaturi od 18°C jedan tjedan. Nakon tjedan dana sam prebacila micelij na sterilnu petrijevu zdjelicu, uklonila agar s kojim je micelij rastao, a micelij izrezala sterilnim skalpelom na manje komadiće. Izrezanu biomasu sam podijelila na 4 podjednaka dijela i svaki dio stavila u zasebnu Erlenmeyer-ovu tikvicu volumena 300 ml u kojoj se nalazilo 50 ml novo pripremljenog tekućeg PG-1 medija. Tikvice sam zatvorila čepom od vate i ostavila 3 dana na temperaturi od 18°C. Nakon ta tri dana sam uklonila PG-1 tekući medij procjeđivanjem sadržaja tikvice kroz sterilizirani lijevak s gazom. Produkcija zoospora je inducirana tako što sam hife 4 puta isprala sa 600 ml autoklavirane



svježe okolišne vode u linearnoj tresilici po 45 minuta pri temperaturi od 18°C. Voda je sakupljena u pritoci potoka Vrapčaka, u Gornjem Vrapču u Zagrebu. Kod četvrtog ispiranja hife sam ostavila u okolišnoj vodi u linearnoj tresilici 20 sati nakon čega su se pojavile spore. Koncentraciju zoospora sam odredila pod mikroskopom pomoću Thoma komorice, a u više ponovljenih produkcija zoospora prinos je bio između 20000 i 150000 zoospora/ml.



**Slika 6.** A – uzgoj *A. astaci* na krutoj hranjivoj podlozi, B – komadić agara s *A. astaci* hifama u tekućoj hranjivoj podlozi

### **2.3. Određivanje optimalnih radnih koncentracija te praćenje utjecaja zaražavanja različitim koncentracijama spora račje kuge na preživljavanje juvenilnih jedinki mramornog raka**

Pokus sam odradila u dvije faze, a uzgoj zoospora *A. astaci* i zaražavanje su provedeni po istom protokolu u obje faze. Nakon uzgoja zoospora *A. astaci*, micelij je odstranjen pomoću lijevka s gazom, a zaražavanje rakova su radile mag. oecol. Ana Dobrović i doc. dr. sc. Sandra Hudina isti dan kada je završio uzgoj zoospora, odnosno nakon određivanja njihove koncentracije. Dobivena koncentracija je razrijeđena s vodom u omjeru koji je bio potreban da bi se dobila tražena radna koncentracija (opisane u 2.3.1 i 2.3.2.) u 100 ml vode te je voda sa zoosporama stavljena umjesto obične vodovodne vode u posudicu s rakom.

#### **2.3.1. Prva faza pokusa**

U ovoj fazi pokusa više skupina rakova (<10 jedinki) je zaražavano različitim koncentracijama zoospora (30000, 20000, 15000, 14000, 7500 i 7000 zoospora/ml) svaka 4 tjedna i u različitom

broju ponavljanja (Tablica 1). Praćenjem utjecaja zaražavanja različitim koncentracijama zoospora na preživljavanje rakova su dobiveni podaci o mortalitetu jedinki, te je određen optimalni vremenski razmak između zaražavanja i dvije optimalne koncentracije zoospora za daljnje zaražavanje. S obzirom da je cilj bio vidjeti utjecaj zaraze na rast juvenilnih jedinki, bilo je bitno odrediti koncentracije ne uzrokuju (veliki) mortalitet niti nakon uzastopnih zaražavanja jedinki i pri kojima su vidljivi znakovi bolesti, odnosno melanizacije kutikule (Slika 7).



**Slika 7.** Primjer raka s vidljivim melanizacijama (označene strelicama)

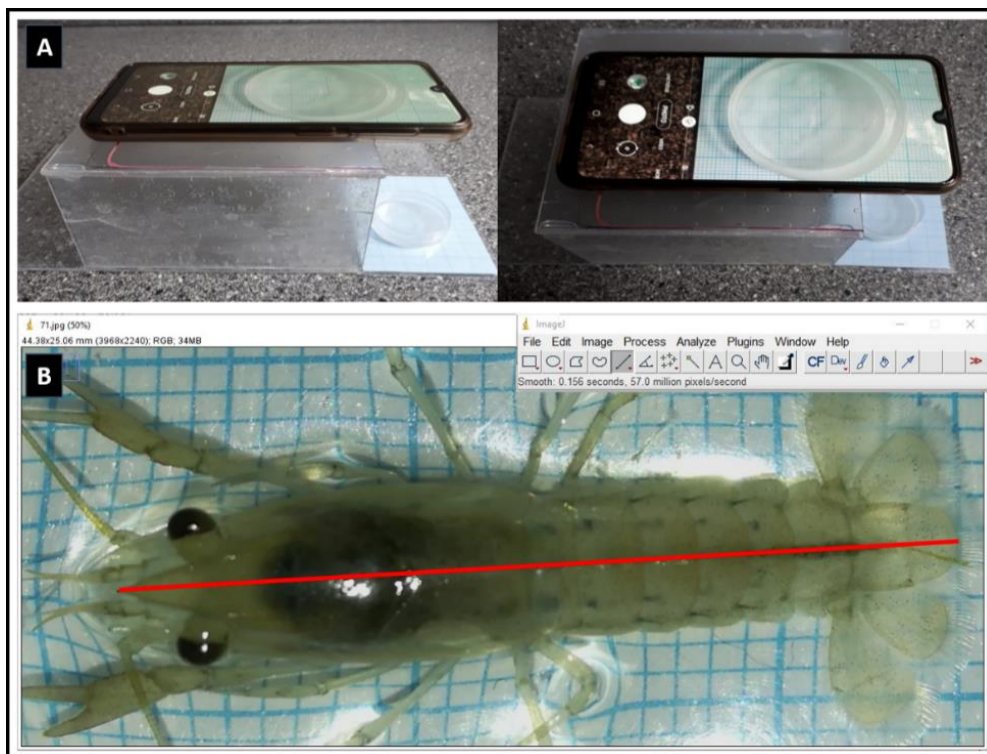
**Tablica 1.** Koncentracija zoospora, broj zaražavanja te broj zaraženih i kontrolnih jedinki po skupinama

	Koncentracija zoospora / ml	Broj zaražavanja	Broj zaražavanih jedinki	Broj kontrolnih jedinki
Skupina 1	30000	1	9	18
Skupina 2	7000	3	3	6
	14000	3	3	
	7000	1	3	6
	14000	1	3	
Skupina 3	15000	3	3	6
	30000	3	3	
	15000	1	3	12
	20000	1	3	
Skupina 4	7500	3	6	6
	15000	3	6	

### 2.3.2. Druga faza pokusa: provedba pokusa zaražavanja odabranim koncentracijama patogena i usporedba prirasta dužine i težine, te mortaliteta između zaraženih skupina i kontrolne skupine

U drugoj fazi pokusa koristila sam veći broj jedinki (20 po skupini). Eksperimentalne skupine bile su: 1) kontrolna – bez zaraze, 2) 7500 i 3) 15000. Skupine 7500 i 15000 su zaražene dva puta u razmaku od dva tjedna (poglavlje metodologije 2.3.1. i rezultat 3.1.). Skupina 7500 je zaražavana s koncentracijom od 7500 zoospora/ml, a skupina 15000 s koncentracijom od 15000 zoospora/ml.

Neposredno prije svakog zaražavanja mag. oecol. Ana Dobrović je rakove stavila u petrijevku zdjelicu ispod koje se nalazio milimetarski papir te ih fotografirala mobitelom uz pomoć izrađenog stalka koji je omogućavao slikanje s iste udaljenosti i pri istim uvjetima (Slika 8-A). Ukupnu dužinu rakova (engl. total length; TL: od vrha rostruma do kraja telzona, u mm) sam mjerila s fotografija uz pomoć programa ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) (Slika 8-B). Nakon svakog slikanja svakog raka na slici sam mjerila tri puta te sam uzela srednju vrijednost kao ukupnu dužinu tijela (TL). Postotak prirasta dužine izračunala sam po formuli:  $(TL_{\text{krajnja}} - TL_{\text{početna}}) / TL_{\text{početna}}$ .



**Slika 8.** A - oprema za slikanje rakova, B – mjerenje raka u programu ImageJ (ukupna dužina označena crvenom crtom)

Osim dužine mag. oecol. Ana Dobrović je mjerila i težinu (W). Neposredno prije vaganja svaka jedinka je nježno posušena na filter papiru kako bi se uklonio suvišak vode i izvagana je na vagi preciznosti do 0,0001 g (Slika 9). Postotak prirasta težine sam izračunala prema formuli:  $(W_{\text{krajnja}} - W_{\text{početna}}) / W_{\text{početna}}$ .

Fotografiranje i vaganje jedinki je ponavljano neposredno prije svakog zaražavanja, svaka 2 tjedna i 2 tjedna nakon zadnjeg zaražavanja, neposredno prije usmrćivanja jedinki (ukupno 3 mjerenja). Tijekom cijelog razdoblja, dva puta tjedno bilježen je i mortalitet jedinki u pokusu.



**Slika 9.** Vaganje rakova

## **2.4. Izolacija DNA**

Na kraju prve (poglavlje 2.3.1.) i druge faze (poglavlje 2.3.2), jedinke sam žrtvovala te secirala pod lupom. Uzela sam im uzorke uropoda i abdominalne kutikule iz kojih sam izolirala DNA. Uspješnost zaražavanja, tj. prisutnost uzročnika račje kuge u uzorcima DNA, sam testirala korištenjem lančane reakcije polimerazom (PCR) i provjerila elektroforezom u agaroznom gelu.

Iz uropoda i abdominalne kutikule svake jedinke sam izolirala DNA upotrebom standardnog protokola kompleta NucleoSpin® Microbial DNA (Macherey Nagel, Njemačka), uz dodatan korak. Na kraju izolacije kolonice sam isprala sa 100 µl eluata i stavila ih na centrifugiranje pri 4°C, 11000 x g / 30 sekundi s ciljem dobivanja maksimalnog prinosa DNA (Ljubelj 2017). Dva uropoda ili jedan uropod i komadić abdominalne kutikule sam stavila u epruvete za mikrocentrifugu s kuglicama tipa B i dodala odgovarajuće kemikalije prema protokolu. Zatim

sam epruvete stavila na vorteks (Vortex Mixer, Corning, USA), na srednju jačinu 30 minuta, kako bi kuglice razbile hitinsku kutikulu. Eluaciju DNA s kolonice sam napravila dodavanjem 100 µl pufera BE nakon čega sam ih stavila na centrifugiranje (centrifuga Centric 200R, Domel, Slovenija) pri 4°C, 11000 x g / 30 sekundi. Nakon toga sam sakupila eluat i ponovila prethodni korak ispiranjem kolonice sa 100 µl tog istog eluata kako bih dobila maksimalnu koncentraciju DNA. Količinu i kvalitetu izolirane DNA sam provjerila elektroforezom u agaroznom gelu.

## 2.5. PCR-test za detekciju patogena *A. astaci*

Lančana reakcija polimerazom (PCR) je metoda kojom se relativno kratki dio DNA umnožava u veliki broj identičnih kopija. Postoje tri osnovna koraka svakog PCR protokola: denaturacija DNA, specifično vezanje oligonukleotidnih početnica (eng. *primer*) na komplementarne segmente DNA te sinteza komplementarnog lanca DNA (Oidtmann i sur., 2006). U ovom istraživanju PCR sam koristila kako bih utvrdila je li u uzorcima prisutna DNA patogena *A. astaci*, a sastav reakcijske smjese za PCR naveden je u tablici 2. Ciljani dio DNA molekule koji se želi umnožiti određuje se kratkim oligonukleotidnim početnicama. U ovom slučaju sam koristila dvije specifične početnice: uzvodna (eng. *forward*) početnica 42 i nizvodna (eng. *reverse*) početnica 640 koje umnažaju ITS (eng. *Internal Transcribed Spacer*) regiju 5.8 rRNA gena patogena *A. astaci* (Oidtmann i sur., 2006).

**Tablica 2.** Sastav reakcijske smjese za PCR detekciju *A. astaci*

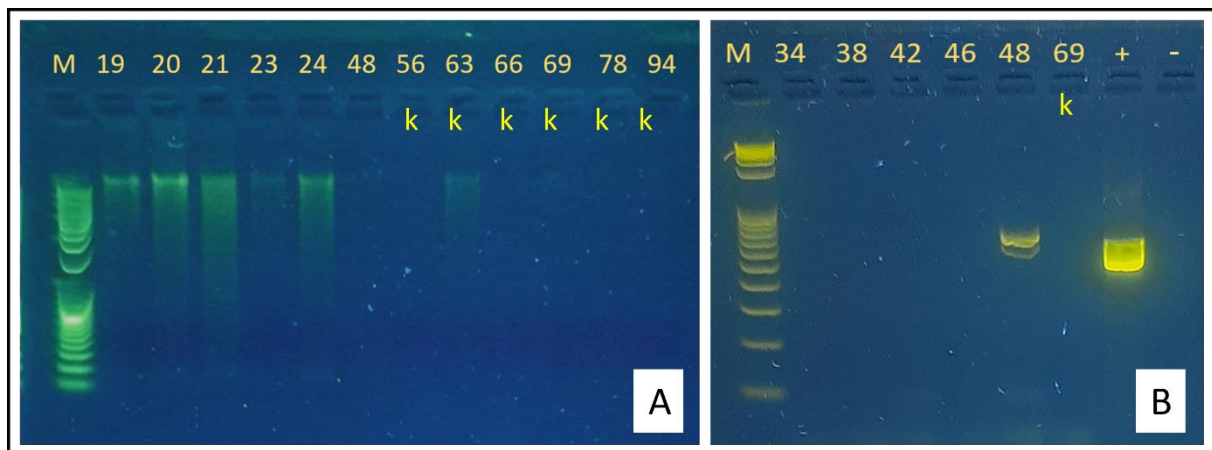
DNA kalup (genomska DNA <i>A. astaci</i> ili metagenimska DNA iz kutikule)	1 µl
2X EmeraldAmp MAX PCR MasterMix (TAKARA, Japan)	12,5 µl
10 µM uzvodna početnica 42 (konačna koncentracija 0,5 µM)	1,25 µl
10 µM nizvodna početnica 640 (konačna koncentracija 0,5 µM)	1,25 µl
Deionizirana voda	9 µl
Ukupno:	25 µl

Korišteni PCR program sastojao se od početne denaturacije DNA pri 96 °C kroz 5 min, 35 ciklusa od 1 min pri 96 °C (denaturacija), 1 min pri 61 °C (sparivanje početnica), 1 min pri 72 °C (produljivanje lanaca) te od završnog produljivanja lanaca 5 min pri 72 °C. Kao pozitivnu kontrolu sam koristila genomsku DNA *A. astaci*, a kao negativnu kontrolu destiliranu vodu koja je dodana u smjesu umjesto DNA kalupa.

Ukoliko je PCR reakcija uspjela došlo je do umnažanja ITS fragmenta dužine 569 parova baza što sam provjerila elektroforezom u agaroznom gelu.

## 2.6. Elektroforeza u agaroznom gelu

Elektroforezom u agaroznom gelu se razdvajaju molekule DNA različite veličine i oblika pod utjecajem električnog polja u kojem se DNA molekule kreću kroz agarozni gel od katode prema anodi zahvaljujući svom negativnom naboju. Manje i kompaktnije molekule kreću se brže od onih izduženih i većih. Osim o veličini i obliku, brzina kretanja ovisi i o koncentraciji agaroze u gelu, jačini napona te količini i temperaturi pufera za elektroforezu (Makovets 2013). Elektroforezom u agaroznom gelu analizirala sam uzorke metagenomske DNA (Slika 10-A) nakon izolacije kao i DNA fragmente dobivene PCR-om (Slika 10-B).



**Slika 10.** A - Primjer elektroforeze metagenomske DNA, B – Primjer rezultata PCR-testa za detekciju patogena *A. astaci* korištenjem DNA izolirane iz kutikule rakova. + označava pozitivnu kontrolu (genomska DNA patogena *A. astaci*), a - negativnu kontrolu. M – molekularni marker DirectLoad™ 50 bp DNA StepLadder, k – kontrolna jedinka.

Za analizu uzoraka metagenomske DNA dobivene izolacijom iz kutikule raka sam koristila 1%-tni agarozni gel, a za analizu DNA fragmenata dobivenih PCR-om 2%-tni. Pripremila sam ih s 80 ml pufera TAE (40 mM Tris; 20 mM octena kiselina; 1mM EDTA). U otopinu agaroze sam dodala 5 µl boje za vizualizaciju DNA (GelStar™ NucleicAcid Gel Stain 10,000X (Lonza, Švicarska)) nakon što se otopina ohladila na oko 60 °C te sam ju izlila u kadicu za elektroforezu. Prije elektroforeze uzoraka metagenomske DNA, uzorke DNA sam pomiješala s bojom za nanošenje uzoraka (MassRuler DNA Loading Dye 6x, Thermo Fisher Scientific, SAD) koja im povećava gustoću kako bi pali na dno jažica. Boja također omogućuje praćenje molekula DNA

koje se ne vide tijekom elektroforeze jer putuje prema anodi ispred molekula DNA. Pomiješala sam 2  $\mu\text{l}$  boje i 8  $\mu\text{l}$  DNA te sam 9  $\mu\text{l}$  tako pripremljene smjese pomoću pipete stavila u jažicu u gelu. Fragmente DNA dobivene PCR-om nisam miješala s bojom već sam 5  $\mu\text{l}$  uzorka stavila u jažicu. Elektroforezu za metagenomske uzorke DNA sam provela pri naponu od 100 V u puferu 1xTAE kroz 45 minuta, a za fragmente DNA dobivene PCR-om kroz 50 minuta, na aparaturi Owl Easy Cast B1 Mini Gel Electrophoresis System (Thermo scientific, SAD). Za provjeru veličine dobivenog fragmenta koristila sam molekularni marker DirectLoad™ 50 bp DNA StepLadder (Sigma-Aldrich, SAD).

## **2.7. Statistička obrada podataka**

Za statističku i grafičku obradu podataka koristila sam programe Microsoft® Excel® za Microsoft 365 MSO (Microsoft Corporation) i Statistica 13.5.0.17. (TIBCO Software Inc.).

U Excelu sam izračunala postotke prirasta duljine i težine za sve jedinice prema prethodno navedenim formulama (poglavlje 2.3.). Kako bih odabrala metode za statističku obradu podataka napravila sam testove za provjeru normalnosti distribucije podataka (Zar 2010). Vrijednosti testova su pokazale da podaci, niti nakon transformacija, ne pripadaju normalnoj raspodjeli. Zbog toga sam za usporedbu prirasta duljine i težine između eksperimentalnih skupina koristila neparametrijski Kruskal-Wallis test. Također sam napravila post-hoc testove ("multiple comparisons of mean ranks", Dunn test) kako bi se vidjelo između kojih točno eksperimentalnih skupina postoje statistički značajne razlike. U svim provedenim testovima razina značajnosti je bila 5% ( $p < 0.05$ ).

### 3. REZULTATI

#### 3.1. Utjecaj zaražavanja različitim koncentracijama spora račje kuge na preživljavanje juvenilnih jedinki mramornog raka i određivanje optimalnih radnih subletalnih koncentracija

U prvoj fazi pokusa smrtnost rakova nakon samo jednog zaražavanja koncentracijom od 30000 zoospora/ml je bila 75% (uginulo je 9 od 12 jedinki). U ostalim skupinama, koje su zaražavane drugim (manjim) koncentracijama, mortalitet jedinki nije bio zabilježen (Tablica 3). Pri koncentraciji od 30000 zoospora/ml smrtnost rakova je bila prevelika te ona nije bila pogodna za daljnje zaražavanje. Zato su odabrane dvije koncentracije – i) upola slabija od gornje letalne - 15000 zoospora/ml i ii) 75% slabija od gornje letalne - 7500 zoospora/ml. Za ove je koncentracije procijenjeno da neće uzrokovati veliku smrtnost, ali da će i dalje potencijalno imati utjecaj na rakove. Također, razmak između opetovanih zaražavanja u daljnjim je pokusima postavljen na dva tjedna, umjesto četiri tjedna.

**Tablica 3.** Mortalitet u eksperimentalnim skupinama u prvoj fazi istraživanja

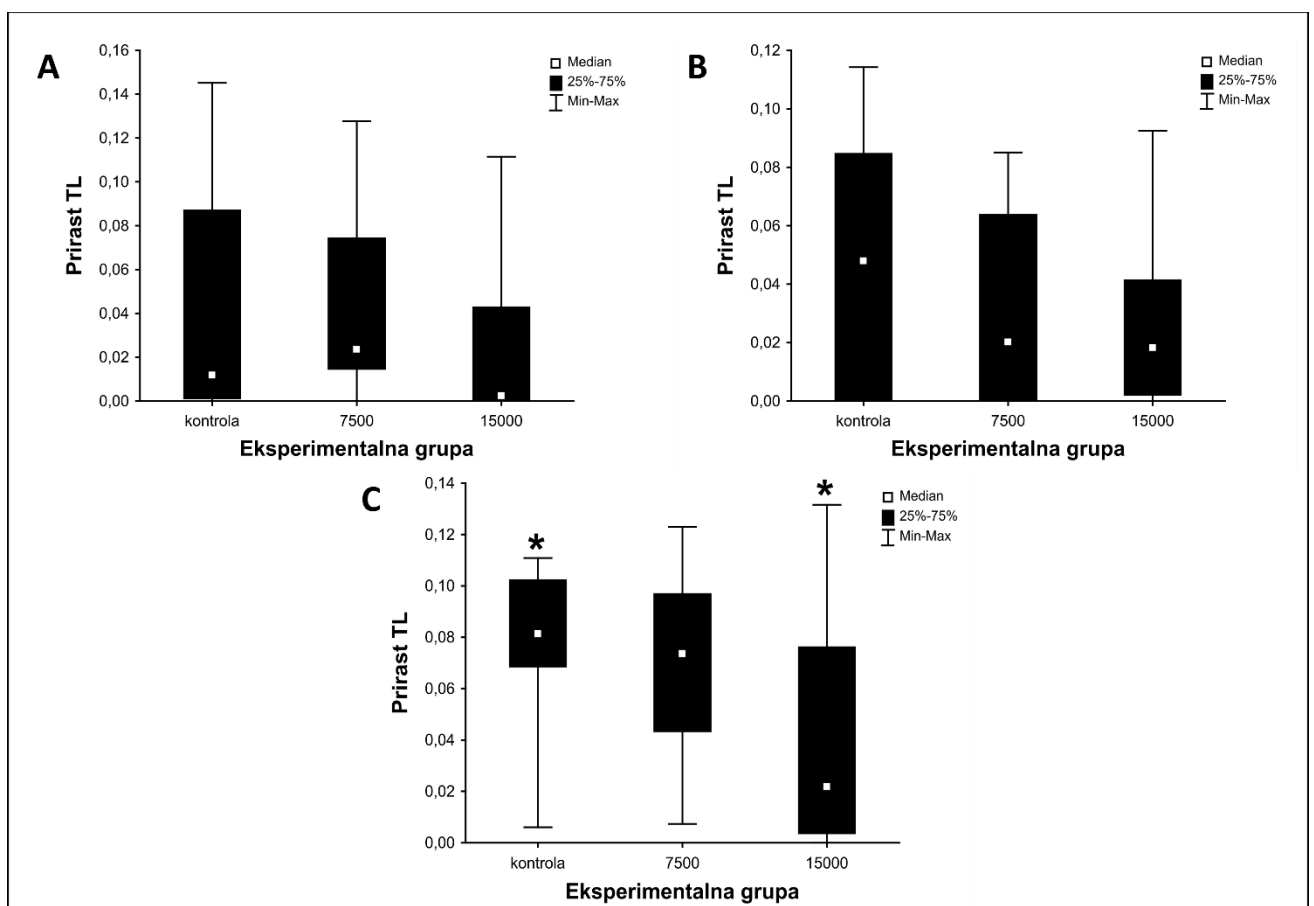
	Koncentracija zoospora / ml	Broj zaražavanja	Broj zaražavanih jedinki	Mortalitet
Skupina 1	30000	1	9	77,78%
Skupina 2	7000	3	3	0%
	14000	3	3	0%
	7000	1	3	0%
	14000	1	3	0%
Skupina 3	15000	3	3	0%
	30000	3	3	66,67%
	15000	1	3	0%
	20000	1	3	0%
Skupina 4	7500	3	6	0%
	15000	3	6	0%



### 3.2. Utjecaj zaražavanja odabranim koncentracijama patogena na mortalitet, te prirast dužine i težine

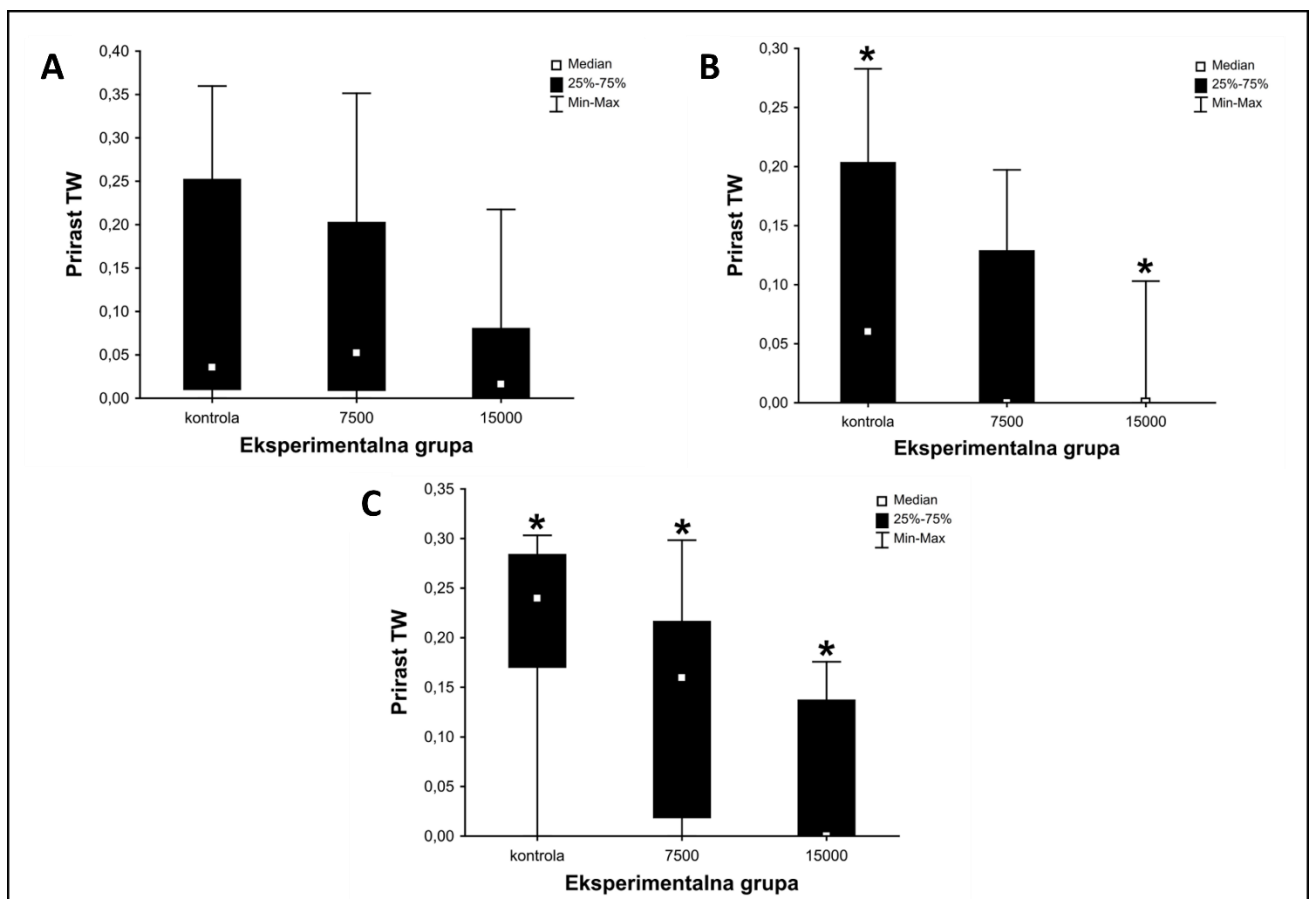
U drugoj fazi pokusa u eksperimentalnoj skupini 7500 nije uginuo niti jedan rak, a u eksperimentalnoj skupini 15000 je uginulo 4 od 20 rakova (20%).

Usporedba prirasta duljine je pokazala da ne postoje statistički značajne razlike između eksperimentalnih skupina nakon prvog zaražavanja (odnosno kod prvog i drugog mjerenja u prva dva tjedna pokusa; Kruskal- Wallis test,  $p > 0.05$  (Slika 11-A), kao ni između prvog i drugog zaražavanja (odnosno kod drugog i trećeg mjerenja u druga dva tjedna pokusa;  $p > 0.05$ ) (Slika 11-B). Kada se promatra cijelo razdoblje pokusa (4 tjedna), zabilježene su statistički značajne razlike u prirastu duljine između eksperimentalnih skupina, a post-hoc testovi su pokazali da su značajne razlike između kontrolne eksperimentalne skupine i skupine 15000 ( $H(2, 53) = 7.1590, p = 0.0279$ ) (Slika 11-C).



**Slika 11.** Rezultati Kruskal-Wallis testa koji pokazuju prirast duljine rakova: A - između prvog i drugog mjerenja, B - između drugog i trećeg mjerenja, C - između prvog i trećeg mjerenja. Statistički značajne razlike označene su zvjezdicom (\*).

Usporedba prirasta težine je pokazala da ne postoje statistički značajne razlike između eksperimentalnih skupina nakon prvog zaražavanja (odnosno između prvog i drugog mjerenja u prva dva tjedna pokusa;  $p > 0.05$ ) (Slika 12-A). Statistički značajne razlike u prirastu težine između eksperimentalnih skupina vidljive su nakon drugog zaražavanja, kod drugog i trećeg mjerenja u druga dva tjedna pokusa ( $H_{(2, 53)} = 11.7825$   $p = 0.0028$ ), a post-hoc testovi su pokazali da su značajne razlike između kontrolne skupine i skupine 15000 (Slika 12-B). Statistički značajne razlike također postoje između eksperimentalnih skupina kod prvog i trećeg mjerenja kada se promatra cijelo razdoblje pokusa (4 tjedna) ( $H_{(2, 53)} = 21.2302$   $p \gg 0.0001$ ), a post-hoc testovi su pokazali da su one značajne između kontrolne skupine i skupine 15000 te između skupine 7500 i skupine 15000 ( $p \gg 0.0001$ ) (Slika 12-C).



**Slika 12.** Rezultati Kruskal-Wallis testa koji pokazuju prirast težine rakova: A - između prvog i drugog mjerenja, B - između drugog i trećeg mjerenja, C - između prvog i trećeg. Statistički značajne razlike označene su zvjezdicom (\*).

### 3.3. Provjera prisutnosti patogena *A. astaci*

U ovoj fazi pokusa je izolirana metagenomska DNA 29 jedinki (Slika 10-A) i proveden je PCR-test za detekciju uzročnika račje kuge za 22 jedinke (Slika 10-B). Od toga je bilo pet kontrola s negativnim rezultatom PCR-testa, a rezultati za zaražene rakove prikazani su u tablici 4. Patogen je bio prisutan kod 7 od 17 zaraženih rakova (41,2 %).

**Tablica 4.** Provjera prisutnosti patogena *A. astaci*. U tablici su prikazane samo zaražene jedinke (17 od 22 ukupno testirane jedinke). ID – oznaka jedinke, z/ml x 10<sup>3</sup> - koncentracija zoospora kojom su zaražene jedinke, b. z. – broj zaražavanja, + označuje pozitivan rezultat PCR-testa, a - negativan

<b>ID</b>	23	24	26	31	34	35	38	39	42	48	103	98	99	101	43	46	104
<b>z/ml x 10<sup>3</sup></b>	30	30	30	7	7	7	14	14	14	30	30	15	15	15	20	20	20
<b>b. z.</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	1	1	1
<b>+ / -</b>	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+

U drugoj fazi istraživanja metagenomska DNA je izolirana kod svih jedinki, a provjera prisutnosti patogena *A. astaci* je napravljena PCR-testom kod svih zaraženih i deset kontrolnih jedinki. Niti jedna kontrolna jedinka nije bila zaražena patogenom. Rezultati izolacije metagenomske DNA i PCR-testa za zaražene rakove su prikazani u tablici 5, kao i vidljivi znakovi melanizacije na samim rakovima koji su znak račje kuge. Patogen nije detektiran niti kod jedne kontrolne jedinke, dok je u skupini 7500 kod 11 jedinki (55%) detektiran uzročnik račje kuge, a u skupini 15000 kod 19 jedinki (95%; Tablica 5).

**Tablica 5.** Rezultati elektroforeze nakon provedenog PCR-testa za detekciju patogena *A. astaci*. Znak "+" označava prisutnost *A. astaci* odnosno melanizacija, a "-" odsutnost.

<b>ID</b>	<b>Koncentracija (zoospore/ml)</b>	<b><i>A. astaci</i></b>	<b>Melanizacije</b>
9	7500	+	-
10	7500	+	-
11	7500	-	-
12	7500	+	-
23 N	7500	+	-
66 N	7500	-	-
91	7500	+	-
92	7500	-	-
118	7500	-	-
119	7500	+	-
117	7500	-	-
120	7500	-	-
127	7500	-	-
128	7500	+	-
129	7500	+	-
130	7500	+	-
131	7500	+	+
132	7500	-	-
147	7500	-	-
148	7500	+	-
85	15000	+	+
88	15000	+	+
93	15000	+	-
95	15000	+	+
96	15000	+	-
126	15000	+	+
133	15000	+	+
134	15000	+	-
135	15000	+	-
136	15000	+	-
1	15000	+	+
2	15000	+	-
7	15000	+	-
8	15000	+	+
35 N	15000	+	+
69 N	15000	+	-
137	15000	-	-
138	15000	+	+
145	15000	+	+
146	15000	+	-

## 4. RASPRAVA

Sposobnost organizma da stvori odgovarajući imunosni odgovor ima veliku ulogu u životnom ciklusu (Zuk i Stoehr 2002) i jedna je od najvažnijih odrednica fitnesa i reproduktivnog uspjeha mnogih vrsta (Lochmiller i Deerenberg 2000). Imunosni odgovor je energetska zahtjevan i dovodi do kompromisa (*engl.* trade-off) s ostalim značajkama životnog ciklusa, kao što su primjerice rast ili fekunditet. To znači da između ovih značajki životnog ciklusa dolazi do preraspodjele nutrijenata i energije dostupnih organizmu (Sheldon i Verhulst 1996, Lochmiller i Deerenberg 2000, Zuk i Stoehr 2002, Rantala i Roff 2005, van der Most i sur. 2011, Schwenke i sur. 2016, English i Bonsall 2019). Puno istraživanja je zabilježilo kompromise do kojih dolazi između imunosnog odgovora i različitih značajki životnog ciklusa, a većina ih se odnosi na kralježnjake (Rolff i Siva-Jothy 2003) i to uglavnom ptice (Zuk i Stoehr 2002), a kada je riječ o beskralježnjacima, najbolje su proučeni kukci (Moreno-García i sur. 2012). Pri tome većina istraživanja proučava kakav utjecaj imunosni odgovor i obrana od patogena imaju na razmnožavanje neke vrste (Stearns 1989). Za razliku od razmnožavanja, puno je manje istraživanja koja proučavaju direktnu povezanost i kompromise između imunosnog odgovora i ostalih značajki životnog ciklusa kao što je rast, posebice kada je riječ o beskralježnjacima kod kojih su istraživanja relativno malobrojna (Zuk i Stoehr 2002).

U ovom istraživanju su juvenilne jedinke mramornih rakova zaražavane PsI sojem patogena *A. astaci* čiji je nositelj signalni rak (Huang i sur. 1994). Ovo istraživanje, kao i istraživanje Boštjančić i suradnika (2021) pokazalo je kako mramorni rak može biti potencijalni vektor virulentnog genotipa B (PsI) patogena *A. astaci*, s obzirom da je u eksperimentalnom zaražavanju patogen bio prisutan i kod jedinki koje nisu pokazivale vanjske znakove infekcije (melanizacije). Zbog toga je samo pitanje vremena kada će mramorni rak, ukoliko iz jezera Šoderice dospije u Dravu, doći u kontakt sa signalnim rakom, a time i s navedenim genotipom patogena *A. astaci*, koji je upravo iz tog razloga korišten u ovom istraživanju. Također, u skladu s nedavnim istraživanjima (Boštjančić i sur., 2021), mramorni rak se pokazao kao tolerantna vrsta na sgenotip B (PsI) patogena *A. astaci*, te je značajan mortalitet zabilježen tek pri iznimno visokim koncentracijama spora (30000 spora/ml). To nije slučaj sa zavičajnim vrstama europskih rakova kod kojih proPO sustav, koji je odgovoran za melanizaciju hifa parazita *A. astaci* (Söderhäll i Cerenius 1998), postaje aktivan tek u prisutnosti patogena, te se hife parazita samo djelomično melaniziraju (Cerenius i sur. 2003). Zbog toga su ove vrste puno podložnije zarazi pa je primjerice u istraživanju Makkonen i suradnika (2014), provedenom na riječnim

rakovima, zabilježen mortalitet od 100% u svim eksperimentalnim skupinama nakon samo jednog zaražavanja genotipom B (PsI) patogena *A. astaci* u koncentracijama od 1, 10, 100 i 1000 spora/ml. Iako je mramorni rak srodan sjevernoameričkoj vrsti *P. fallax* (Martin i sur. 2010), te kao i ostale sjevernoameričke vrste ima stalno aktivni proPO sustav (Cerenius i sur. 2003), istraživanje je pokazalo kako uzastopno zaražavanje visokim koncentracijama patogena uzrokuje smrtnost manjeg postotka jedinki (4 od 20 jedinki u eksperimentalnoj skupini 15000), pri čemu su sve uginule jedinke imale pozitivan rezultat PCR-testa na prisutnost patogena *A. astaci*.

Rezultati su također potvrdili hipoteze i pokazali da je zaraza juvenilnih jedinki mramornog raka patogenom *A. astaci* značajno i negativno utjecala na prirast duljine i težine zaraženih jedinki, te da su različite doze tj. koncentracije spora različito utjecale na prirast dužine i težine i na mortalitet. To ukazuje da postoji kompromis između imunskog odgovora i prirasta duljine i težine kod ove vrste. Dobiveni rezultati sukladni su istraživanju na morskom školjkašu *Austrovenus stutchburyi* Wood, 1828 koje je pokazalo da izlaganje jedinki ove vrste parazitima negativno utječe na stopu rasta u usporedbi s kontrolnom skupinom, s time da je veći broj parazita imao i veći negativni utjecaj na stopu rasta u odnosu na manji broj parazita (O'Connell-Milne i sur. 2016). I kod kukaca često postoji kompromis između rasta i imunskog odgovora (Rantala i Roff 2005). Slično je istraživanje van Ooika i suradnika (2007) na jednoj vrsti moljca je pokazalo povećanu aktivnost imunskog sustava zbog zagađenja u okolišu, što je dovelo do smanjenja stope rasta jedinki u zagađenom okolišu u odnosu na kontrolne skupine. Također, Arnold i suradnici (2013) su zaključili da kod vinskih mušica zaraženih *Drosophila C* virusom (DCV) dolazi do smanjenog rasta jer se nutrijenti više ulažu u preživljavanje i imunski odgovor nego u rast i razmnožavanje. I dok se za ostale skupine beskralježnjaka mogu pronaći istraživanja koja su slična ovom vezanom uz mramornog raka, nisam našla slična istraživanja vezana uz rakove s kojima bih napravila usporedbu.

Utjecaj zaraze patogenom *A. astaci* na juvenilne jedinke mramornog raka vidljiv je i kod prirasta dužine i kod prirasta težine, pri čemu su jači učinci bili vidljivi na prirastu težine. U oba slučajna, eksperimentalna skupina 15000 imala je najmanji prirast. Usporedba prirasta na kraju eksperimenta pokazala je kako se prirast dužine razlikovao samo između kontrolne skupine i eksperimentalne skupine 15000, dok se prirast težine razlikovao između eksperimentalne skupine 15000 i kontrole, te eksperimentalne skupine 7500 i 15000. Mogući razlog jačeg učinka zaraze na prirast težine je taj što mramorni rakovi ne pokazuju izometrijski rast (Seitz i sur. 2005) već pozitivan alometrijski rast (Hossain i sur. 2019b). To znači da težina

jedinki ima veći prirast od njihove dužine (Hossain i sur. 2019b). Također, istraživanje je pokazalo kako koncentracija patogena ima vidljivi učinak na prirast jedinki, što je opet jasno bilo vidljivo po značajnoj razlici u prirastu težine između eksperimentalnih skupina 7500 i 15000, koji je bio statistički značajno manji kod skupine 15000. Kod prirasta duljine, manji prirast u eksperimentalnoj skupini 15000 naspram skupine 7500 također je vidljiv na kraju eksperimenta, međutim ta razlika nije bila statistički značajna. Završno, utjecaj koncentracije patogena vidljiv je i u mortalitetu jedinki jer je ovo istraživanje potvrdilo da opetovano izlaganje višim koncentracijama patogena (15000 zoospora/ml) može uzrokovati razvoj bolesti račje kuge kod mramornog raka i uzrokovati smrtnost jedinki (20% jedinki unutar eksperimentalne grupe 15000) za razliku od koncentracije 7500 zoospora/ml pri kojoj nije zabilježen mortalitet jedinki unutar eksperimenta. Iako je mramorni rak, kao i ostale sjevernoameričke vrste rakova, otporan na patogen *A. astaci* (Unestam i Weiss 1970, Cerenius i sur. 2003, Chucholl 2015), ipak se može zaraziti i razviti bolest račju kugu te uginuti ako je izložen dodatnom stresu (Söderhäll i Cerenius 1992, Diéguez-Uribeondo i Söderhäll 1993, Svoboda i sur. 2016) ili izrazito visokim koncentracijama zoospora (Diéguez-Uribeondo i Söderhäll 1993). Prema tome, što je veća koncentracija spora, mramornom raku je teže obraniti se od patogena i ne iznenađuje da veća koncentracija ima izraženiji utjecaj na njegov organizam. To potvrđuje i visok mortalitet (75%) kod eksperimentalne skupine u prvoj fazi istraživanja u kojoj su rakovi samo jednom zaraženi koncentracijom od 30000 zoospora/ml, dok u skupinama zaražavanim nižim koncentracijama nije uopće došlo do mortaliteta rakova.

PCR-test za detekciju uzročnika račje kuge je pokazao negativan rezultat za sve testirane jedinke iz kontrolnih skupina iz prve i druge faze istraživanja što pokazuje da nije došlo do njihove kontaminacije patogenom *A. astaci*, te da jedinke nisu bile u doticaju s patogenom prije same provedbe pokusa. U drugoj fazi istraživanja, u zaraženim skupinama (7500 i 15000), 30 od 40 testiranih zaraženih rakova je pokazalo pozitivan rezultat PCR-testa. To potvrđuje da je patogen *A. astaci* dva tjedna nakon zaražavanja bio prisutan kod većine juvenilnih jedinki mramornog raka i to više u eksperimentalnoj skupini 15000 (95% jedinki naspram 55% u skupini 7500). To ne znači da zaražavanje nije uspjelo kod ostalih jedinki koje su pokazale negativan rezultat PCR-testa. Postoji vjerojatnost da je patogen uklonjen s jedinke tijekom njezinog presvlačenja. Naime, kod slatkovodnih deseteronožnih vrsta rakova koje su otporne na račju kugu, kakav je i mramorni rak, proPO sustav je uvijek aktivan (Cerenius i sur. 2003). To omogućuje brzu reakciju imunskog sustava i sprječava širenje infekcije koja započinje

preko kutikule te je zato moguće da patogen bude uklonjen tijekom presvlačenja, osobito kod juvenilnih jedinki koje se često presvlače (Svoboda i sur. 2014, OIE 2019).

Smanjena stopa prirasta dužine i težine koja je rezultat infekcije patogenom *A. astaci* može dovesti do značajnog smanjenja rasta populacija mramornog raka jer je fekunditet usko povezan s veličinom i životnom dobi jedinki te one veće imaju veći broj potomaka (Seitz i sur. 2005, Vogt 2010). Ipak, s obzirom na to da se ova vrsta razmnožava partenogenetski (Martin i sur. 2007) i ima više generacija godišnje (Vogt i sur. 2015), to joj potencijalno neće predstavljati veliki problem, osim ukoliko je u kompeticiji s drugom uspješnom invazivnom stranom vrstom kao što je bodljobrادي ili signalni rak. Ove dvije invazivne strane vrste rakova su prisutne u rijeci Dravi (Hudina i sur. 2009, Dragičević i sur. 2020) te su potencijalni nositelji patogena *A. astaci* koji je, kako je pokazalo istraživanje Maguire i suradnika (2016), široko rasprostranjen među autohtonim i alohtonim populacijama deseteronožnih slatkovodnih rakova u Hrvatskoj. S obzirom na to da je mramorni rak u Hrvatskoj pronađen u jezeru Šoderica koje se nalazi samo 400 metara od rijeke Drave, moguće je da se već proširio tamo, pogotovo zbog poplava koje su 2014. godine povezale Šodericu i okolna vodena tijela (Samardžić i sur. 2014). Istraživanje Linzmaiera i suradnika (2018) je pokazalo kako mramorni rak u antagonističkim interakcijama s bodljobrადim rakom pokazuje agresivnije ponašanje i može uspostaviti dominaciju čak i nad većim jedinkama bodljobrადog raka s većim kliještima. Zbog toga bodljobrადi rak vjerojatno neće utjecati na širenje i invazivni uspjeh mramornog raka čak ni ako zaraza patogenom *A. astaci* uzrokuje smanjenu stopu rasta jedinki mramornog raka. S druge strane, rezultati istraživanja Forța i suradnika (2018), koji su uspoređivali interspecijske interakcije između signalnog, mramornog i australskog slatkovodnog raka *Cherax destructor* Clark, 1936, su pokazali da je mramorni rak najmanje agresivan i najmanje uspješan u antagonističkim interakcijama između ovih vrsta. S obzirom da se signalni rak se pokazao kao dominantna vrsta u antagonističkim interakcijama s bodljobrადim rakom (Hudina i sur. 2011), očekujem kako bi signalni rak mogao biti kompetitivno uspješniji u interakcijama s mramornim rakom. Potencijalna dominantnost signalnog raka u odnosu na mramornog bi mogla negativno utjecati na invazivni potencijal mramornog raka zbog ograničenog pristupa resursima, a to u kombinaciji sa smanjenim rastom mramornog raka zbog utjecaja patogena i produkcije manjeg broja potomaka, može negativno utjecati na fitnes mramornog raka i ograničiti njegovo širenje u rijeci Dravi i drugim staništima gdje je prisutan signalni rak.



## 5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata dobivenih zaražavanjem juvenilnih jedinki mramornog raka odabranim koncentracijama patogena *Aphanomyces astaci* (soj PsI) u laboratorijskim uvjetima potvrđene su hipoteze:

- Zaraza će značajno smanjiti prirast dužine i težine zaraženih naspram kontrolnih jedinki.
- Različite doze tj., koncentracije zoospora različito će utjecati na prirast dužine i težine i na mortalitet.

Dodatno se može zaključiti sljedeće:

- Mramorni rak može se zaraziti virulentnim genotipom B (PsI) patogena *A. astaci*, ali je na njega relativno tolerantan, te mramorni rak može biti potencijalni vektor širenja ovog genotipa u prirodi.
- Veće koncentracije patogena imaju izraženiji utjecaj na prirast duljine i težine i na mortalitet, ali samo su razlike u prirastu težine bile statistički značajne, te zaraza patogenom ima veći utjecaj na prirast težine nego na prirast dužine.
- Uzastopno zaražavanje većim koncentracijama patogena (15000 zoospora/ml) uzrokuje mortalitet manjeg postotka jedinki (20%).
- Zaražavanje visokim koncentracijama spora (30000 spora/ml) dovodi do razvoja bolesti račje kuge i uzrokuje mortalitet juvenilnih jedinki mramornog raka.

Sve navedeno ukazuje na to da kod juvenilnih jedinki mramornih rakova postoji kompromis između stope rasta i imunosnog odgovora na uzastopnu infekciju uzročnikom račje kuge. To znači da vjerojatno dolazi do preraspodjele energije i nutrijenata dostupnih za rast, te da se oni, u trenutku kada dođe do zaraze patogenom *A. astaci*, djelomično ulažu u imunosni sustav, odnosno u obranu organizma od patogena, umjesto u rast.

Ovaj je diplomski rad izrađen u sklopu projekta „Promjene sastava patogena i imunološkog odgovora tijekom širenja areala uspješnih invazivnih vrsta slatkovodnih rakova“ financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ UIP 2017-05-1720).

## 6. LITERATURA

1. Albert, J. S., Destouni, G., Duke-Sylvester, S. M., Magurran, A. E., Oberdorff, T., Reis, R. E., Winemiller, K. O., Ripple, W. J. (2021): Scientists' warning to humanity on the freshwater biodiversity crisis, *Ambio*, 50, 85–94
2. Arnold, P. A., Johnson, K. N., White, C. R. (2013): Physiological and metabolic consequences of viral infection in *Drosophila melanogaster*, *The Journal of Experimental Biology*, 216, 3350–3357
3. Birky, C. W. Jr., Barraclough, T. G. (2009): Asexual speciation. U: Schön, I., Martens, K., van Dijk, P. (ur.) *Lost Sex: The evolutionary biology of parthenogenesis*, Dordrecht: Springer, 201–216
4. Boštjančić, Lj. L., Francesconi, C., Rutz, C., Hoffbeck, L., Poidevin, L., Kress, A., Jussila, J., Makkonen, J., Felddmeyer, B., Bálint, M., Lecompte, O., Theissinger, K. (2021): Comparative transcriptome analysis of noble crayfish and marbled crayfish immune response to *Aphanomyces astaci* challenges, *bioRxiv*, DOI: 10.1101/2021.05.25.445163
5. Cerenius, L., Söderhäll, K. (1984): Repeated zoospore emergence from isolated spore cysts of *Aphanomyces astaci*, *Experimental mycology*, 8, 370–377
6. Cerenius, L., Bangyeekhun, E., Keyser, P., Söderhäll, I., Söderhäll, K. (2003): Host prophenoloxidase expression in freshwater crayfish is linked to increased resistance to the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*, *Cellular Microbiology*, 5, 353–357
7. Chucholl, C. (2012): Invaders for sale: trade and determinants of introduction of ornamental freshwater crayfish, *Biological Invasions*, 15, 125–141
8. Chucholl, C. (2015): Marbled crayfish gaining ground in Europe: the role of the pet trade as invasion pathway, U: Kawai, T., Faulkes, Z., Scholtz, G. (ur.): *Freshwater Crayfish: A global Overview*, CRC Press, Boca Raton, 83–114
9. Crandall, K. A., Buhay, J. E. (2008): Global diversity of crayfish (Astacidae, Cambaridae, and Parastacidae—Decapoda) in freshwater, *Hydrobiologia*, 595, 295–301
10. Crandall, K. A., De Grave, S. (2017): An updated classification of the freshwater crayfishes (Decapoda: Astacidea) of the world, with a complete species list, *Journal of Crustacean Biology*, 37, 615–653

11. Darwall, W., Bremerich, V., De Wever, A., Dell, A. I., Freyhof, J., Gessner, M., O., Grossart, H.-P., Harrison, I., Irvine, K., Jähnig, S. C., Jeschke, J. M., Lee, J. J., Lu, C., Lewandowska, A. M., Monaghan, M. T., Nejstgaard, J. C., Patricio, H., Schmidt-Kloiber, A., Stuart, S. N., Thieme, M., Tockner, K., Turak, E., Weyl, O. (2018): *The Alliance for Freshwater Life: A global call to unite efforts for freshwater biodiversity science and conservation*, *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystem*, 28, 1015–1022
12. Diéguez-Uribeondo, J., Söderhäll, K. (1993): *Procambarus clarkii* Girard as a vector for the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci* Schikora, *Aquaculture and Fisheries Management*, 24, 761–765
13. Diéguez-Uribeondo, J., Huang, T. S., Cerenius L. (1995): Physiological adaptation of an *Aphanomyces astaci* strain isolated from the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*, *Mycological Research*, 99, 574–578
14. Dobrović, A., Maguire, I., Boban, M., Grbin, D., Hudina, S. (2021): Reproduction dynamics of the marbled crayfish *Procambarus virginalis* Lyko, 2017 from an anthropogenic lake in northern Croatia, *Aquatic Invasions*, 16, u tisku
15. Dragičević, P., Faller, M., Kutleša, P., Hudina, S. (2020): Update on the signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) range expansion in Croatia: a 10-year report, *BioInvasion Records*, 9, 793–807
16. English, S., Bonsall, M. B. (2019): Physiological dynamics, reproduction-maintenance allocations, and life history evolution, *Ecology and Evolution*, 9, 9312–9323
17. Fořt, M., Hossain, M. S., Kouba, A., Buřič, M., Kozák, P. (2018): Agonistic interactions and dominance establishment in three crayfish species non-native to Europe, *Limnologica*, 74, 73–79
18. Hossain, M. S., Patoka, J., Kouba, A., Burič, M., (2018): Clonal crayfish as biological model: a review on marbled crayfish, *Biologia*, 73, 841–855
19. Hossain, M. S., Kubec, J., Kouba, A., Kozák, P., Buřič, M., (2019a): Still waters run deep: marbled crayfish dominates over red swamp crayfish in agonistic interactions, *Aquatic Ecology*, 53, 97–107
20. Hossain, M. S., Kouba, A., Buřič, M. (2019b): Morphometry, size at maturity, and fecundity of marbled crayfish (*Procambarus virginalis*), *Zoologischer Anzeiger*, 281, 68–75

21. Huang, T. S., Cerenius, L., Söderhäll, K. (1994): Analysis of genetic diversity in the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*, by random amplification of polymorphic DNA, *Aquaculture*, 126, 1–10
22. Hudina S., Faller M., Lucić A., Klobučar G., Maguire I. (2009): Distribution and dispersal of two invasive crayfish species in the Drava River basin, Croatia. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 9, 394–395
23. Hudina, S., Galić, N., Roessink, I., Hock, K. (2011): Competitive interactions between co-occurring invaders: identifying asymmetries between two invasive crayfish species, *Biological Invasions*, 13, 1791–1803
24. Jimenez, S. A., Faulkes, Z. (2011): Can the parthenogenetic marbled crayfish *Marmorkrebs* compete with other crayfish species in fights?, *Journal of Ethology*, 29, 115–120
25. Johansson, M. W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K., Söderhäll, K. (2000): Crustacean haemocytes and haematopoiesis, *Aquaculture*, 191, 45–52
26. Jones, J. P. G., Rasamy, J. R., Harvey, A., Toon, A., Oidtmann, B., Randrianarison, M. H., Raminosoa, N., Ravoahangimalala, O. R. (2009): The perfect invader: a parthenogenic crayfish poses a new threat to Madagascar's freshwater biodiversity, *Biological Invasions*, 11, 1475–1482
27. Jussila, J., Makkonen, J., Vainikka, A., Kortet, R., Kokko, H. (2014): Crayfish plague dilemma: how to be a courteous killer?, *Boreal environment research*, 19, 235–244
28. Kawai, T., Crandall, K. A. (2016): Global diversity and conservation of freshwater crayfish (Crustacea: Decapoda: Astacoidea), U: Kawai, T., Cumberlidge, N. (ur.), A global overview of the conservation of freshwater decapod crustaceans, Springer International Publishing, Switzerland, 65–114
29. Keller, N. S., Pfeiffer, M., Roessink, I., Schulz, R., Schrimpf, A. (2014): First evidence of crayfish plague agent in populations of the marbled crayfish (*Procambarus fallax* forma *virginalis*), *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 414, 1–8
30. Kozubíková, E., Viljamaa-Dirks, S., Heinikainen, S., Petrussek, A. (2011): Spiny-cheek crayfish *Orconectes limosus* carry a novel genotype of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci*, *Journal of Invertebrate Pathology*, 108, 214–216.
31. Lee, K. A. (2006): Linking immune defenses and life history at the levels of the individual and the species, *Integrative and Comparative Biology*, 46, 1000–1015

32. Linzmaier, S. M., Goebel, L. S., Ruland, F., Jeschke, J. M. (2018): Behavioral differences in an over-invasion scenario: marbled vs. spiny-cheek crayfish, *Ecosphere*, 9, 1–18
33. Lipták, B., Veselý, L., Ercoli, F., Bláha, M., Buřič, M., Ruokonen, T., Kouba, A. (2019): Trophic role of marbled crayfish in a lentic freshwater ecosystem, *Aquatic Invasions*, 14, 299–309
34. Lochmiller, R. L., Deerenberg, C. (2000): Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity?, *Oikos*, 88, 87–98
35. Lyko, F. (2017): The marbled crayfish (Decapoda: Cambaridae) represents an independent new species, *Zootaxa*, 4363, 544–552
36. Ljubej, L. (2017): Razvoj neinvazivne metode detekcije uzročnika račje kuge, *Aphanomyces astaci* (Schikora, 1906), Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
37. Maguire, I. (2010): Slatkovodni rakovi – priručnik za inventarizaciju i praćenje stanja, Državni zavod za zaštitu prirode
38. Maguire, I., Jelić, M., Klobučar, G., Delpy, M., Delaunay, C., Grandjean, F. (2016): Prevalence of the pathogen *Aphanomyces astaci* in freshwater crayfish populations in Croatia, *Diseases of aquatic organisms*, 118, 45–53
39. Maguire, I., Klobučar, G., Žganec, K., Jelić, M., Lucić, A., Hudina, S. (2018): Recent changes in distribution pattern of freshwater crayfish in Croatia - threats and perspectives, *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 419, 1–12
40. Makkonen, J., Jussila, J., Kortet, R., Vainikka, A., Kokko, H. (2012): Differing virulence of *Aphanomyces astaci* isolates and elevated resistance of noble crayfish *Astacus astacus* against crayfish plague, *Diseases of Aquatic Organisms*, 102, 129–136
41. Makkonen, J., Kokko, H., Vainikka, A., Kortet, R., Jussila, J. (2014): Dose-dependent mortality of the noble crayfish (*Astacus astacus*) to different strains of the crayfish plague (*Aphanomyces astaci*), *Journal of Invertebrate Pathology*, 115, 86–91
42. Makovets, S. (2013): Basic DNA electrophoresis in molecular cloning: A comprehensive guide for beginners, U: Makovets, S. (ur.), *DNA Electrophoresis – Methods and protocols*, Humana Press, New York
43. Martin, L. B., Scheuerlein, A., Wikelski, M. (2003): Immune activity elevates energy expenditure of house sparrows: a link between direct and indirect costs?, *Proceedings of the Royal Society B*, 270, 153–158

44. Martin, P., Kohlmann, K., Scholtz, G. (2007): The parthenogenetic Marmorkrebs (marbled crayfish) produces genetically uniform offspring, *Naturwissenschaften*, 94, 843–846
45. Martin, P., Dorn, N. J., Kawai, T., van der Heiden, C., Scholtz, G. (2010): The enigmatic Marmorkrebs (marbled crayfish) is the parthenogenetic form of *Procambarus fallax* (Hagen, 1870), *Contributions to Zoology*, 79, 107–118
46. Martin, P., Thonagel, S., Scholtz, G. (2015): The parthenogenetic Marmorkrebs (Malacostraca: Decapoda: Cambaridae) is a triploid organism, *Journal of zoological systematics and evolutionary research*, 54, 13–21
47. Minardi, D., Studholme, D. J., Oidtmann, B., Pretto, T., van der Giezen, M. (2019): Improved method for genotyping the causative agent of crayfish plague (*Aphanomyces astaci*) based on mitochondrial DNA, *Parasitology*, 146, 1022–1029
48. MINGOR, Ministarstvo gospodarstva i održivog razvoja (2020), <http://www.haop.hr/hr/tematska-podrucja/prirodne-vrijednosti-stanje-i-ocuvanje/ugrozenost-vrsta-i-stanista/strane-vrste/o>, pristupljeno: 15.1.2021.
49. Moreno-García, M., Córdoba-Aguilar, A., Condé, R., Lanz-Mendoza, H. (2012): Current immunity markers in insect ecological immunology: assumed trade-offs and methodological issues, *Bulletin of Entomological Research*, 103, 127–139
50. Narodne novine, Zakon o sprječavanju unošenja i širenja stranih te invazivnih stranih vrsta i upravljanju njima, br. 310, 15/2018, [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2018\\_02\\_15\\_310.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2018_02_15_310.html), pristupljeno: 15.1.2021.
51. Narodne novine, Zakon o izmjenama i dopuni Zakona o sprječavanju unošenja i širenja stranih te invazivnih stranih vrsta i upravljanju njima, br. 275, 14/2019, [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2019\\_02\\_14\\_275.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2019_02_14_275.html), pristupljeno: 15.1.2021.
52. O'Connell-Milne, S. A., Poulin, R., Savage, C., Rayment, W. (2016): Reduced growth, body condition and foot length of the bivalve *Austrovenus stutchburyi* in response to parasite infection, *Journal of Experimental Marine Biology*, 474, 23–28
53. Oidtmann B., Heitz E., Rogers D., Hoffmann R. W. (2002): Transmission of crayfish plague, *Diseases of Aquatic Organisms*, 52, 159–167
54. Oidtmann, B., Geiger, S., Steinbauer, P., Culas, A., Hoffmann, R. W. (2006): Detection of *Aphanomyces astaci* in North American crayfish by polymerase chain reaction, *Diseases of Aquatic Organisms*, 72, 53–64

55. OIE – World Organisation for Animal Health (2019): Aquatic Animal Health Code, poglavlje 9.2.: Infection with *Aphanomyces astaci* (Crayfish plague), [https://rr-europe.oie.int/wp-content/uploads/2020/08/oie-aqua-code\\_2019\\_en.pdf](https://rr-europe.oie.int/wp-content/uploads/2020/08/oie-aqua-code_2019_en.pdf), pristupljeno: 15.12.2020.
56. Ojala, K., Julkunen-Tiitto, R., Lindström, L., Mappes, J. (2005): Diet affects the immune defence and life-history traits of an Arctiid moth *Parasemia plantaginis*, *Evolutionary Ecology Research*, 7, 1153–1170
57. Parkyn, S. M., Collier, K. J., Hicks, B. J. (2001): New Zealand stream crayfish: functional omnivores but trophic predators?, *Freshwater Biology*, 46, 641–652
58. Patoka, J., Buřič, M., Vojtěch, K., Bláha, M., Petrtýl, M., Franta, P., Tropek, R., Kalous, L., Petrusek, A., Kouba, A. (2016): Predictions of marbled crayfish establishment in conurbations fulfilled: Evidences from the Czech Republic, *Biologia*, 71, 1380–1385
59. Rantala, M. J., Roff, D. A. (2005): An analysis of trade-offs in immune function, body size and development time in the Mediterranean Field Cricket, *Gryllus bimaculatus*, 19, 323–330
60. Reynolds, J., Souty-Grosset, C., Richardson, A. (2013): Ecological roles of crayfish in freshwater and terrestrial habitats, *Freshwater Crayfish*, 19, 197–218
61. Reznick, D. (1992): Measuring the costs of reproduction, *Trends in Ecology and Evolution*, 7, 42–45
62. Richman, N. I., Böhm, M., Adams, S. B., Alvarez, F., Bergey, E. A., Bunn, J. J. S., Burnham, Q., Cordeiro, J., Coughran, J., Crandall, K. A., Dawkins, K. L., DiStefano, R. J., Doran, N. E., Edsman, L., Eversole, A. G., Fureder, L., Furse, J. M., Gherardi, F., Hamr, P., Holdich, D. M., Horwitz, P., Johnston, K., Jones, C. M., Jones, J. P. G., Jones, R. L., Jones, T. G., Kawai, T., Lawler, S., Lopez-Mejia, M., Miller, R. M., Pedraza-Lara, C., Reynolds, J. D., Richardson, A. M. M., Schultz, M. B., Schuster, G. A., Sibley, P. J., Souty-Grosset, C., Taylor, C. A., Thoma, R. F., Walls, J., Walsh, T. S., Collen, B. (2015): Multiple drivers of decline in the global status of freshwater crayfish (Decapoda: Astacidea), *Philosophical Transactions of The Royal Society B: Biological Sciences*, 370, 1–11
63. Rolff, J., Siva-Jothy, M. T. (2003): Invertebrate Ecological Immunology, *Science*, 301, 472–475

64. Samardžić, M., Lucić, A., Maguire, I., Hudina, S. (2014): The first record of the marbled crayfish (*Procambarus fallax* (Hagen, 1870) f. *virginalis*) in Croatia, *Crayfish News*, 36, 4
65. Scholtz, G., Braband, A., Tolley, L., Reimann, A., Mittmann, B., Lukhaup, C., Steuerwald, F., Vogt, G. (2003): Parthenogenesis in an outsider crayfish, *Nature*, 421, 806
66. Schultz, K. T., Grieder, F. (1987): Structure and Function of the Immune System, *Toxicologic Pathology*, 15, 262–264
67. Schwenke, R. A., Lazzaro, B. P., Wolfner, M. F. (2016): Reproduction – immunity trade-offs in insects, *Annual Review of Entomology*, 61, 239–256
68. Seitz, R., Vilpoux, K., Hopp, U., Harzsch, S., Maier, G. (2005): Ontogeny of the Marmorkrebs (Marbled Crayfish): a parthenogenetic crayfish with unknown origin and phylogenetic position, *Journal of Experimental Zoology*, 303, 393–405
69. Sheldon, B. C., Verhulst, S. (1996): Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology, *Trends in Ecology and Evolution*, 11, 317–321
70. Söderhäll, K., Cerenius, L. (1992): Crustacean immunity, *Annual Review of Fish Diseases*, 2, 3–23
71. Söderhäll, K., Cerenius, L. (1998): Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity, *Current Opinion in Immunology*, 10, 23–28
72. Söderhäll, I. (2016): Crustacean hematopoiesis, *Developmental and Comparative Immunology*, 58, 129–141
73. Statzner, B., Fievet, E. (2000): Crayfish as geomorphic agents and ecosystem engineers: Biological behavior affects sand and gravel erosion in experimental streams, *Limnology and Oceanography*, 45, 1030–1040
74. Stearns, S. C. (1989): Trade-offs in life history evolution, *Functional Ecology*, 3, 259–268
75. Stearns, S. C. (2000): Life history evolution: Successes, limitations and prospects, *The Science of Nature*, 87, 476–486
76. Strayer, D. L. (2006): Challenges for freshwater invertebrate conservation, *Journal of the North American Benthological Society*, 25, 271–287



77. Strayer, D. L., Dudgeon, D. (2010): Freshwater biodiversity conservation: recent progress and future challenges, *Journal of the North American Benthological Society*, 29, 344–358
78. Svoboda, J., Mrugała, A., Kozubíková-Balcarová, E., Kouba, A., Diéguez-Uribeondo, J., Petrusek, A. (2014): Resistance to the crayfish plague pathogen, *Aphanomyces astaci*, in two freshwater shrimps, *Journal of Invertebrate Pathology*, 121, 97–104
79. Svoboda, J., Mrugała, A., Kozubíková-Balcarová, E., Petrusek, A. (2016): Hosts and transmission of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci*: a review, *Journal of Fish Diseases*. 40, 127–140
80. Unestam, T. (1965): Studies on the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci* : I. Some Factors Affecting Growth in vitro, *Plantarum, Physiologia*, 18, 483–506
81. Unestam, T., Weiss, D. W. (1970): The host–parasite relationship between freshwater crayfish and the crayfish disease fungus *Aphanomyces astaci*: responses to infection by a susceptible and a resistant species. *The Journal of General Microbiology*, 60, 77–90
82. Van der Most, P. J., de Jong, B., Parmentier, H. K., Verhulst, S. (2011): Trade-off between growth and immune function: a meta-analysis of selection experiments, *Functional Ecology*, 25, 74–80
83. Van Ooik, T., Rantala, M. J., Saloniemi, I. (2007): Diet-mediated effects of heavy metal pollution on growth and immune response in the geometrid moth *Epirrita autumnata*, *Environmental Pollution*, 145, 348–354
84. Veselý, L., Buřič, M., Kouba, A. (2015): Hardy exotics species in temperate zone: can “warm water” crayfish invaders establish regardless of low temperatures?, *Scientific Reports*, 5, 16340
85. Viljamaa-Dirks, S., Heinikainen, S., Torssonen, H., Pursiainen, M., Mattila, J., Pelkonen, S. (2013): Distribution and epidemiology of genotypes of the crayfish plague agent *Aphanomyces astaci* from noble crayfish *Astacus astacus* in Finland, *Diseases of Aquatic Organisms*, 103, 199–208
86. Vogt, G., Tolley, L., Scholtz, G. (2004): Life stages and reproductive components of the Marmokrebs (marbled crayfish), the first parthenogenetic decapod crustacean, *Journal of morphology*, 261, 286–311
87. Vogt, G. (2010): Suitability of the clonal marbled crayfish for biogerontological research: a review and perspective, with remarks on some further crustaceans, *Biogerontology*, 11, 643–669

88. Vogt, G., Falckenhayn, C., Schrimpf, A., Schmid, K., Hanna, K., Panteleit, J., Helm, M., Schulz, R., Lyko, F. (2015): The marbled crayfish as a paradigm for saltational speciation by autopolyploidy and parthenogenesis in animals, *Biology Open*, 4, 1583–1594
89. Vogt, G. (2020): *Biology, ecology, evolution, systematics and utilization of the parthenogenetic marbled crayfish, Procambarus virginalis*, U: Ribeiro, F. B. (ur.), *Crayfish: evolution, habitat and conservation strategy*, Nova Science Publisher, New York, 137–227
90. Vrålstad T., Håstein T., Taugbøl T., Lillehaug A. (2006): Krepsepest - smitteforhold i norske vassdrag og forebyggende tiltak mot videre spredning av krepsepest, *Veterinærinstituttets rapportserie*, 6, 1–25
91. Vrålstad, T., Johnsen, S. I., Taugbøl, T. (2011): NOBANIS – Invasive Alien Species Fact Sheet – *Aphanomyces astaci*, Online Database of the European Network on Invasive Alien Species – NOBANIS [www.nobanis.org](http://www.nobanis.org), Pristupljeno: 2.12.2020.
92. WWF (2016): *Living Planet Report 2016 - Risk and resilience in a new era*. WWF International, Gland, Switzerland
93. Zakon o zaštiti prirode (Narodne novine br. 15/18, 14/19)
94. Zar, J. H. (2010): *Biostatistical Analysis*, 5th Edition, Prentice-Hall/Pearson, Upper Saddle River
95. Zuk, M., Stoehr, A. M. (2002): Immune Defense and Host Life History, *The American Naturalist*, 160, 9–22
96. Žganec, K., Lajtner, J., Čuk, R., Crnčan, P., Pušić, I., Atanacković, A., Kralj, T., Valić, D., Jelić, M., Maguire, I. (2020): Alien macroinvertebrates in Croatian freshwaters, *Aquatic invasions*, 15, 593–615

Linkovi:

1. <https://imagej.nih.gov/ij/>, Pristupljeno: 3.1.2021.

## ŽIVOTOPIS

Zovem se Mara Vukelić, rođena sam 28. prosinca 1996. u Zagrebu gdje sam odrasla i 2011. godine upisala III. (opću) gimnaziju. Preddiplomski sveučilišni studij znanosti o okolišu na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu sam upisala 2015. godine, a 2018. sam stekla zvanje sveučilišne prvostupnice znanosti o okolišu sa završnim radom na temu "Šesto masovno izumiranje". Iste godine sam upisala diplomski sveučilišni studij znanosti o okolišu. Tijekom studiranja sam odradila laboratorijsku stručnu praksu gdje sam se bavila detekcijom račje kuge na nativnoj vrsti riječnog raka *Astacus astacus*. 2017. i 2018. godine sam sudjelovala u provođenju radionica o UV zračenju i invazivnim vrstama na popularno-znanstvenoj manifestaciji "Noć biologije". 2019. godine sam sudjelovala na projektu "European Green Activist Training" u organizaciji Europske zelene fondacije, a uz studij radim kao edukatorica u Zoološkom vrtu grada Zagreba od početka 2018. godine.