

# Genetska raznolikost populacija plemenitog raka *Astacus astacus* (Linnaeus, 1758) u Hrvatskoj

---

Kovačević, Maja

Master's thesis / Diplomski 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:217:163811>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Maja Kovačević

**Genetska raznolikost populacija plemenitog  
raka *Astacus astacus* (Linnaeus, 1758) u  
Hrvatskoj**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Maja Kovačević

**Genetic diversity of noble crayfish *Astacus  
astacus* (Linnaeus, 1758) populations in  
Croatia**

Master thesis

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za astakologiju na Zoologijskom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod voditeljstvom prof. dr. sc. Ivane Maguire, te neposrednim voditeljstvom Leone Lovrenčić, mag. biol. exp. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

## **Zahvale**

*Velika hvala mojoj mentorici prof. dr. sc. Ivani Maguire i neposrednoj voditeljici diplomskog rada Leoni Lovrenčić, mag. biol. exp. na savjetima, mentorstvu i strpljenju.*

*Velika hvala mojim roditeljima i bratu na podršci i svim riječima ohrabrenja na mojem putu do diplome.*

*Hvala kolegici Antoniji Mamić na bezrezervnom prijateljstvu od prvog dana studiranja pa sve do danas, a nadam se i u budućnosti.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Genetska raznolikost populacija plemenitog raka *Astacus astacus* (Linnaeus, 1758) u Hrvatskoj

Maja Kovačević

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Plemeniti ili riječni rak *Astacus astacus* (Linnaeus, 1758) jedna je od četiri autohtone europske vrste slatkovodnih rakova koje obitavaju u Hrvatskoj. Osim što ima ključnu ulogu u slatkovodnim ekosustavima, ova vrsta smatra se i bioindikatorom kvalitete vode. Razni negativni pritisci poput antropogenih translokacija, stranih invazivnih vrsta slatkovodnih rakova i račje kuge kojima je plemeniti rak izložen narušavaju njegovu prirodnu genetsku strukturu i rasprostranjenost. Cilj ovog rada bio je istražiti genetsku raznolikost i strukturu 12 hrvatskih populacija plemenitog raka pomoću 15 mikrosatelitnih lokusa i napraviti filogenetsku rekonstrukciju pomoću mitohondrijskih gena za podjedinicu I citokrom c oksidaze i 16S ribosomsku RNA. Analize mikrosatelitnih lokusa otkrile su visoku razinu genetske raznolikosti i diferencijacije hrvatskih populacija, a filogenetičkim analizama utvrđena je pripadnost spomenutih populacija dvama, već otprije otkrivenim, mitohondrijskim evolucijskim linijama. Rezultati ovog istraživanja doprinijet će izradi konzervacijskih planova za ovu ranjivu i zaštićenu vrstu.

(48 stranica, 13 slika, 10 tablica, 113 literaturnih navoda, 5 priloga, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: mikrosatelitni lokusi, populacijska struktura, mtDNA haplotipovi

Voditelj: prof. dr. sc. Ivana Maguire

Neposredni voditelj: Leona Lovrenčić, mag. biol. exp

Ocjenitelji: Prof. dr. sc. Ivana Maguire

Prof. dr. sc. Sven Jelaska

Izv. prof. dr. sc. Petar Kružić

Rad prihvaćen: 15. rujna 2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master Thesis

### Genetic diversity of the noble crayfish *Astacus astacus* (Linnaeus, 1758) populations in Croatia

Maja Kovačević

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

The noble crayfish or broad-fingered crayfish *Astacus astacus* (Linnaeus, 1758) is one of the four indigenous European species of freshwater crayfish that inhabit Croatia. In addition to playing a key role in freshwater ecosystems, this species is also considered a bioindicator of water quality. Various negative pressures such as anthropogenic translocations, alien invasive freshwater crayfish species and crayfish plague to which noble crayfish is exposed disrupt its natural genetic structure and distribution. The aim of this study was to evaluate the genetic diversity and structure of 12 Croatian noble crayfish populations using 15 microsatellite loci and phylogenetic reconstruction using mitochondrial genes for subunit I cytochrome c oxidase and *16S* ribosomal RNA. Analyses of microsatellite loci revealed a high level of genetic diversity and differentiation of Croatian populations, and phylogenetic analyses determined the affiliation of these populations to two previously described mitochondrial evolutionary lines. The results of this research will contribute to the development of conservation plans for this vulnerable and protected species.

(48 pages, 13 figures, 10 tables, 113 references, 5 attachments original in: croatian)

This is deposited in Central Biological Library.

Keywords: microsatellite loci, population structure, mtDNA haplotypes

Supervisor: Prof. Ivana Maguire, PhD

Assistant Supervisor: Leona Lovrenčić, MSc

Reviewers: Prof. Ivana Maguire

Prof. Sven Jelaska

Assoc. Prof. Petar Kružić

Thesis accepted: 15<sup>th</sup> September 2021

# Sadržaj

<b>1. Uvod</b> .....	1
<b>1.1. Plemeniti rak</b> .....	1
<b>1.2. Genetska raznolikost</b> .....	5
<b>1.2.1. Mikrosateliti</b> .....	6
<b>1.2.2. Mitohondrijska DNA</b> .....	9
<b>1.3. Dosadašnja istraživanja</b> .....	10
<b>1.4. Cilj istraživanja</b> .....	11
<b>2. Materijali i metode</b> .....	12
<b>2.1. Područje istraživanja i materijal</b> .....	12
<b>2.2. Pribor</b> .....	14
<b>2.3. Rad u laboratoriju</b> .....	16
<b>2.4. Računalna obrada podataka</b> .....	19
<b>2.4.1. Analize mikrosatelitnih lokusa</b> .....	19
<b>2.4.1.1. Genotipizacija</b> .....	19
<b>2.4.1.2. Procjena genetske raznolikosti populacija</b> .....	19
<b>2.4.1.3. Procjena genetske strukture populacija</b> .....	20
<b>2.4.2. Analize mitohondrijskih gena</b> .....	21
<b>2.4.2.1. Uređivanje sekvenci</b> .....	21
<b>2.4.2.2. Odabir optimalnog modela evolucije</b> .....	21
<b>2.4.2.3. Izrada haplotipske mreže</b> .....	21
<b>2.4.2.4. Izrada filogenetskog stabla</b> .....	21
<b>3. Rezultati</b> .....	23
<b>3.1. Populacijska genetika</b> .....	23
<b>3.1.1. Rezultati umnažanja mikrosatelitnih lokusa i genotipizacije</b> .....	23
<b>3.1.2. Genetska raznolikost populacija</b> .....	24
<b>3.1.3. Genetska struktura populacija</b> .....	27
<b>3.2. Molekularna filogenija</b> .....	30
<b>3.2.1. Analiza sekvenci i filogenetička rekonstrukcija</b> .....	30
<b>4. Rasprava</b> .....	34



<b>4.1. Populacijska genetika .....</b>	<b>34</b>
<b>4.2. Molekularna filogenija.....</b>	<b>37</b>
<b>5. Zaključak.....</b>	<b>39</b>
<b>6. Literatura .....</b>	<b>40</b>
<b>7. Prilozi.....</b>	<b>49</b>
<b>Životopis.....</b>	<b>IV</b>

## Kratice

*16S rRNA* – *16S* ribosomska RNA

AMOVA – engl. Analysis of Molecular Variance, analiza molekularne varijance

$A_{PR}$  – broj privatnih alela

$A_R$  – alelno bogatstvo

BA – Bayesovska analiza

*COI* – podjedinica I citokrom c oksidaze

$D_A$  – Nei genetske udaljenosti

$F_{IS}$  – indeks parenja u bliskom srodstvu

$F_{ST}$  – fiksacijski indeks

$H_E$  – očekivana heterozigotnost

$H_O$  – uočena heterozigotnost

HWE – Hardy-Weinbergova ravnoteža

IAM – engl. Infinite Allele Model, model beskonačnog broja alela

mtDNA – mitohondrijska DNA

$N_A$  – prosječan broj alela

NN – Narodne Novine

P – polimorfnost lokusa

PCoA – engl. Principal Coordinate Analysis, analiza glavnih koordinata

PCR – engl. Polymerase Chain Reaction, lančana reakcija polimerazom

SMM – engl. Stepwise Mutation Model, model postupnih mutacija

TCS – metoda statističke parsimonije

TPM – engl. Two Phase Model, dvofazni model

$uH_E$  – nepristrana očekivana heterozigotnost

# 1. Uvod

## 1.1. Plemeniti rak

Riječni ili plemeniti rak *Astacus astacus* (Linnaeus, 1758) najčešća je i gastronomski najcjenjenija vrsta slatkovodnog deseteronožnog raka iz porodice Astacidae u Europi (Gross i sur., 2013) (Slika 1., Tablica 1.). Uz bjelonogog ili primorskog raka *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858), potočnog raka ili raka kamenjara *Austropotamobius torrentium* (Schränk, 1803), uskoškarog, turskog ili barskog raka *Pontastacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) jedna je od četiri autohtone europske vrste koje su dosada zabilježene u Hrvatskoj (Maguire i Gottstein-Matočec, 2004). Osim autohtonih, u Hrvatskoj su zabilježene i tri alohtone invazivne vrste slatkovodnih rakova: signalni rak *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852), bodljobrادي rak *Faxonius limosus* (Rafinesque, 1817) koji su podrijetlom iz Sjeverne Amerike (Maguire i sur., 2011) i mramorni rak *Procambarus virginalis* Lyko, 2017 koji je kao vrsta nastao u akvariju u Njemačkoj (Samardžić i sur., 2014).



**Slika 1.** Plemeniti rak (*A. astacus*).

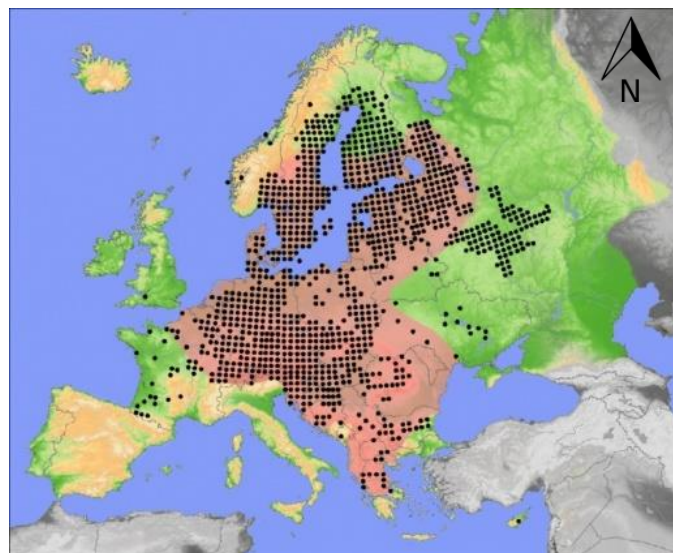
(Preuzeto s <https://commons.wikimedia.org>)

**Tablica 1.** Sistematika plemenitog raka (*A. astacus*).

(<https://www.iucnredlist.org>)

Sistematska kategorija	Latinski naziv	Hrvatski naziv
Carstvo	Animalia	Životinje
Koljeno	Arthropoda	Člankonošci
Potkoljeno	Crustacea	Rakovi
Razred	Malacostraca	Viši rakovi
Red	Decapoda	Deseteronožni rakovi
Porodica	Astacidae	/
Rod	<i>Astacus</i>	/
Vrsta	<i>Astacus astacus</i> (Linnaeus, 1758)	Plemeniti ili riječni rak

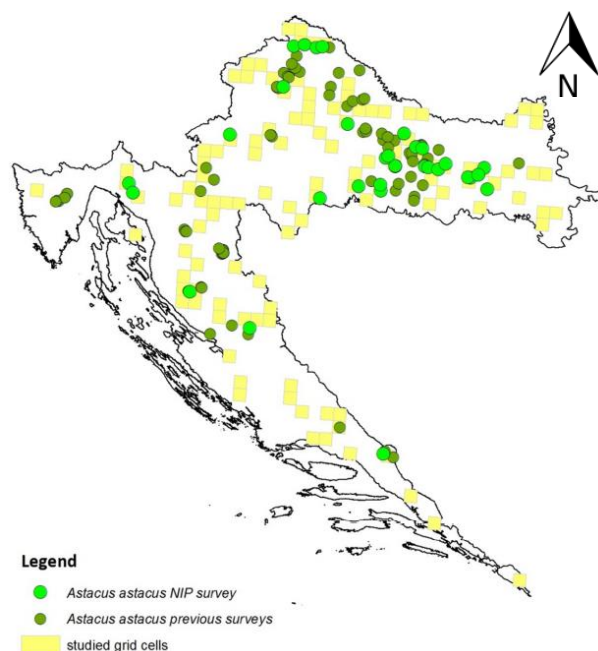
Sadašnja rasprostranjenost, genetska struktura i raznolikost obligatnih slatkovodnih organizama odraz je prošlih klimatskih uvjeta, geomorfoloških i hidrogeografskih procesa poput glacijacija, promjena razine mora i tektonskih aktivnosti (Hughes i sur., 2009). Glacijacije tijekom pleistocena (2,58 milijuna godina – 11 550 godina prije sadašnjosti) imale su značajan učinak na floru i faunu čiji je dugoročni opstanak ovisio o refugijima (Hewitt, 1999; Hewitt, 2004). Plemeniti rak zadnju je glacijaciju najvjerojatnije preživio na Balkanskom poluotoku (Albrecht, 1983) na kojem su dosada potvrđena tri glacijalna refugija za spomenutu vrstu: zapadni i južni Balkan te donji dijelovi dunavskog bazena (Schrimpf i sur., 2014; Laggis i sur., 2017). Migracije vodenih organizama iz refugija odvijale su se putem vodenih migracijskih ruta nastalih povlačenjem ledenjaka nakon posljednjeg glacijalnog maksimuma (engl. *last glacial maximum*, LGM) (Weiss i sur., 2002) koji je trajao otprilike 26 500 – 19 000 odnosno 20 000 godina prije sadašnjosti (Clark i sur., 2009). Najvjerojatnija kolonizacijska ruta plemenitog raka iz refugija prema sjeveru i zapadu Europe bila je ona putem Dunava i vodotokova dunavskog sliva (Schrimpf i sur., 2011). Plemeniti rak danas je prirodno rasprostranjen od Rusije i Ukrajine na istoku, Finske, Švedske i Norveške na sjeveru, Grčke na jugu do Francuske na zapadu (Kouba i sur., 2014). Osim u prirodnom arealu, vrsta se zbog unosa danas može pronaći i u Andori, Velikoj Britaniji, Lihtenštajnu, Luksemburgu, Crnoj Gori, Italiji, na Cipru pa čak i van Europe, u Maroku (<https://www.iucnredlist.org>) (Slika 2.).



**Slika 2.** Geografska rasprostranjenost plemenitog raka (*A. astacus*) u Europi. Crvenom bojom naglašeno je područje autohtone rasprostranjenosti raka. Svaka točka smještena je u zaseban kvadrant veličine 50x50 km u CGRS mreži (engl. *Common European Chorological Grid Reference System*).

(Preuzeto i prilagođeno iz Kouba i sur., 2014)

U Hrvatskoj plemeniti rak prirodno obitava u rijekama, potocima i jezerima dunavskog sliva, a unesen je u slatkovodna staništa jadranskog sliva (Maguire i Gottstein-Matočec, 2004) (Slika 3).



**Slika 3.** Rasprostranjenost plemenitog raka u Hrvatskoj. Svijetlozeleni krugovi označavaju lokacije na kojima su zabilježeni plemeniti rakovi tijekom istraživanja u okviru Projekta integracije u EU Natura 2000 (NIP), a tamnozeleni krugovi lokacije na kojima su plemeniti rakovi zabilježeni prije spomenutog istraživanja. Žutom bojom označeni su kvadranti veličine 10x10 km koji su istraživani tijekom NIP projekta.

(Preuzeto i prilagođeno iz Maguire i sur., 2018)

Riječni rakovi rijetko narastu dulji od 15 cm (duljina od vrha rostruma do kraja telzona), a spolno zreli postaju tijekom 3.-5. godine života (duljine 6-8,5 cm). Parenje se odvija u rujnu i listopadu. Ženke nose oplođena jaja ispod repa osam do devet mjeseci. Zatim se izlegu juvenilni rakovi koji se nakon drugog presvlačenja odvoje od majke i započnu samostalno živjeti. Parenje, izlijeganje i presvlačenje rakova uvjetovano je temperaturom okoliša (Holdich, 2002).

Zbog svojih prehrambenih navika plemeniti rakovi imaju ključnu ulogu u slatkovodnim ekosustavima (Nyström, 1999) i nerijetko dominiraju biomasom bentosa u jezerima i potocima. Oni su predatori, herbivori i detritivori, ali i plijen mnogih životinja. Upravo su zato važan katalizator obrta organske tvari odnosno imaju sposobnost jake asimilacije dušika biljnog i životinjskog podrijetla (Holdich, 2002).

Osim što je osjetljiv na organsko onečišćenje (Pârulescu i sur., 2011) i ima potrebu za visokim koncentracijama kisika (Cukerzis, 1984), plemeniti rak smatra se bioindikatorom kvalitete vode (Reynolds i sur., 2013).

Plemeniti rak predmet je razmjene i trgovine već više od 2000 godina (Skurdal i Taugbøl, 2002). Farme slatkovodnih rakova postoje i danas u mnogim europskim zemljama, naročito u središnjoj i sjevernoj Europi (Paaver i Hurt, 2009), gdje se rakovi uzgajaju i prodaju kao prehrambeni proizvod, kao račji fond za privatna uzgajališta, ali i kao jedinke za programe repopulacije prirodnih staništa. Obnavljanje prirodnih populacija često se radi pomoću jedinki čiji je genetski status nepoznat (Souty-Grosseti sur., 2003). Spomenuta razmjena i trgovina rezultiraju antropogenim translokacijama rakova koje, uz izgradnju kanala za povezivanje slivova rijeka, uništavaju prirodnu genetsku strukturu i rasprostranjenost rakova (Schrimpf i sur., 2014). Genetičke analize od velike su važnosti za konzervacijsku biologiju, gospodarenje životinjskim fondovima, razumijevanje evolucijskih procesa i filogenetskih odnosa te za utvrđivanje bioraznolikosti (Ozturk i Altinok, 2017).

Uz razne prijetnje poput uništavanja staništa, izmjene vodotokova, zakiseljavanja voda, onečišćenja, prelova i krivolova, račja kuga glavni je razlog dugoročnog smanjenja brojnosti vrste. Uzrokovana je oomicetom *Aphanomyces astaci* Schikora, 1906 koju prenose invazivne vrste sjevernoameričkih rakova (npr. *Pacifastacus leniusculus*) (Edsman i sur., 2010). Invazivne vrste agresivnije su od autohtonih europskih vrsta pa ih u kompeticiji za prostor i hranu istiskuju iz njihovih prirodnih staništa (Souty-Grosset i sur., 2006). Izumiranje lokalnih populacija slatkovodnih rakova može imati značajan negativan učinak na lokalnu bioraznolikost.

Plemeniti rak ima status osjetljive (engl. *vulnerable*, VU) vrste na Crvenom popisu rakova slatkih i bočatih voda Hrvatske (Gottstein i sur., 2011) i na Crvenoj listi ugroženih vrsta Međunarodnog saveza za očuvanje prirode i prirodnih bogatstava (engl. *IUCN Red List of Threatened Species; International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources*) (Edsman i sur., 2010). U sklopu zakonske zaštite na međunarodnoj razini plemeniti rak uvršten je na Dodatak III Konvencije o zaštiti europskih divljih vrsta i prirodnih staništa (Bernska konvencija) te na Dodatak V Direktive o zaštiti prirodnih staništa i divlje faune i flore. Na nacionalnoj razini zaštićen je Zakonom o zaštiti prirode (NN 80/13) i Pravilnikom o strogo zaštićenim vrstama (NN 144/2013) (Maguire, 2014).

## 1.2. Genetska raznolikost

Genetska raznolikost jest raznolikost alela i genotipova prisutnih u istraživanoj skupini, bilo da se radi o populaciji, vrsti ili skupini vrsta (Frankham i sur., 2002) koja nastaje kao posljedica mutacija i rekombinacija (Freeland, 2005). Ona predstavlja evolucijski potencijal vrste i ključna je za sposobnost prilagodbe na promjene koje se događaju u okolišu (Ellegren, 2009). Učinak evolucijskih sila poput prirodnog odabira, toka gena (engl. *gene flow*) i genetskog pomaka (engl. *genetic drift*) na genetsku raznolikost i evoluciju ovisi o količini genetske varijacije koja je već prisutna u populaciji (Ewens, 2004). Opažena je pozitivna korelacija između genetske raznolikosti i veličine populacije odnosno areala koje ona nastanjuje. Vrste sa širim arealom imat će veću genetsku raznolikost od izoliranih ili otočnih populacija i ugroženih vrsta (Frankham, 1996). Razni faktori poput fragmentacije staništa, akumulacije letalnih alela i pada brojnosti populacije primjerice zbog prolaska kroz takozvano usko grlo (engl. *bottleneck*) mogu utjecati na gubitak genetske raznolikosti (Allendorf, 2002). Pad brojnosti populacije nerijetko rezultira parenjem u srodstvu (engl. *inbreeding*) čije međudjelovanje s fragmentacijom i gubitkom genetske raznolikosti u konačnici može prouzročiti vorteks izumiranja (engl. *extinction vortex*) (Frankham i sur., 2002).

Genetska raznolikost jedinki opisuje se udjelom heterozigotnih lokusa ili alela na svakom lokusu (Hedrick, 2000), a na razini populacije pomoću pokazatelja poput prosječnog broja alela po lokusu ( $N_A$ ), broja privatnih alela u populaciji ( $A_{PR}$ ), alelnog bogatstva ( $A_R$ ), očekivane ( $H_E$ ) i opažene heterozigotnosti ( $H_O$ ) i drugih (Nei, 1973; Lacy, 1997). Populacijska genetika znanstvena je disciplina koja proučava genetsku raznolikost i strukturu, odnosno učestalost alela i genotipova unutar i između populacija (Chakraborty, 2006).

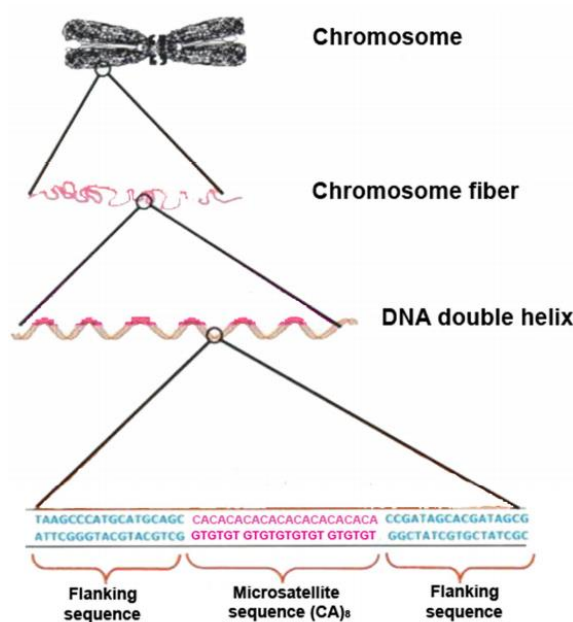
Konzervacijska genetika bavi se istraživanjem genetske raznolikosti primjenom različitih molekularnih metoda u svrhu očuvanja vrsta i smanjena njihovog rizika od izumiranja. Različiti molekularni markeri pokazali su se izrazito korisni u istraživanjima genetske raznolikosti (Frankham i sur., 2002)

Markeri mogu biti DNA (molekularni) ili proteinski. Proteinski podrazumijevaju korištenje alozima, alelnih formi protein kodirajućih lokusa koji se mogu detektirati elektroforezom (Allendorf, 2017). Genetski marker ili biljeg jest DNA sekvenca poznate lokacije na kromosomu koju se povezuje sa specifičnim genom ili značajkom (Avise, 1994). Molekularni markeri mogu se podijeliti u dvije klase ovisno o načinu nasljeđivanja i evolucijskoj dinamici: markere jezgrine DNA (nuDNA) i markere mitohondrijske DNA (mtDNA) (Park i Moran, 1994).

Markeri nuDNA poput nasumično umnožene polimorfne DNA (engl. *random amplified polymorphic DNA*, RAPD), polimorfizma duljine umnoženih fragmenata (engl. *amplified fragment length polymorphism*, AFLP), polimorfizma pojedinačnih nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP) i varijabilnog broja uzastopno ponavljajuće sekvence (engl. *variable number tandem repeat*, VNTR), kojima pripadaju i mikrosateliti, nasljeđuju se od oba roditelja. Markeri mtDNA nasljeđuju se po majci, pokazuju visoku mutacijsku stopu i ne rekombiniraju (Ferguson i Danzmann, 1998). Istovremeno korištenje različitih molekularnih markera pospješuje procjenu genetske varijabilnosti unutar populacije, ali i između populacija (Panicz i sur., 2019).

### 1.2.1. Mikrosateliti

Mikrosateliti ili jednostavne ponavljajuće sekvence (engl. *simple sequence repeats*, SSR; *short tandem repeats*, STR) sekvence su kratkih motiva 1-6 nukleotida uzastopno ponovljenih do 100 puta koje su raspoređene u genomu eukariota i prokariota, a mogu se pronaći u kodirajućoj i nekodirajućoj, jezgrenoj i organelnoj DNA (Phumichai i sur., 2015). Ponovljeni motivi omeđeni su neponavljajućim, jedinstvenim DNA sekvencama koje definiraju mikrosatelitni lokus (Slika 4.).



**Slika 4.** Grafički prikaz mikrosatelita na određenom kromosomskom lokusu jezgrene DNA.

Dinukleotidni ponavljajući motiv (CA)<sub>n</sub> omeđen jedinstvenim sekvencama široko je rasprostranjen u eukariotskim genomima.

(Preuzeto iz Thitaram, 2009)



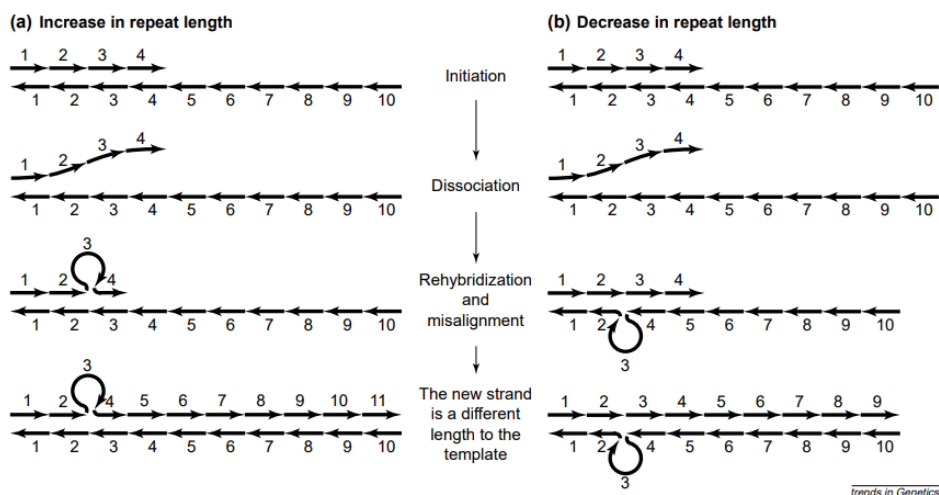
Mikrosateliti se ovisno o vrsti ponovljene sekvence mogu klasificirati kao savršeni, nesavršeni, prekinuti i sastavljeni. Savršena ponavljajuća sekvenca nije prekinuta niti jednom bazom koja nije sastavnica ponavljajućeg motiva (npr. TATATATATATATATA). U nesavršenoj mikrosatelitnoj sekvenci nalazi se par baza koji ne odgovara ponavljajućem motivu (npr. TATATATATCTATATA). U prekinutom mikrosatelitu nalazi se kratka sekvenca koja ne odgovara sekvenci ponavljajućeg motiva (npr. TATATACGTGTATATATATA). U slučaju sastavljenog mikrosatelita sekvenca se sastoji od dvije različite, naslonjene ponavljajuće sekvence (npr. TATATATATAGTGTGTGTGTGTGT) (Oliveira i sur., 2006). Za razliku od jedinstvenih DNA sekvenci, polimorfnost mikrosatelita uglavnom proizlazi iz varijabilnosti u duljini, a ne iz razlika u primarnoj sekvenci (Ellegren, 2004). Međutim, mikrosatelitni se aleli osim po broju ponovljenih motiva mogu razlikovati i po strukturi ponovljene sekvence (Primmer i sur., 1998).

Mikrosateliti su kodominantni, izrazito polimorfni, lako se klasificiraju i nasljeđuju se po Mendelovim zakonima nasljeđivanja zbog čega su prikladni za otkrivanje razlika između vrlo srodnih vrsta (Abdul-Muneer, 2014). Postoje čvrsti dokazi da mikrosateliti osim neutralnog učinka na genom imaju i neke funkcije poput reguliranja ekspresije eukariotskih gena (O'Donnell i sur., 1994).

Iako ne postoji uniformna mikrosatelitna mutacijska stopa, ona se razlikuje između lokusa i alela, a posljedično tome i između vrsta (Ellegren, 2000), poznato je da je mnogo viša od mutacijske stope drugih dijelova genoma (Jarne i Lagoda, 1996). Duljina mikrosatelita najvažniji je dosada otkriven faktor koji utječe na mutacijsku stopu, stopa se povećava s povećanjem broja ponovljenih motiva (Ellegren, 2004).

Predloženo je nekoliko mehanizama pomoću kojih bi se objasnila visoka mutacijska stopa mikrosatelita poput grešaka tijekom rekombinacije, nejednake homologne rekombinacije (engl. *crossing over*) i replikacijskog proklizavanja polimeraze tijekom replikacije ili popravka DNA (Strand i sur., 1993). Promjene u duljini mikrosatelitne DNA uglavnom se pripisuju replikacijskom proklizavanju prilikom kojeg se DNA lanci privremeno razdvoje i zatim ubrzo ponovno spoje uz određeno neporavnanje. Ukoliko je došlo do lošeg poravnanja novonastajućeg lanca, nastavak replikacije rezultirat će u produljenju ili skraćivanju spomenutog lanca u usporedbi s duljinom lanca koji služi kao kalup. Neporavnanje može prouzrokovati pojavu petlje na novonastajućem lancu zbog koje će doći do produljenja istog.

Petlja nastala na lancu kalupu rezultirat će skraćivanjem duljine novonastalog lanca (Levinson i Gutman, 1987). Većina ovakvih mutacija popravljena je sustavom za popravak pogrešno sparenih baza (engl. *mismatch-repair system*, MMR), a samo mali postotak mutacija koje ne budu popravljene postanu mikrosatelitni mutacijski događaji (Strand i sur., 1993) (Slika 5.).



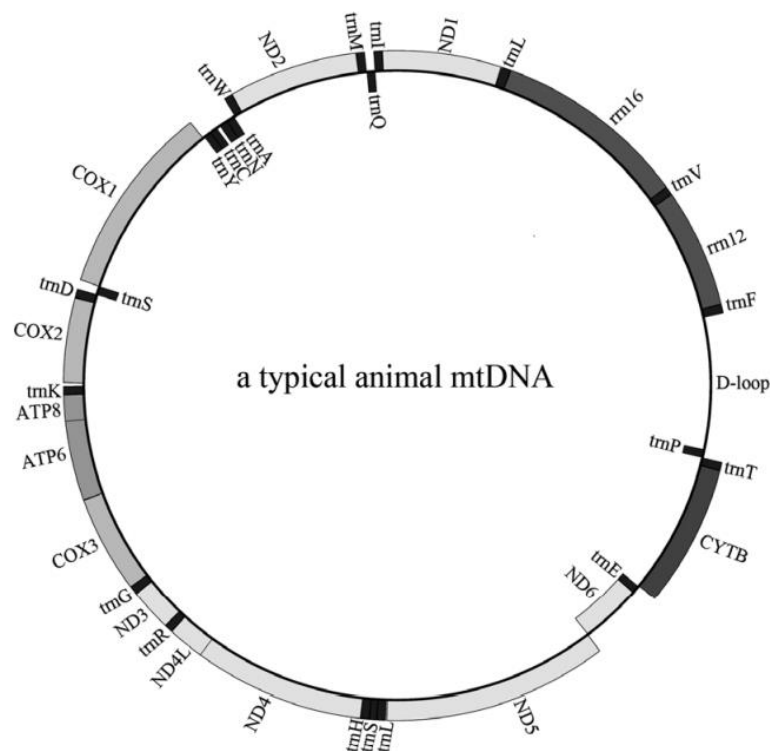
**Slika 5.** Replikacijsko proklizavanje kao mutacijski mehanizam mikrosatelita.  
(Preuzeto iz Ellegren, 2000)

Mutacijski modeli koriste se kako bi se ispravno odredili populacijsko-genetički parametri dobiveni iz podataka vezanih uz analizu mikrosatelita (Oliveira i sur., 2006). Predloženo je nekoliko modela evolucijske dinamike mikrosatelita od kojih je većina proizašla iz modela postupnih mutacija. Taj model pretpostavlja da novi aleli nastaju dobitkom ili gubitkom jednog ponavljajućeg mikrosatelitnog motiva (Ohta i Kimura, 1973). Model beskonačnog broja alela pretpostavlja da svakom mutacijom nastaje nov alel (Kimura i Crow, 1964). Dvofazni model pretpostavlja da većina mutacija slijedi model postupnih mutacija, ali dozvoljava i određen postotak promjena po modelu beskonačnog broja alela (Di Rienzo i sur., 1994).

Mikrosateliti su popularni kao markeri u molekularnoj ekologiji, populacijskoj genetici, konzervacijskoj biologiji i upravljanju zavičajnim vrstama (Ellis i sur., 2011). Mikrosateliti koji se nalaze u regiji DNA koja ne kodira za gene idealni su markeri za određivanje populacijske strukture (de Vasconcellos i sur., 2015), protoka gena (McKeown i sur., 2017), genetske raznolikosti i genetske udaljenosti u prirodnim populacijama (Baillie i sur., 2016), ali i za procjenu razine parenja u srodstvu (Hillen i sur., 2017) i analizu očinstva u pripitomljenim i kultiviranim vrstama (Harrison i sur., 2014).

## 1.2.2. Mitohondrijska DNA

Mitohondrijska DNA dvolančana je molekula smještena u matriksu mitohondrija. mtDNA svih višestaničnih životinja i nekih protista sadrži istih 36 odnosno 37 gena: 2 za ribosomsku RNA, 22 za transportnu RNA i 12 ili 13 gena koji kodiraju za podjedinice proteina unutrašnje membrane mitohondrija (De La Cruz i sur., 1984; Wan i sur., 2004) (Slika 6.). Mitohondrijska DNA dugačka je 15 – 20 kb, u stanici je zastupljena velikim brojem kopija, a za razliku od nuDNA ne sadrži ponavljajuće sekvence i nasljeđuje se samo po majčinoj liniji (Wilson i sur., 1985).



**Slika 6.** Kružni prikaz životinjske mitohondrijske DNA (mtDNA) koja sadrži 37 gena uključujući i one za podjedinicu 1 citokrom c oksidaze (na slici *COX1*) i *16S* ribosomske RNA (na slici *rrn16*).

(Preuzeto iz Tao i sur., 2014)

Visoke mutacijske stope mtDNA uzrokovane su nedostatkom zaštitnih histona, manjkavim sustavom popravka DNA i konstantnom izloženošću mutagenim učincima kisikovih radikala nastalih oksidativnom fosforilacijom (Miyazono i sur., 2002). Iako mtDNA evoluira brže od jezgrine DNA, evolucijske stope razlikuju se između pojedinih dijelova mtDNA i zbog toga se koristi u istraživanju raznih filogenetskih odnosa (Wan i sur., 2004).

Analiza sekvenci različitih mitohondrijskih gena koristi se za analizu porijekla i procjenu diferencijacije populacija mnogih vrsta (Ferguson i Danzmann, 1998). Gen za *16S* rRNA uglavnom se koristi za filogenetička istraživanja na srednjim sistematskim razinama poput porodica i vrlo rijetko rodova (Hwang i Kim, 1999). Mitohondrijski geni koji kodiraju za proteine, poput gena za *COI*, evoluiraju brže od mitohondrijskih gena za rRNA i koriste se za određivanje evolucijske povijesti na nižim sistematskim razinama poput porodica, rodova i vrsta (Wan i sur., 2004).

### **1.3. Dosadašnja istraživanja**

Schrimpf i sur. (2011) proveli su prvo opsežno filogeografsko istraživanje plemenitog raka na temelju dijela gena za *COI*. Područje istraživanja obuhvatilo je većinu prirodne rasprostranjenosti raka, a rezultati su dali odgovore o genetskoj strukturi vrste. Raznolikost *COI* haplotipova bila je vrlo mala u središnjoj Europi u usporedbi s velikom raznolikosti haplotipova u jugoistočnoj Europi. Haplotipovi zapadnog Balkana bili su znatno diferencirani od onih iz donjeg dunavskog sliva, što je upućivalo na postojanje barem dva refugija u tom području.

Gross i sur. (2013) proveli su prvo populacijsko-genetičko istraživanje plemenitog raka velikih geografskih razmjera koristeći mikrosatelitne markere. U istraživanju su koristili uzorke iz baltičkog i crnomorskog sliva. Rezultati su ukazali na postojanje dvije jasno diferencirane grupe, jedne koja je uključivala populacije baltičkog sliva i druge koja je obuhvatila populacije crnomorskog sliva. Populacije baltičkog sliva bile su značajno manje genetski varijabilne i imale su manji broj privatnih alela u usporedbi s populacijama crnomorskog sliva.

Schrimpf i sur. (2014) istraživali su genetsku strukturu plemenitog raka u središnjoj Europi pomoću gena za *COI* i *16S* rRNA te mikrosatelita. Uzorkovanje su proveli na području pet europskih morskih slivova: sjevernomorskog, baltičkog, crnomorskog, jadranskog i egejskog. Zabilježili su veliki stupanj diferencijacije između populacija zapadnog Balkana i populacija crnomorskog sliva, a najveću genetsku raznolikost opazili su na području crnomorskog sliva. Filogenetičke analize ukazale su na postojanje četiri evolucijske linije: L1, L2, L3 i L4. Uz pomoć migracijskih modela otkrili su da su kolonizacije sjevernomorskog i baltičkog sliva tekle neovisno jedna o drugoj putem različitih migracijskih ruta iz istočnog crnomorskog sliva s tim da područje zapadnog Balkana nije doprinijelo spomenutim kolonizacijama, ali je vjerojatno doprinijelo kolonizaciji donjeg dijela dunavskog sliva.

Laggis i sur. (2017) koristili su mikrosatelitne lokuse kako bi istražili genetsku strukturu plemenitih rakova u Grčkoj, a mitohondrijski markeri *16S* i *COI* poslužili su im u istraživanju filogenetskih odnosa plemenitih rakova Europe. Otkrili su veliku genetsku raznolikost populacija južnog Balkana odnosno Grčke i njihovu jasnu diferenciranost od ostalih europskih populacija. Filogenetičke analize rezultirale su podjelom europskih haplotipova u šest filogrupa odnosno evolucijskih linija: G1, G2, G3, G4, G5 i G6. Linije G1 i G2 sastojale su se od grčkih haplotipova i identificirane su prvi put, dok su haplotipovi u grupama G3-G6 identični s prethodno opisanima u Schrimpf i sur. (2014).

Gross i sur. (2021) istraživali su populacije plemenitog raka na zapadnom Balkanu. Proveli su filogenetičku analizu pomoću mtDNA gena *COI* i *16S* te istražili populacijsko-genetičku strukturu istraživane vrste pomoću 15 mikrosatelitnih lokusa. Otkrili su nove mitohondrijske haplotipove u najzapadnijim od istraživanih populacija, a analiza mikrosatelita pokazala je kako je u tim populacijama očuvana značajna količina genetske raznolikosti plemenitog raka kao vrste. Rezultati su potvrdili ulogu zapadnog Balkana kao važnog (mikro)refugija plemenitog raka tijekom klimatskih oscilacija u Pleistocenu.

#### **1.4. Cilj istraživanja**

Cilj ovog istraživanja je odrediti genetsku raznolikost i strukturu 12 hrvatskih i jedne sjevernomakedonske populacije plemenitog raka (*A. astacus*) analizom 15 mikrosatelitnih lokusa te izraditi filogenetsko stablo i haplotipsku mrežu analizom mtDNA gena za *COI* i *16S* rRNA, a sve u svrhu boljeg razumijevanja filogenetskih odnosa unutar i među istraživanim populacijama. Dobiveni će rezultati biti iskorišteni u izradi konzervacijskih planova plemenitog raka.

## 2. Materijali i metode

### 2.1. Područje istraživanja i materijal

U razdoblju od 2017. do 2019. godine na području Hrvatske, točnije od zapadne Slavonije do Gorskog kotara i Like, rukama i vršama hvatani su plemeniti rakovi (Maguire i sur., 2018). U ovom radu proučavano je 12 hrvatskih populacija čiji nazivi odgovaraju lokacijama slatkovodnih staništa na kojima su uzorkovane: Motičnjak (MOT), Bednja (BED), Ilova (ILO), Bijela (BIJ), Soboština (SLO), Veličanka (VEL), Kutjevačka rijeka (KUT), Breznica (BRE), Glogovica (GLO), Kikovac (KIK), Burgeti (BUR) i Otuča (OTU) (Slika 7.) (Tablica 2.).



**Slika 7.** Lokacije 12 proučavanih populacija plemenitog raka u Hrvatskoj.

Uhvaćenim jedinkama uzet je komadić tkiva nožice (pereopoda) i pohranjen u alkohol. Uzorci su skladišteni u hladnjaku. Od ukupnog broja uzoraka prikupljenih u istraživanju Maguire i sur. (2018) 266 uzoraka iz 12 populacija uključeno je u populacijsko-genetičke analize mikrosatelitnih lokusa. Iako su populacije Peratovica i Mrzlovodičko jezero prvotno trebale biti obuhvaćene u populacijsko-genetičkim analizama u ovom radu, isključene su zbog premalog broja uzoraka. Od ukupnog broja uzoraka prikupljenih u istraživanju Maguire i sur. (2018) 84 uzorka iz 12 spomenutih populacija uključeno je u filogenetičke analize gena mtDNA *16S* i *COI*. Osim hrvatskih uzoraka, u sve analize uključeni su i uzorci sjevernomakedonske populacije Mantova (Tablica 2.).

**Tablica 2.** Podaci o uzorcima *A. astacus* i lokacijama uzorkovanja. Stupac Mikrosateliti označava broj uzoraka proučavanih u populacijsko-genetičkim analizama mikrosatelitnih lokusa, a stupac mtDNA broj uzoraka proučavanih u filogenetičkim analizama mtDNA gena *COI* i *16S*.

Populacija	Skraćenica	Stanište	Pritoka	Morski sliv	Mikrosateliti	mtDNA
Motičnjak	MOT	jezero	Drava/Dunav	crnomorski	21	5
Mantova	MAN	jezero	Lakavica/Bregalnica	egejski	9	8
Breznica	BRE	rijeka	Sava/Dunav	crnomorski	14	5
Burgeti	BUR	jezera	Sava/Dunav	crnomorski	19	16
Ilova	ILO	rijeka	Sava/Dunav	crnomorski	20	6
Otuča	OTU	rijeka	Zrmanja	jadranski	9	5
Bijela	BIJ	rijeka	Sava/Dunav	crnomorski	22	16
Glogovica	GLO	rijeka	Sava/Dunav	crnomorski	28	5
Kikovac	KIK	rijeka	Sava/Dunav	crnomorski	30	5
Bednja	BED	rijeka	Drava/Dunav	crnomorski	30	9
Kutjevačka rijeka	KUT	rijeka	Sava/Dunav	crnomorski	16	4
Sloboština	SLO	rijeka	Sava/Dunav	crnomorski	27	6
Veličanka	VEL	rijeka	Sava/Dunav	crnomorski	30	4

## 2.2. Pribor

Tehnički pribor i uređaji:

- zaštitne rukavice
- mikropipete
- nastavci za mikropipete
- mikroeprovete
- PCR mikroeprovete
- poklopci za PCR mikroeprovete
- stalci za eprovete
- Erlenmeyerova tikvica
- kadice za pripremu agaroznog gela
- vorteks miješalica
- analitička vaga
- vodena kupelj
- uređaj za centrifugu
- uređaj za elektroforezu
- uređaj za vizualizaciju gela
- uređaj za PCR
- digitalni fotoaparati
- mikrovalna pećnica
- računalo

Kemikalije:

- etanol
- Promega Buffer (Promega)
- HotStart DNA Polymerase (Qiagen)
- dNTP-ovi
- MgCl<sub>2</sub>
- GoTaq FlexiBuffer (Promega)
- GoTaq G2 HotStart Polymerase (Promega)
- Type-it Multiplex PCR Master Mix (Qiagen)
- Exonuclease I (New England Biolabs Inc.)
- Antarctic phosphatase (New England Biolabs Inc.)



- TAE pufer
- agarozna
- Midori Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics Europe)

Elektroforetski standard:

- Quick-Load 100 bp DNA ladder (New England BioLabs Inc.)
- Quick-Load 1 kb DNA ladder (New England BioLabs Inc.)

Kit:

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

Oligonukleotidne početnice:

- LCO-1490 (Folmer i sur., 1994)
- HCO-2198 (Folmer i sur., 1994)
- 16Sbr (Simon i sur., 1994)
- 16Sar (Simon i sur., 1994)
- Aast4\_2 (Gross i sur., 2017)
- Aast4\_17 (Gross i sur., 2017)
- Aast4\_46 (Gross i sur., 2017)
- Aast4\_20 (Gross i sur., 2017)
- Aast4\_38 (Gross i sur., 2017)
- Aast4\_16 (Gross i sur., 2017)
- Aast4\_35 (Gross i sur., 2017)
- Aast4\_19 (Gross i sur., 2017)
- Aast4\_37 (Gross i sur., 2017)
- Aast4\_7 (Gross i sur., 2017)
- Aast4\_42 (Gross i sur., 2017)
- Aast4\_32 (Gross i sur., 2017)
- Aast4\_48 (Gross i sur., 2017)
- Aast4\_26 (Gross i sur., 2017)
- Aast4\_44 (Gross i sur., 2017)

### 2.3. Rad u laboratoriju

Ukupna genomska DNA izolirana je iz tkiva po protokolu GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit. Dobiveni uzorci genomske DNA skladišteni su u hladnjaku do daljnje upotrebe.

Lančanom reakcijom polimeraze umnožila sam molekule DNA odnosno markere od interesa.

15 tetranukleotidnih mikrosatelitnih lokusa (Gross i sur., 2017) (Tablica 3.) umnožila sam multipleks PCR metodom. Ukupni volumen reakcijske smjese iznosio je 10  $\mu$ l. Smjesa se sastojala od 1 x Type-it Multiplex PCR Master Mix-a, 200 - 400 nM svake početnice i otprilike 5 ng/ $\mu$ l DNA kalupa. Za svaki lokus koristila sam uzvodne (engl. *forward*) i nizvodne (engl. *reverse*) početnice. Uzvodne početnice bile su obilježene jednom od četiri fluorescentne boje: FAM6 (plava), VIC (zelena), PET (crvena) ili NED (žuta) (Tablica 3.). Za PCR sam odabrala tzv. *touchdown* program, a sama reakcija sastojala se od nekoliko uzastopnih koraka. Nakon početne denaturacije u trajanju od 5 minuta na 95°C uslijedilo je 20 ciklusa. Svaki ciklus sastojao se od 30 sekundi denaturacije na 95°C, 90 sekundi vezanja početnica na 60°C i 30 sekundi produljivanja lanaca na 72°C, s tim da se temperatura vezanja smanjivala za 0,5°C u svakom ciklusu. Nakon toga uslijedilo je 10 ciklusa, a svaki se ciklus sastojao od 30 sekundi denaturacije na 95°C, 90 sekundi vezanja početnica na 50°C i 30 sekundi produljivanja lanaca na 72°C. Završno produljivanje lanaca na 60°C trajalo je 30 minuta.

**Tablica 3.** Podaci o mikrosatelitnim lokusima i početnicama korištenim u PCR-u.

Lokus	Ponavljajući motiv	Fluorescentna boja	Sekvenca uzvodne 5'-3' početnice	Sekvenca nizvodne 5'-3' početnice
Aast4_2	ACCT	6FAM	AACCCATCCCTCCTACG TCT	GGAGGGACATTGAATA ACGG
Aast4_17	ACGC	6FAM	CCGCGCTAGTAACTTG TCC	GTTGGTTGTGAGCCGA CAGT
Aast4_46	ACAT	6FAM	AGTCAAACAAGCCTAG CACG	TGAGTACAACGCTAAA GTTAATATGTC
Aast4_20	AGCC	NED	CGTTACCCTTCCATATT GGC	TTATAAATGTCTGCAG CTCCC
Aast4_38	ACAT	NED	TGTTAACCGATTGGAGG GTC	TCATATTCCAATTCCGC CTC
Aast4_16	ACGC	PET	GGTGTCTCGCGAAATGT AAA	TAGATGAATGGGCAGG AAGC
Aast4_35	ACAG	PET	CGTTCTCAACACGCAAA CTT	CAGACCTTGAGCATGA CCGT
Aast4_19	ACAT	VIC	TTGTTTCGTGTTAATTC ACTTTGG	CATCCTCTCGCTTCAGT TGC
Aast4_37	ACAT	VIC	TGGCTAAGACCAGATCT CAACA	TCTGGCACTGAAGGAG TTCT
Aast4_7	ACAT	6FAM	ATGAAGCTTGAGAAGG CCTATG	TGGTTAACATAACTGA TGTGGGA
Aast4_42	AGGC	6FAM	AAGCCACTAATATGCA GTCATTT	GAAATTTAATATCCAT CGCCC
Aast4_32	ACAT	NED	ACCTATGTTTGTGTCT ATATGGATCT	CGCCCTCCCTCAATATA GC
Aast4_48	ACAT	NED	GCAATTTCAAACAGGCT TCA	CCCGCCTTTAAATGTTT AGC
Aast4_26	AGGC	PET	TTCTGGTGGATGACATG AGC	TGCGCGATAAAGTTGA AAGA
Aast4_44	ACAG	VIC	GGAACATTCTTTATTGG CAGG	TCACCTACCCAACATG TCTCA

Osim mikrosatelitnih lokusa, PCR-om su umnoženi i mitohondrijski geni za *COI* i *16S* rRNA. Ukupni volumen reakcijske smjese za *COI* iznosio je 25  $\mu$ l. Smjesa se sastojala od 10-50 ng/ $\mu$ l DNA kalupa, 1,5 mM Promega Buffer-a, 0,04 U HotStart Polymerase, 0,15 mM svakog dNTP-a, 0,7 mM MgCl<sub>2</sub> i 0,4  $\mu$ M svake početnice. U reakciji je korišten par početnica LCO-1490/HCO-2198 (Folmer i sur., 1994) (Tablica 4.). Reakcija se odvila u nekoliko koraka pod određenim uvjetima. Nakon početne denaturacije u trajanju od 3 minute na 94°C uslijedilo je 35 ciklusa. Svaki ciklus sastojao se od 30 sekundi denaturacije na 94°C, 60 sekundi vezanja početnica na 48°C i 60 sekundi produljivanja lanaca na 72°C. Završno produljivanje lanaca na 72°C trajalo je 10 minuta.

Ukupni volumen reakcijske smjese za *16S* iznosio je 10  $\mu$ l. Smjesa se sastojala od 0,05 U GoTaq G2 HotStart Polymerase, 1,5 mM GoTaq FlexiBuffer-a, 0,2 mM svakog dNTP-a, 0,275  $\mu$ M svake početnice i 10-50 ng/ $\mu$ l DNA kalupa. U reakciji je korišten par početnica 16Sar/16Sbr (Simon i sur., 1994) (Tablica 4.).

Reakcija se odvila u nekoliko koraka pod određenim uvjetima. Nakon početne denaturacije u trajanju od 3 minute na 95°C, uslijedilo je 40 ciklusa. Svaki ciklus sastojao se od 60 sekundi denaturacije na 95°C, 60 sekundi vezanja početnica na 52°C i 60 sekundi produljivanja lanca na 72°C. Završno produljivanje lanaca na 72°C trajalo je 5 minuta.

**Tablica 4.** Podaci o početnicama mtDNA markera korištenim u PCR-u.

Marker	Naziv početnice	Sekvenca početnice
<i>COI</i>	LCO-1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG
	HCO-2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA
<i>16S</i>	16Sbr	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT
	16Sar	CGCCTGTTTATCAAAAACAT

Uspješnost umnažanja PCR-om i veličina dobivenih fragmenata DNA provjerila sam gel elektroforezom. 1%-tni gel pripremila sam otapanjem agaroze u 1 x TAE puferu s dodatkom boje za vizualizaciju PCR produkata Midori Green Advance DNA Stain. Za određivanje veličina DNA fragmenata mikrosatelitnih lokusa koristila sam Quick-Load 100 bp DNA ladder elektroforetski standard, a za određivanje veličina DNA fragmenata mtDNA markera Quick-Load 1 kb DNA ladder elektroforetski standard. Elektroforeza je trajala 13 minuta na 120 V. Nakon elektroforeze gelove sam prebacila u uređaj za vizualizaciju gelova (transiluminator) i fotografirala digitalnim fotoaparatom.

Pročišćavanje PCR produkta dobivenih umnažanjem mtDNA markera provedeno je pomoću EXOAnP Mix-a pripremljenog miješanjem 20 U/ml Exonuclease I i 5 U/ml Antarctic phosphatase.

Uzorci su zatim poslani u komercijalni servis Macrogen, Inc. na sekvenciranje. Za sekvenciranje mtDNA markera korištene su iste uzvodne početnice kao i za PCR. Genotipizacija mikrosatelitnih lokusa provedena je pomoću uređaja Applied Biosystems 3500 Genetic Analyser (Life Technologies) uz korištenje internog GeneScan 600 LIZ Size Standard v.2.0 veličinskog standarda.

## 2.4. Računalna obrada podataka

### 2.4.1. Analize mikrosatelitnih lokusa

#### 2.4.1.1. Genotipizacija

Elektroferograme dobivene genotipizacijom analizirala sam programom GeneMapper v.5 (Life Technologies) kako bih odredila duljinu alela proučavanih mikrosatelitnih lokusa. Dobivene podatke spremila sam u tablice za daljnje analize.

Prisutnost mogućih grešaka nastalih tijekom genotipizacije provjerila sam programom MICRO-CHECKER v.2.2.3 (Van Oosterhout i sur., 2006). Greške mogu nastati zbog neuspješnog umnažanja alela tijekom PCR-a (engl. *null alleles*), DNA fragmenata koji su produkti proklizavanja polimeraze (engl. *stutter bands*) ili lošijeg umnažanja duljih alela u odnosu na one kraće (engl. *large allele dropout*).

Frekvenciju tzv. nul alela provjerila sam programom FreeNA (Chapuis i Estoup, 2007) pri čemu je broj ponavljanja iznosio 10 000.

#### 2.4.1.2. Procjena genetske raznolikosti populacija

Polimorfnost lokusa ( $P$ ), prosječan broj alela ( $N_A$ ), broj privatnih alela ( $A_{PR}$ ), opaženu heterozigotnost ( $H_O$ ), nepristranu očekivanu heterozigotnost ( $uH_E$ ) i nepristranu Nei genetsku udaljenost ( $D_A$ ) izračunala sam u programskom dodatku GenAlEx v.6.5 (Peakall i Smouse, 2012) Microsoft Excela.

Alelno bogatstvo ( $A_R$ ), fiksacijski indeks ( $F_{ST}$ ) i indeks križanja u bliskom srodstvu ( $F_{IS}$ ) izračunala sam u programu FSTAT v.2.9.3.2 (Goudet, 2001). Korigirane vrijednosti fiksacijskog indeksa s obzirom na prisutnost nul alela izračunala sam u programu FreeNa. Značajnost razlike vrijednosti fiksacijskih indeksa s i bez nul alela provjerila sam t-testom u Microsoft Excel-u.

Odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže i neravnotežu vezanosti gena (engl. *linkage disequilibrium*, LD) testirala sam u programu GENEPOP v.4.7.5. (Rousset, 2008) metodom Markovljevih lanaca (Guo i Thompson 1992; Raymond i Rousset 1995) pri čemu je broj dememorizacija iznosio 10 000, broj obrada 100 i broj iteracija 5000. Granična vrijednost statističke značajnosti rezultata korigirana je Bonferroni korekcijom (Rice, 1989) zbog velikog broja provedenih statističkih testova.

Prisutnost značajnog viška heterozigotnosti koji upućuje na nedavni prolazak populacija kroz tzv. usko grlo provjerila sam programom Bottleneck v.1.2.02 (Cornuet i Luikart, 1999) pri čemu sam odabrala tri testa (tzv. *sign test*, *standardized differences test* i Wilcoxonov test zbroja rangova (engl. *Wilcoxon sign rank test*)) i tri mutacijska modela: IAM, SMM i TPM.

### **2.4.1.3. Procjena genetske strukture populacija**

Analizu glavnih koordinata provela sam u programskom dodatku GenAlEx v.6.5 (Peakall i Smouse, 2012) Microsoft Excel-a na temelju nepristranih Nei  $D_A$  genetskih udaljenosti kako bih utvrdila postoji li grupiranje između populacija.

Neukorijenjeni dendrogram dobiven metodom susjednog sparivanja (Saitou i Nei, 1987) temeljen na matrici Nei  $D_A$  genetskih udaljenosti (Nei i sur., 1983) izradila sam u programu POPULATIONS v.1.2.32 (Langella, 1999) kako bih vizualizirala odnose među populacijama. Broj ponavljanja iznosio je 1000. Dendrogram sam vizualizirala u programu MEGA X (Kumar i sur., 2018) i grafički uredila u programu Inkscape v.1.0.

Analizu molekularne varijance provela sam u programu Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier i sur., 2005) kako bih procijenila hijerarhijsku raspodjelu genetske raznolikosti. Populacije sam grupirala prema njihovoj pripadnosti slivovima rijeka Save, Drave, Zrmanje i Lakavice.

Pripadnost jedinki pojedinim genetskim skupinama (klasterima) provjerila sam u programu STRUCTURE v.2.3.4 (Pritchard i sur., 2000). Najvjerojatniji broj populacija definirala sam rasponom vrijednosti 1-13, a broj iteracija za svaku vrijednost iznosio je 10. Tzv. *burn in period* iznosio je 100 000, a broj ponavljanja simulacije Monte Carlo Markovljevi lanci (engl. *Monte Carlo Markov chain*, MCMC) 100 000. Najvjerojatniji broj genetskih skupina ( $\Delta K$ ) procijenila sam u mrežnom programu STRUCTURE HARVESTER (Earl i von Holdt, 2012) pomoću Evanno metode (Evanno i sur., 2005). Rezultate sam vizualizirala pomoću mrežnog programa CLUMPAK (Kopelman i sur., 2015).

## **2.4.2. Analize mitohondrijskih gena**

### **2.4.2.1. Uređivanje sekvenci**

Sekvence mitohondrijskih gena pregledane su i uređene u programu SEQUENCHER v.5.3 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor), a zatim višestruko savnjene u programu MAFFT v.7.187 (Kato i Standley, 2013). Nakon savnjivanja, duljina sekvence fragmenta gena za *COI* iznosila je 350 pb, a duljina sekvence gena za *16S* 476 pb. Sve već dostupne sekvence spomenutih gena za vrstu plemenitog raka preuzete su iz mrežne baze podataka GenBank. Sekvence dva različita mitohondrijska gena dobivene iz istih jedinki (*COI* + *16S* rRNA) konkatenirane su i kolabirane u haplotipove pomoću mrežnog servisa FaBox (Villesen, 2007) kako bi se dobivene filogenetske rekonstrukcije mogle usporediti s onima iz prijašnjih istraživanja (Schrimpf i sur., 2011, 2014; Laggis i sur., 2017; Gross i sur., 2021). Duljina konkateniranih sekvenci iznosila je 826 pb s jednim praznim mjestom (engl. *gap*) u *16S* sekvenci. Broj konkateniranih haplotipova iznosio je 89.

### **2.4.2.2. Odabir optimalnog modela evolucije**

Optimalan model nukleotidne supstitucije za svaku gensku particiju konkateniranog seta podataka odabrala sam pomoću programa jModelTest (Darriba i sur., 2012) koristeći Bayesov informacijski kriterij. Odabrani model za oba gena bio je HKY+I.

### **2.4.2.3. Izrada haplotipske mreže**

Za izradu haplotipske mreže koristila sam konkatenirane sekvence. Mrežu sam izradila metodom statističke parsimonije (TCS) (Templeton i sur., 1992) u programu PopART v.1.7 (Leigh i Bryant, 2015) pri čemu nisam mijenjala zadane parametre. Mrežu sam grafički uredila u programu Inkscape v.1.0. Radi uklapanja rezultata u već postojeće filogenetske rekonstrukcije preuzela sam nazivlje evolucijskih linija iz Schrimpf i sur. (2014) odnosno grupa iz Laggis i sur. (2017).

### **2.4.2.4. Izrada filogenetskog stabla**

Za izradu filogenetskog stabla koristila sam konkatenirane haplotipove. Stablo sam izradila u programu BEAST v.2.6.3. (Bouckaert i sur., 2019) na mrežnom portalu CIPRES Science Gateway primjenom Bayesovske analize (engl. *Bayesian analysis*, BA). Uz model nukleotidne supstitucije HKY+I za oba mtDNA gena, pri rekonstrukciji sam koristila model nekoreliranog relaksiranog molekularnog sata (engl. *lognormal uncorrelated relaxed clock*).

Za *COI* sam primijenila prosječnu supstitucijsku ratu od 0,0115 mutacija/mjestu/milijun godina (Brower, 1994), a za *I6S* sam koristila procijenjeni molekularni sat. Za model grananja (engl. *tree prior*) izabrala sam tzv. *birth-death* model. MCMC simulacija sastojala se od 400 000 000 generacija s uzorkovanjem stabala svakih 10 000 generacija. Konvergenciju MCMC lanaca utvrdila sam provjeravanjem vrijednosti efektivne veličine uzorka (engl. *effective sample size*, ESS) u programu Tracer v.1.7.1. (Rambaut i sur., 2018). Optimalno stablo s najvećom vjerodostojnosti klada (engl. *maximum clade credibility*, MCC) generirala sam u programu TreeAnnotator v.2.6.3. nakon što sam iz analize isključila prvih 20% stabala (engl. *burn in*). Stablo sam grafički uredila u programima FigTree v.1.4.4. (Rambaut, 2018) i Inkscape v.1.0.



### 3. Rezultati

#### 3.1. Populacijska genetika

##### 3.1.1. Rezultati umnažanja mikrosatelitnih lokusa i genotipizacije

Svi korišteni mikrosatelitni lokusi pokazali su se kao dobroumnažajući i polimorfni. U jednom uzorku populacije KIK nije se umnožio lokus Aast4\_2, a u drugom uzorku iz iste populacije lokus Aast4\_20, dok se lokus Aast4\_37 nije umnožio u 13 uzoraka iz populacija KUT, SLO i VEL. Jedan uzorak iz populacije BIJ izbačen je iz daljnjih analiza s obzirom da se u njegovom slučaju uspješno umnožilo samo 5 od ukupno 15 proučavanih mikrosatelitnih lokusa.

Konačni set podataka koji je bio uključen u genotipizaciju sadržavao je 274 uzorka iz 13 populacija. Ukupno je zabilježeno 176 alela na 15 mikrosatelitnih lokusa. Najveći broj alela, njih 22, zabilježen je na lokusu Aast4\_17, dok je najmanji broj alela, njih 6, zabilježen na lokusima Aast4\_7 i Aast4\_19 (Tablica 5.).

Analizom nije zabilježena naznaka lošijeg umnažanja duljih alela u odnosu na one kraće (engl. *large allele dropout*) (Tablica 5.). Višak homozigota i moguća prisutnost nul alela opažena je na 9 od 15 lokusa u 10 populacija. Procijenjene frekvencije nul alela prema Chapuis i Estoup (2007) su niske; najveća frekvencija nul alela zabilježena je za lokus Aast4\_37 i iznosila je 0,094, dok je najmanja frekvencija nul alela zabilježena za lokus Aast4\_2 i iznosila je 0,009. Iako u programu MICRO-CHECKER nisu zabilježeni nul aleli na pojedinim lokusima, u programu FreeNA ipak su dobivene frekvencije nul alela za te lokuse (Tablica 5.).

Rezultati t-testa nisu pokazali značajnu razliku ( $p=0,716$ ) između  $F_{ST}$  vrijednosti i  $F_{ST}$  vrijednosti korigiranih na nul alele, stoga su svi navedeni lokusi korišteni u daljnjim analizama.

**Tablica 5.** Podaci o alelima korištenih mikrosatelitnih lokusa dobiveni genotipizacijom te provjerom frekvencije i prisutnosti nul alela.

Lokus	Raspon duljina alela	Broj alela	Populacije s nul alelima	Prosječna frekvencija nul alela
Aast4_2	83-115	7	GLO	0,009
Aast4_17	88-214	22	SLO	0,024
Aast4_46	278-322	12	/	0,020
Aast4_20	161-217	15	ILO	0,019
Aast4_38	242-286	17	VEL	0,030
Aast4_16	172-200	9	/	0,011
Aast4_35	232-280	12	BRE, BED, SLO	0,046
Aast4_19	181-205	6	/	0,010
Aast4_37	239-259	7	KUT, SLO, VEL	0,094
Aast4_7	132-152	6	/	0,017
Aast4_42	220-284	13	MOT, BUR, BIJ, SLO	0,084
Aast4_32	224-254	9	SLO	0,019
Aast4_48	272-300	8	BIJ	0,042
Aast4_26	191-263	20	/	0,045
Aast4_44	265-321	13	/	0,029

### 3.1.2. Genetska raznolikost populacija

Vrijednosti različitih pokazatelja genetske raznolikosti prikazane su u Tablici 6. U 11 od 13 populacija svi proučavani lokusi bili su polimorfni. Udio polimorfnih lokusa u populaciji MAN iznosio je 66,67%, a u populaciji SLO 93,33%. Najveći prosječan broj alela zabilježen je u populaciji BED i iznosio je 6,067, a najmanji u populacijama MAN i OTU s vrijednostima 1,733 odnosno 3,333. Prosječan broj alela za sve populacije iznosio je 4,267. Populacija ILO imala je najveću vrijednost alelnog bogatstva koja je iznosila 4,506, dok su najmanje vrijednosti zabilježene u populacijama MAN i BUR, a iznosile su 1,733 odnosno 3,164. Najveći broj privatnih alela, njih 8, zabilježen je u populaciji VEL, samo jedan privatni alel zabilježen je u populacijama BRE, BIJ i KIK, dok u populaciji BUR nije zabilježen niti jedan privatni alel. Ukupan broj privatnih alela u svim populacijama iznosio je 38. Očekivana heterozigotnost imala je najveću vrijednost 0,676 za populacije ILO i KUT, a najmanje za populacije MAN i BUR. Veća opažena heterozigotnost od očekivane heterozigotnosti zabilježena je za populacije MAN, BUR i KIK.

P vrijednosti pridružene vrijednostima indeksa križanja u bliskom srodstvu bile su statistički značajne za populacije KUT, SLO i VEL nakon korekcije granične vrijednosti alfa zbog broja statističkih testova (engl. *indicative adjusted nominal level 5%*;  $p=0,00026$ ).  $F_{IS}$  vrijednosti bile su manje od nule u populacijama MAN, BUR i KIK.

Nakon Bonferroni korekcije, u 4 od 13 populacija zabilježeno je značajno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže (Tablica 6.), a neravnoteža vezanosti gena (LD) zabilježena je za samo jedan par lokusa Aast4\_32 i Aast4\_42, uzimajući u obzir sve parove lokusa u svim populacijama, što ne utječe na rezultate.

**Tablica 6.** Vrijednosti pokazatelja genetske raznolikosti populacija. P – polimorfnost lokusa, N<sub>A</sub> – prosječan broj alela, A<sub>R</sub> – alelna bogatstvo, A<sub>PR</sub> – broj privatnih alela, H<sub>O</sub> – opažena heterozigotnost, uH<sub>E</sub> – nepristrana očekivana heterozigotnost, F<sub>IS</sub> – indeks križanja u bliskom srodstvu, pHWE – vjerojatnost odstupanja od HWE uz Bonferroni korekciju granične vrijednosti (p<0,05). Značajne vrijednosti označene su zvjezdicom \*.

Populacija	P(%)	N <sub>A</sub>	A <sub>R</sub>	A <sub>PR</sub>	H <sub>O</sub>	uH <sub>E</sub>	F <sub>IS</sub>	pHWE
MOT	100,00	3,867	3,49	2	0,575	0,594	0,033	
MAN	66,67	1,733	1,733	5	0,296	0,264	-0,129	
BRE	100,00	3,733	3,357	1	0,495	0,545	0,094	*
BUR	100,00	3,533	3,164	0	0,484	0,473	-0,025	
ILO	100,00	5,333	4,506	2	0,660	0,676	0,025	
OTU	100,00	3,333	3,333	2	0,511	0,556	0,086	
BIJ	100,00	4,467	3,747	1	0,575	0,583	0,014	
GLO	100,00	5,067	3,967	2	0,590	0,636	0,073	
KIK	100,00	4,067	3,539	1	0,569	0,559	-0,019	
BED	100,00	6,067	4,306	6	0,587	0,615	0,047	
KUT	100,00	5,000	4,396	6	0,576	0,676	0,153 *	*
SLO	93,33	4,000	3,324	2	0,449	0,551	0,189 *	*
VEL	100,00	5,267	4,193	8	0,535	0,601	0,112 *	*

Provjera viška heterozigotnosti na svim lokusima odnosno provjera odstupanja populacija od ravnoteže između mutacija i genetskog pomaka Wilcoxonovim testom zbroja rangova rezultirala je značajnim vrijednostima za populacije MOT i ILO pod mutacijskim modelima IAM i TPM. S obzirom da kod niti jedne populacije nisu zabilježene značajne vrijednosti pod sva tri mutacijska modela, nedavno smanjenje efektivne veličine ijedne od proučavanih populacija odnosno njihov nedavan prolazak kroz tzv. usko grlo malo je vjerojatan (Tablica 7).

Višak heterozigotnosti provjeren je s još tri testa, tzv. *sign test*-om, *standardized differences test*-om i *two tailed Wilcoxon sing rank test*-om čiji su rezultati prikazani u Prilogu 1.

**Tablica 7.** Vjerojatnost odstupanja od ravnoteže između mutacija i genetskog pomaka testirana je Wilcoxonovim testom zbroja rangova pod tri mutacijska modela. IAM – model beskonačnog broja alela, TPM – dvofazni model, SMM – model postupnih mutacija. Statistički značajne vrijednosti ( $p < 0,05$ ) označene su zvjezdicom \*.

Populacija	IAM	TPM	SMM
MOT	0,000 *	0,013 *	0,467
MAN	0,042 *	0,065	0,188
BRE	0,036 *	0,227	0,835
BUR	0,126	0,511	0,932
ILO	0,004 *	0,028 *	0,445
OTU	0,013 *	0,115	0,489
BIJ	0,047 *	0,360	0,789
GLO	0,004 *	0,339	0,972
KIK	0,011 *	0,068	0,467
BED	0,211	0,947	0,998
KUT	0,000 *	0,060	0,820
SLO	0,000 *	0,052	0,729
VEL	0,053	0,360	0,958

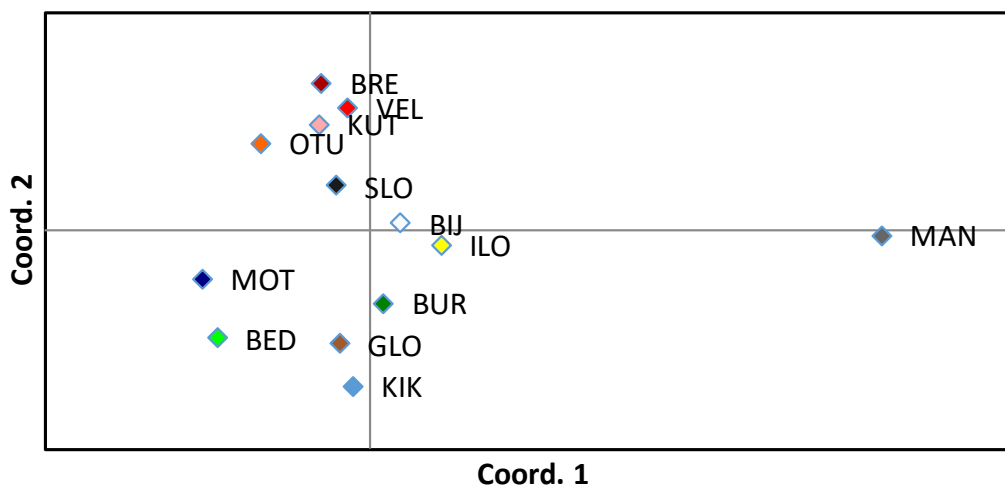
Vrijednosti fiksacijskog indeksa ( $F_{ST}$ ) odraz su genetske diferenciranosti populacija, veća vrijednost označava veću diferenciranost. Globalna razina genetske diferencijacije između istraživanih parova populacija je visoka te iznosi 0,264. Najveća vrijednost fiksacijskog indeksa, koja iznosi 0,563, zabilježena je između populacija MAN i OTU. Najmanja vrijednost fiksacijskog indeksa, koja iznosi 0,133, zabilježena je za par populacija GLO i KIK (Tablica 8.).

**Tablica 8.** Vrijednosti fiksacijskog indeksa ( $F_{ST}$ ) parova populacija. Vrijednost uokvirena zadebljanim pravokutnikom predstavlja najveću vrijednost indeksa dok vrijednost u zadebljalom fontu označava najmanju.

	MOT	MAN	BRE	BUR	ILO	OTU	BIJ	GLO	KIK	BED	KUT	SLO	VEL
MOT													
MAN	0,513												
BRE	0,298	0,544											
BUR	0,286	0,551	0,366										
ILO	0,22	0,418	0,244	0,282									
OTU	0,247	0,563	0,282	0,301	0,228								
BIJ	0,275	0,488	0,285	0,305	0,159	0,267							
GLO	0,215	0,456	0,24	0,233	0,17	0,233	0,191						
KIK	0,285	0,504	0,342	0,282	0,21	0,299	0,279	<b>0,133</b>					
BED	0,151	0,486	0,295	0,253	0,22	0,228	0,262	0,191	0,255				
KUT	0,239	0,462	0,216	0,237	0,186	0,138	0,225	0,195	0,227	0,236			
SLO	0,248	0,507	0,308	0,337	0,218	0,22	0,254	0,226	0,286	0,261	0,197		
VEL	0,212	0,471	0,245	0,276	0,184	0,203	0,225	0,249	0,292	0,248	0,152	0,237	

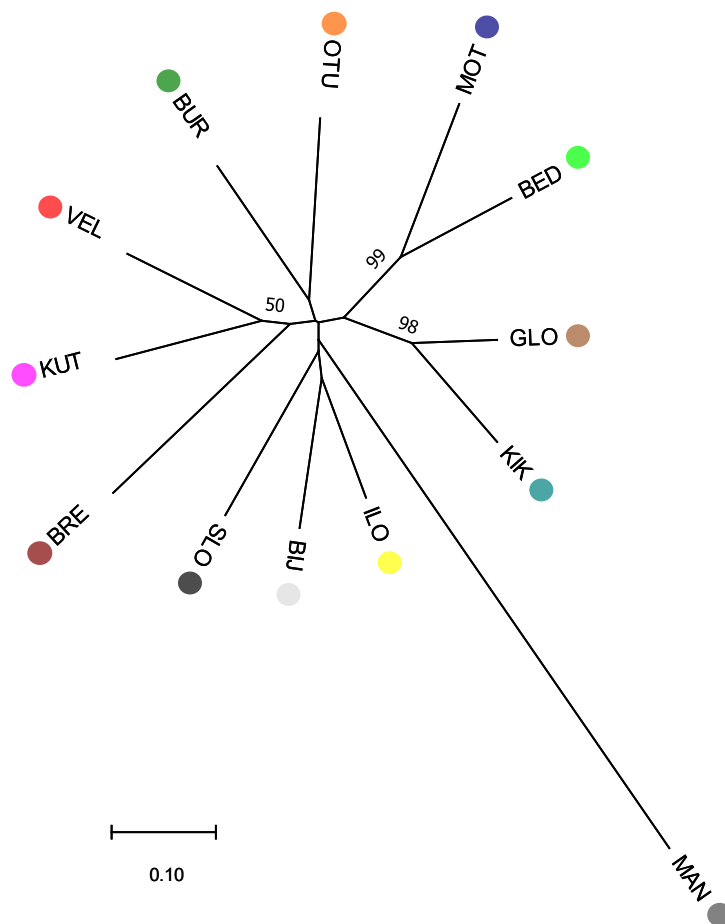
### 3.1.3. Genetska struktura populacija

Analiza glavnih koordinata temeljena na  $D_A$  genetskim udaljenostima pokazala je jasnu razdvojenost sjevernomakedonske populacije MAN od svih ostalih hrvatskih populacija. Prva os objašnjava 35,76% varijacije, a druga os 14,99% (Slika 8.).



**Slika 8.** Grafički prikaz rezultata analize glavnih koordinata (PCoA).

Topologija dendrograma izrađenog metodom susjednog sparivanja i temeljenog na  $D_A$  genetskim udaljenostima ukazuje na veću srodnost među populacijama koje su geografski bliže smještene. Isto kao i u rezultatima PCoA analize, vidljiva je znatna diferencijacija sjevernomakedonske populacije MAN od svih ostalih populacija (Slike 8.-9.).



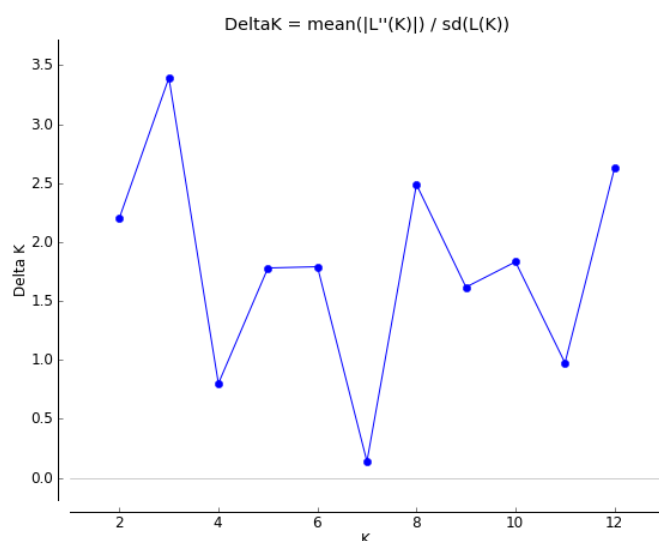
**Slika 9.** Neukorijenjeni dendrogram izrađen metodom susjednog sparivanja temeljen na matrici  $D_A$  genetskih udaljenosti. Prikazane su vrijednosti podržanosti veće od 50%.

Analiza molekularne varijance na tri razine pokazala je najveći postotak varijacije od 69,96% unutar populacija, a najmanji od 8,59% između grupa temeljenih na pripadnosti slivovima rijeka (Sava, Drava, Zrmanja i Lakavica) (Tablica 9.).

**Tablica 9.** Rezultati analize molekularne varijance (AMOVA).

Razina	Postotak varijance (%)
Između grupa	8,59
Između populacija unutar grupe	21,46
Unutar populacija	69,96

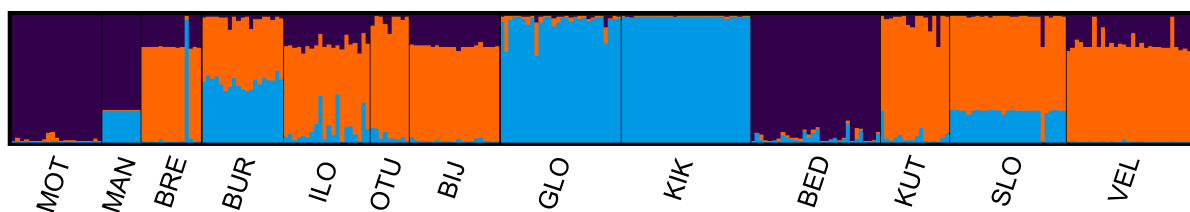
Analize strukturiranosti populacija provedene u programima STRUCTURE i Structure Harvester pokazale su da je najvjerojatniji broj genetskih skupina (klastera) kojima pripadaju istraživane populacije tri ( $\Delta K=3$ ) (Slika 10.).



**Slika 10.** Graf  $\Delta K$  vrijednosti dobiven analizom u mrežnom programu Structure Harvester.

Vizualizacija strukturiranosti dobivena u mrežnom programu CLUMPAK za  $\Delta K=3$  ukazuje na pripadnost populacija MOT, MAN i BED jednom klasteru, dok populacije GLO, KIK i BUR pripadaju drugom. Trećem klasteru pripadaju preostale populacije. Nekoliko jedinki iz populacije ILO pripada u više klastera. Jedna jedinka iz populacije BRE pripada drugom klasteru. Populacije odnosno jedinice svrstane su u isključivo jedan klaster ako im je vjerojatnost pripadanja (engl. *assignment probability*) bila veća ili jednaka 0,7 ( $Q \geq 0,7$ ) (Slika 11.).

Grafički prikazi strukturiranosti populacija za  $\Delta K=8$  i  $\Delta K=12$  prikazani su u Prilogu 2.



**Slika 11.** Grafički prikaz rezultata analize strukturiranosti populacija u programu STRUCTURE za  $\Delta K=3$ . Svaki klaster označen je jednom bojom. Nazivi ispod grafa označavaju populacije, a jedan stupac predstavlja jednu jedinku.

## 3.2. Molekularna filogenija

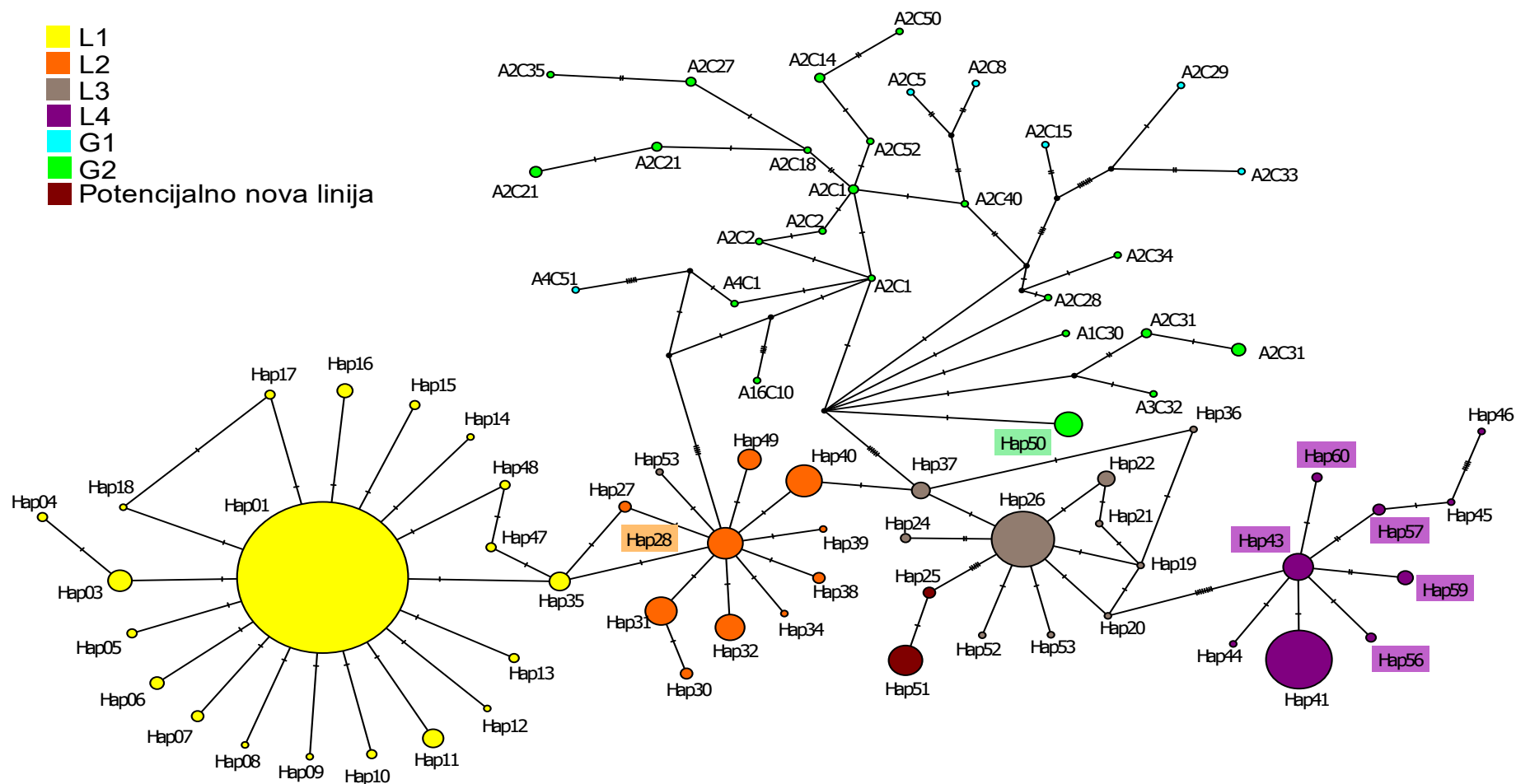
### 3.2.1. Analiza sekvenci i filogenetička rekonstrukcija

Filogenetičke analize konkateniranih sekvenci mtDNA *16S* i *COI* gena, uključujući i sekvence iz prijašnjih istraživanja koje su preuzete iz GenBank-a, ukazale su na postojanje 89 jedinstvenih, konkateniranih, haplotipova od kojih je njih 11 zabilježeno u 13 istraživanih populacija. Od spomenutih 11 haplotipova, njih 6 je novootkrivenih: Hap55-Hap60. Novootkriveni haplotipovi pronađeni su u populacijama MOT, BRE, BUR, BIJ, BED, KUT i SLO. Hap59 zabilježen je samo u populaciji BRE, Hap55 samo u populaciji BUR, Hap56 samo u populaciji BIJ, a Hap60 samo u populaciji KUT. 12 istraživanih hrvatskih populacija pripada evolucijskim linijama L2 i L4 *sensu* Schrimpf i sur. (2014), a sjevernomakedonska populacija MAN evolucijskoj grupi (liniji) G2 *sensu* Laggis i sur. (2017) što je jasno vidljivo na haplotipskoj mreži i filogenetskom stablu (Tablica 10., Slike 12.-13.). S obzirom da PopART program, u kojem je izrađena haplotipska mreža pomoću seta konkateniranih sekvenci, funkcionira na način koji maskira sve stupce u poravnanju s prazninama ili dvosmislenim znakovima (?, N, Y ili R), sve sekvence koje zapravo nisu identične to prividno postanu nakon uklanjanja spomenutih stupaca. Iz tog razloga na haplotipskoj mreži nisu prikazani svi otkriveni haplotipovi istraživanih populacije jer su u programu prividno isti haplotipovi grupirani zajedno odnosno prikazani kao jedan haplotip.



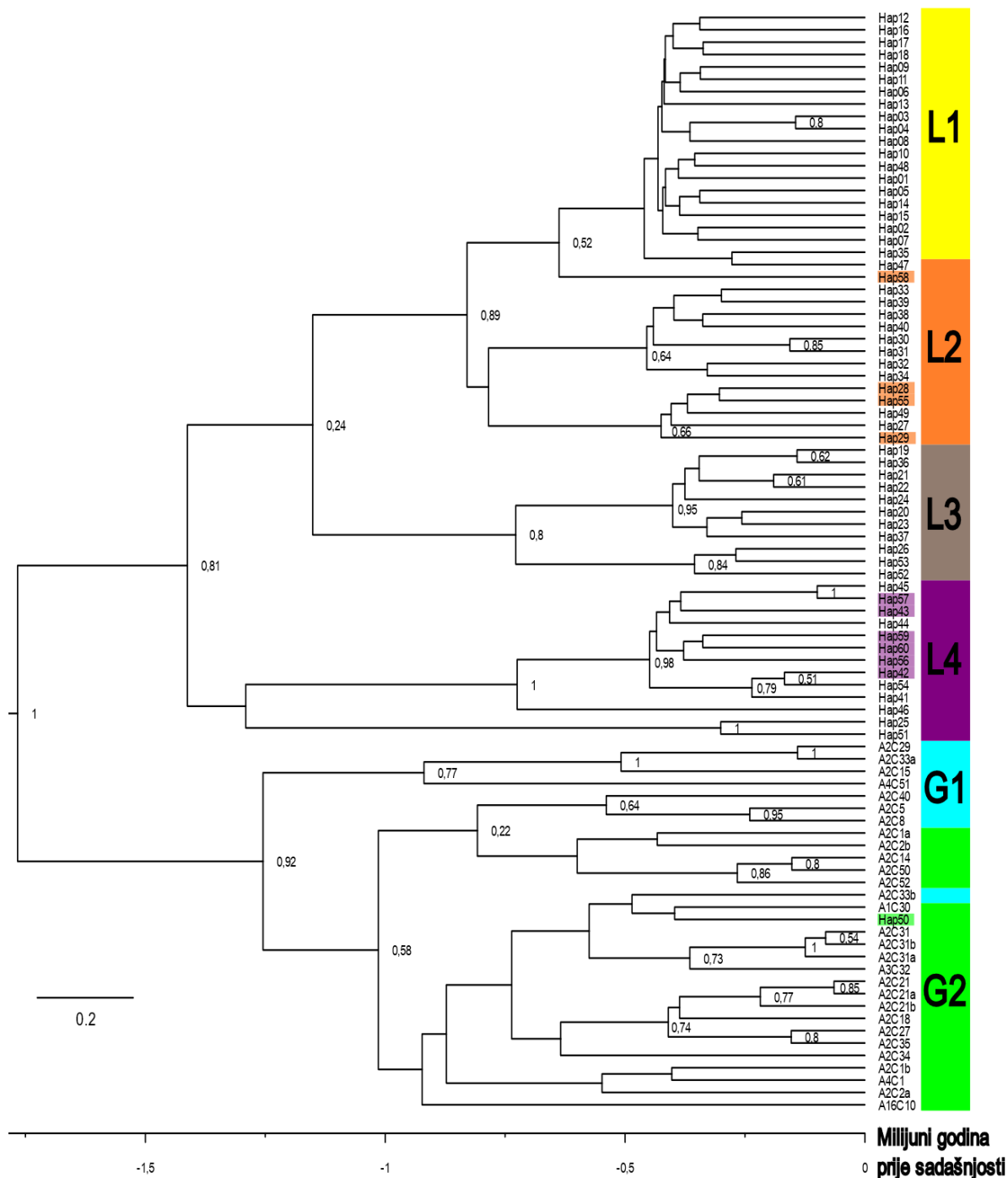
**Tablica 10.** Konkatenirani haplotipovi zabilježeni u istraživanim populacijama i pripadajuće evolucijske linije (grupe). Novootkriveni haplotipovi označeni su zadebljanim fontom.

<b>Populacija</b>	<b>Haplotip</b>	<b>Evolucijska linija</b>
MOT	Hap42	L4
	<b>Hap58</b>	L2
MAN	Hap50	G2
BRE	<b>Hap59</b>	L4
BUR	<b>Hap55</b>	L2
	Hap28	
ILO	Hap42	L4
OTU	Hap29	L2
	Hap42	L4
	Hap43	
BIJ	<b>Hap56</b>	L4
	<b>Hap57</b>	
	Hap42	
GLO	Hap42	L4
KIK	Hap42	L4
BED	<b>Hap58</b>	L2
KUT	<b>Hap60</b>	L4
	Hap43	
SLO	Hap42	L4
	<b>Hap57</b>	
VEL	Hap43	L4



**Slika 12.** Haplotipska mreža izrađena pomoću seta konkateniranih sekvenci metodom statističke parsimonije (TCS) u programu PopART.

Haplotipovi u pravokutnicima označavaju haplotipove proučavanih populacija. Površina krugova proporcionalna je frekvenciji pripadajućih haplotipova, a broj crtica na granama odgovara broju mutacijskih koraka. Krugovi bez pridruženih haplotipova označavaju izumrle ili neuzorkovane haplotipove. Oznake L1-L4, G1 i G2 označavaju evolucijske linije *sensu* Schimpf i sur. (2014) odnosno grupe *sensu* Laggis i sur. (2017).



**Slika 13.** Filogenetsko stablo izrađeno pomoću seta konkateniranih haplotipova primjenom BA uz odabir HKY+I evolucijskog modela. Haplotipovi u pravokutnicima označavaju haplotipove proučavanih populacija. Oznake L1-L4, G1 i G2 označavaju evolucijske linije *sensu* Schimpf i sur. (2014) odnosno grupe *sensu* Laggis i sur. (2017). Uz čvorove su označene vrijednosti podržanosti veće od 0,5 osim uz čvorove koji razdvajaju evolucijske linije odnosno grupe, uz njih su označene i vrijednosti manje od 0,5.

## 4. Rasprava

### 4.1. Populacijska genetika

Populacijsko-genetičke analize ustanovile su postojanje visoke genetske raznolikosti unutar populacija i umjerenu razinu diferencijacije između njih. Genetska raznolikost izražena kroz vrijednosti pokazatelja  $P$ ,  $N_A$ ,  $A_R$  i  $A_{PR}$  viša je u populacijama BED, VEL, KUT i ILO, a niža u populacijama OTU i BUR. Vrijednosti pokazatelja genetske raznolikosti populacija BED, VEL, KUT i ILO ukazuju na veliki adaptivni potencijal ovih populacija koji je ključan za održavanje genetske stabilnosti u slučaju povećanja okolišnih pritisaka odnosno promjena u okolišu. Ukupna genetska raznolikost zabilježena za mjesta uzorkovanja plemenitog raka bila je visoka u usporedbi s rezultatima dobivenim u istraživanjima Gross i sur. (2017), Schrimpf i sur. (2011; 2014), Laggis i sur. (2017) i Panicz i sur. (2019). Relativno niže vrijednosti spomenutih pokazatelja zabilježene za populacije OTU i BUR, s tim da za potonju nisu zabilježeni privatni aleli, ne iznenađuju uzimajući u obzir da je populacija BUR antropogeno translocirana u sadašnje stanište (Maguire i Gottstein-Matočec, 2004). Najniže vrijednosti spomenutih pokazatelja zabilježene su za sjevernomakedonsku populaciju MAN, osim velikog broja privatnih alela (5) koji možda ne bi došao do izražaja kada bi se napravila usporedba s populacijama s istog područja. Umjetno Mantovsko jezero nastalo je relativno nedavno podizanjem brane 1978. godine na rijeci Lakavici (Gelev, 2001). Antropogeni utjecaj na jezero najizraženiji je tijekom sušne sezone povremenog toka spomenute rijeke kada je navodnjavanje okolnih polja vodom iz jezera putem umjetnog kanala najintenzivnije, a razina vode može varirati 3-5 m. Osim navodnjavanja, snažan pritisak na stabilnost ekosustava jezera uzrokuju i ljudske rekreativne aktivnosti, podizanje povremenih turističkih naselja uz obale jezera i otpadna voda iz okolnih sela bez kanalizacije (Slavevska-Stamenković, 2012) (Tablica 6.).

Najveće, statistički značajne, pozitivne vrijednosti indeksa križanja u bliskom srodstvu zabilježene su za populacije KUT, SLO i VEL ( $F_{IS} > 0,11$ ). Takve populacije, u kojima je prisutno parenje u srodstvu, podložne su smanjenju genetske raznolikosti što za posljedicu može imati gubitak adaptivnog evolucijskog potencijala vrste (Frankham i sur., 2002). Za iste populacije također je utvrđeno i statistički značajno odstupanje od HWE što se može objasniti prisutnošću nul alela koji prividno mogu povećati stvaran broj homozigota (Chakraborty i sur., 1992).

Iako su frekvencije nul alela bile niske, u sve tri spomenute populacije zabilježeni su nul aleli za lokus koji je imao relativno najveću frekvenciju (Aast4\_37; 0,094) (Tablica 6.).

Dobivene  $F_{ST}$  vrijednosti i rezultati analize molekularne varijance ukazuju na postojanje srednje do visoke razine genetske diferenciranosti između istraživanih populacija kao odraz njihove međusobne izoliranosti i ograničenog protoka gena između njih. Globalna razina genetske raznolikosti je umjereno visoka ( $F_{ST}=0,264$ ), no između nekih parova populacija zabilježena je srednja razina diferenciranosti (0,133-0,152). Najveće vrijednosti fiksacijskog indeksa ( $F_{ST}>0,41$ ) općenito su zabilježene između hrvatskih populacija i sjevernomakedonske populacije MAN, a najmanja vrijednost zabilježena je za par populacija GLO i KIK što je u skladu s očekivanjem da će manja genetska diferenciranost biti zabilježena u slučaju većega protoka gena koji je vjerojatniji ukoliko su populacije geografski smještene relativno bliže jedna drugoj (Petit i Excoffier, 2009). Populacije BUR i BRE pokazale su najvišu razinu diferenciranosti ( $F_{ST}>0,3$ ) uzimajući u obzir parove s hrvatskim populacijama što je u skladu sa spoznajom da je populacija BUR unesena, iako njeno porijeklo nije poznato (Maguire i Gottstein-Matočec, 2004) (Tablica 8., Slika 7.). U usporedbi s globalnim  $F_{ST}$  vrijednostima iz prijašnjih istraživanja, vrijednost dobivena u ovom istraživanju veća je od one iz Schrimpf i sur. (2014) ( $F_{ST}=0,232$ ), manja od onih iz Laggis i sur. (2017) ( $F_{ST}=0,400$ ) i Gross i sur. (2021) ( $F_{ST}=0,512$ ), a jednaka vrijednosti iz Gross i sur. (2013) ( $F_{ST}=0,264$ ).

Analize genetske strukturiranosti populacija pokazale su razdvajanje populacija u skladu s njihovim relativnim geografskim smještajima i spoznajama o antropogenim translokacijama. Pripadnosti populacija MOT i BED jednom klasteru te populacija GLO i KIK drugom klasteru odraz su veće izoliranosti spomenutih parova populacija od ostatka hrvatskih populacija, koje pripadaju trećem klasteru (Slike 8.-11.). Analiza molekularne varijance pokazala je da su populacije već dugo odvojene i da među njima nema kontakta s obzirom da je najveći postotak varijance sadržan unutar populacija (69,96%), a ne između populacija koje pripadaju istim riječnim slivovima, dok je najmanji postotak varijacije sadržan između grupa populacija (Slika 7., Tablica 9).

Gross i sur. (2017) proveli su istraživanje na 7 populacija plemenitog raka u Estoniji i Češkoj pomoću 19 mikrosatelitnih lokusa, među kojima su svi lokusi korišteni u ovom istraživanju. Raspon broja alela po lokusu u istraživanju Gross i sur. (2017) iznosio je od 2 (Aast4\_38) do 8 (Aast4\_20) dok je najveći zabilježen broj alela po lokusu u ovom istraživanju iznosio 22 (Aast4\_17). U oba spomenuta istraživanja zabilježeni su nul aleli za lokus Aast4\_37, u ovom istraživanju u tri populacije, a u Gross i sur. (2017) samo u jednoj. Usporedbom vrijednosti pokazatelja genetske raznolikosti  $P$ ,  $A_R$ ,  $H_O$  i  $H_E$  vidljiva je viša razina ukupne genetske raznolikosti u hrvatskim populacijama od onih u Estoniji i Češkoj iz istraživanja Gross i sur. (2017) i Gross i sur. (2013). Od svih populacija obuhvaćenih u istraživanju Gross i sur. (2013), prosječne vrijednosti genetskih pokazatelja  $P$ ,  $A_R$ ,  $H_O$  i  $H_E$  njemačkih populacija bile su veće od prosječnih vrijednosti populacija proučavanih u ovom istraživanju, no valja uzeti u obzir da su njemački uzorak predstavljale dvije populacije koje su zapravo umjetni račji fondovi sačinjeni od jedinki lokalnog porijekla (engl. *stocked by native stocks of local origin*) što je zanimljivo s obzirom da se u umjetnim račjim fondovima očekuje smanjena genetska raznolikost zbog učinka utemeljitelja i male efektivne veličine populacije (Kõiv i sur., 2008).

Ukupne prosječne vrijednosti pokazatelja genetske raznolikosti  $P$ ,  $A_R$ , i  $H_O$  populacija u ovom istraživanju veće su od vrijednosti zabilježenih za populacije koje pripadaju jadranskom odnosno crnomorskom slivu u istraživanju Gross i sur. (2021), no manje su u usporedbi s istim vrijednostima zabilježenim samo za populacije čija je pritoka rijeka Drava u spomenutom istraživanju.

Ukupne prosječne vrijednosti pokazatelja genetske raznolikosti  $A_R$ ,  $H_O$  i  $H_E$  populacija u ovom istraživanju veće su od vrijednosti zabilježenih za populacije koje pripadaju baltičkom, sjevernomorskom i crnomorskom slivu u istraživanju Schrimpf i sur. (2014), osim vrijednosti pokazatelja  $H_E$  (0,799) populacija crnomorskog sliva koja je bila veća od prosječne vrijednosti populacija u ovom istraživanju što ne iznenađuje s obzirom da su donji dijelovi crnomorskog sliva jedan od glacijalnih refugija plemenitog raka.

Ukupne prosječne vrijednosti pokazatelja genetske raznolikosti  $A_R$ ,  $H_O$  i  $H_E$  populacija u ovom istraživanju slične su vrijednostima zabilježenim za grčke populacije u istraživanju Laggis i sur. (2017).

Ipak, valja spomenuti kako je globalna razina genetske diferenciranosti grčkih populacija bila vrlo visoka ( $F_{ST}=0,4$ ) i veća u odnosu na globalnu razinu u ovom istraživanju ( $F_{ST}=0,264$ ) te da su neke grčke populacije pokazale iznimno visoku razinu genetske raznolikosti ( $H_D$ ,  $H_E>0,75$ ;  $P>8,16$ ;  $A_R>5,56$ ) što je dalo doprinos proglašavanju južnog Balkana najstarijim glacijalnim refugijem plemenitog raka.

Visoka razina genetske raznolikosti i diferenciranosti populacija iz ovog istraživanja u skladu je s očekivanjem s obzirom da se Hrvatska nalazi na području zapadnog Balkana koji je vruća točka bioraznolikosti i jedan od potvrđenih glacijalnih refugija (Schrimpf i sur., 2014) odnosno mikrorefugija (Gross i sur., 2021) plemenitog raka.

Razrada konzervacijskih planova i osmišljavanje učinkovitih strategija upravljanja za plemenitog raka od ključne su važnosti s obzirom da je 55% hrvatskih populacija ove vrste nestalo tijekom zadnjih desetljeća kao posljedica antropogenih utjecaja, račje kuge i prelova (Maguire i sur., 2018) te da plemenitog raka odlikuje manja genetska raznolikost u odnosu na ostale europske vrste slatkovodnih rakova kao što su potočni rak i bjelonogi rak (Trontelj i sur., 2005; Klobučar i sur., 2013; Jelić i sur., 2016).

## **4.2. Molekularna filogenija**

Otkriveni haplotipovi istraživanih populacija i njihova pripadnost evlucijskim linijama *sensu* Schrimpf i sur. (2014) odnosno grupama *sensu* Laggis i sur. (2017) u skladu su s dosadašnjim filogenetičkim istraživanjima plemenitog raka provedenim na uzorcima s istih područja koristeći mtDNA gene *COI* i *16S*. Ustanovljeno je postojanje šest prethodno utvrđenih evlucijskih linija s naznakom postojanja nove linije, koja obuhvaća nove haplotipove iz Hrvatske i Slovenije, čija je problematika već prokomentirana u Gross i sur. (2021). Filogenetičke analize ukazale su na pripadnost svih hrvatskih haplotipova istraživanih populacija dvama mtDNA linijama, L2 i L4 *sensu* Schrimpf i sur. (2014), koje su također zabilježene i u drugim europskim zemljama. Relativno niža frekvencija utvrđenih haplotipova hrvatskih populacija jasno odražava njihov endemičan karakter, za razliku od, primjerice, Hap01 koji je najčešći, široko rasprostranjen europski haplotip (Schrimpf i sur., 2014). Općenito velik broj zabilježenih kao i novootkrivenih haplotipova u ovom istraživanju zasigurno idu u prilog činjenici o području zapadnog dijela Balkana, odnosno Hrvatske, kao vrućoj točki bioraznolikosti (Tablica 10., Slika 12). Osim u Hrvatskoj, Hap28 i Hap29 zabilježeni su i u Crnoj Gori, a Hap42 također u Crnoj Gori i Francuskoj (Schrimpf i sur., 2014; Schrimpf i sur., 2017). Haplotip 50 zabilježen je i u Albaniji (Gross i sur., 2021).

Haplotipska mreža odražava slabo filogeografsko strukturiranje i prisutnost istih haplotipova čak i u geografski udaljenim populacijama što je u skladu s rezultatima prijašnjih istraživanja (Schrimpf i sur., 2014; Laggis i sur., 2017) koja su pokazala da je današnja rasprostranjenost i prirodna genetska struktura plemenitog raka oblikovana snažnim antropogenim utjecajem na njegova staništa, geo-klimatskim događajima iz prošlosti i čestim antropogenim translokacijama koja su djelomično narušila prirodnu genetsku strukturu spomenute vrste.

Procjena vremena razdvajanja (engl. *divergence times estimates*), napravljena pomoću seta konkateniranih mtDNA gena, pokazala je da se plemeniti rak kao vrsta diverzificirao relativno nedavno, tijekom ranog i srednjeg Pleistocena (2,58 milijuna godina – 11 550 godina prije sadašnjosti), što se odražava i na slabu podržanost grana (engl. *posterior probabilities*) na filogenetskom stablu (Slika 13.). Tzv. hrvatska linija L4 *sensu* Schrimpf i sur. (2014) razdvojila se od ostalih, ne uzimajući u obzir grčke linije (grupe) G1 i G2 *sensu* Laggis i sur. (2017), prije otprilike 1,284 milijuna godina. Evolucijska linija L2 *sensu* Schrimpf i sur. (2014), kojoj pripadaju neki od otkrivenih haplotipova istraživanih populacija, posljednji je puta dijelila zajedničkog pretka s linijom L1 *sensu* Schrimpf i sur. (2014) prije otprilike 0,556 milijuna godina (Laggis i sur., 2017) (Slika 13).



## 5. Zaključak

Svi proučavani mikrosatelitni lokusi pokazali su se polimorfni i dobroumnažajući. Zabilježeno je ukupno 176 alela i 38 privatnih alela u istraživanim populacijama.

Pokazatelji genetske raznolikosti otkrili su visoku razinu genetske raznolikosti i diferencijacije hrvatskih populacija. Najviše vrijednosti pokazatelja zabilježene su za populacije BED, VEL, KUT i ILO koje odražavaju njihov velik adaptivni potencijal što ih čini prioritarnim populacijama u konzervacijskim strategijama.

Genetska struktura hrvatskih populacija odraz je geomorfoloških i klimatskih događaja iz prošlosti te antropogenih translokacija i pritisaka na njihova staništa.

Filogenetičke analize mtDNA gena *COI* i *16S* ukazale su na postojanje 11 haplotipova u istraživanim populacijama od kojih je njih 6 novootkrivenih (Hap55-Hap60). Hrvatske populacije plemenitog raka pripadaju evolucijskim linijama L2 i L4 *sensu* Schrimpf i sur. (2014), dok sjevernomakedonska populacija pripada evolucijskoj grupi (liniji) G2 *sensu* Laggis i sur. (2017).

Dobiveni rezultati poslužit će u izradi konzervacijskih planova za plemenitog raka te kao jedna od osnovica za osmišljavanje i provođenje novih, prijeko potrebnih, istraživanja genetske raznolikosti kako bi se spomenutom osjetljivom i zaštićenom vrstom moglo što bolje upravljati i kako bi se očuvala njezina važna uloga u slatkovodnim ekosustavima.

## 6. Literatura

- Abdul-Muneer P. M., 2014. Application of microsatellite markers in conservation genetics and fisheries management: recent advances in population structure analysis and conservation strategies. *Genetics Research International* **2014**.
- Albrecht H., 1983. Besiedlungsgeschichte und ursprüngliche holozäne Verbreitung der europäischen Flußkrebse (Decapoda: Astacidae). *Spixiana* **6**, 61-77.
- Allendorf, F. W., 2017. Genetics and the conservation of natural populations: allozymes to genomes. *Molecular Ecology* **26**, 420-430.
- Allendorf F. W., 2002. Genetics and the Persistence of Small Populations. U: Liberg O. (ur.) Genetics aspects of viability in small wolf populations with special emphasis on the Scandinavian wolf population. Report from an International Expert Workshop (Liberg, O.). Färna Herrgård, **44**.
- Avise J. C., 1994. Molecular marker, natural history and evolution. Chapman y Hall. Inc., New York.
- Baillie S. M., Muir A. M., Scribner K., Bentzen P., Krueger C. C., 2016. Loss of genetic diversity and reduction of genetic distance among lake trout *Salvelinus namaycush* ecomorphs, Lake Superior 1959 to 2013. *Journal of Great Lakes Research* **42**, 204-216.
- Bouckaert R., Vaughan T. G., Barido-Sottani J., Duchêne S., Fourment M., Gavryushkina A., Drummond A. J. et al., 2019. BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS computational biology* **15**, e1006650.
- Brower A. V., 1994. Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**, 6491-6495.
- Chakraborty R., 2006. Population Genetics: Historical Aspects. eLS, Wiley, Chichester.
- Chakraborty R., Andrade M. D., Daiger S. P., Budowle B., 1992. Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications. *Annals of human genetics* **56**, 45-57.
- Chapuis M. P., Estoup A., 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 621-631.
- Clark P. U., Dyke A. S., Shakun J. D., Carlson A. E., Clark J., Wohlfarth B. et al., 2009. The last glacial maximum. *Science* **325**, 710-714.
- Cukerzis J., 1984. *La biologie de l'écrevisse (Astacus astacus L.)*. Editions Quae.

- Darriba D., Taboada G. L., Doallo R., Posada D., 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods* **9**, 772-772.
- De la Cruz V. F., Neckelmann N., Simpson L., 1984. Sequences of six genes and several open reading frames in the kinetoplast maxicircle DNA of *Leishmania tarentolae*. *Journal of Biological Chemistry* **259**, 15136-15147.
- De Vasconcellos A. V., Lima D., Bonhomme F., Vianna M., Sole-Cava A. M., 2015. Genetic population structure of the commercially most important demersal fish in the Southwest Atlantic: The whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*). *Fisheries Research* **167**, 333-337.
- Di Rienzo A., Peterson A. C., Garza J. C., Valdes A. M., Slatkin M., Freimer N. B., 1994. Mutational processes of simple sequencerepeat loci in human populations. *Proceeding of National Academy of Sciences* **91**, 3166-3170.
- Earl D. A., von Holdt B. M., 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* **4**, 359-361.
- Edsman L., Füreder L., Gherardi F., Souty-Grosset C., 2010. *Astacus astacus*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2.
- Ellegren H., 2009. The different levels of genetic diversity in sex chromosomes and autosomes. *Trends in Genetics* **25**, 278-284.
- Ellegren H., 2004. Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics* **5**, 435-445.
- Ellegren H., 2000. Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends in Genetics* **16**, 551-558.
- Ellis J. S., Gilbey J., Armstrong A., Balstad T., Cauwelier E., Cherbonnel C., Stevens J. R. et al., 2011. Microsatellite standardization and evaluation of genotyping error in a large multi-partner research programme for conservation of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Genetica* **139**, 353-367.
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**, 2611-2620.
- Ewens W. J., 2004. Mathematical population genetics: theoretical introduction. Springer, New York..
- Excoffier L., Laval G., Schneider S., 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**, 47-50.

- Ferguson A., Taggart J. B., Prodohl P. A. et al., 1995. The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special reference to *Salmo*. *Journal of Fish Biology* **47**, supplement A, 103-126.
- Ferguson M. M., Danzmann R. G., 1998. Role of genetic markers in fisheries and aquaculture: useful tools or stamp collecting? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **55**, 1553-1563.
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **3**, 294-299.
- Frankham R., Ballou S. E. J. D., Briscoe D. A., Ballou J. D., 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge university press.
- Frankham R., 1996. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conservation Biology* **10**, 1500-1508.
- Freeland J. L., 2005. Molecular ecology. John Wiley & Sons, Ltd., Hoboken, New York.
- Gelev T., 2001. Kriva Lakavica Valley before and after construction of Mantovo dam. Proceedings of the 2nd Congress of Geographer from Republic of Macedonia. Macedonian Geographic Society, 401-410.
- Gottstein S., Hudina S., Lucić A., Maguire I., Ternjej I., Žganec K., 2011. Crveni popis rakova (Crustacea) slatkih i bočatih voda Hrvatske. Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb, 51. (Red list of freshwater and brackish Crustacea in Croatia; in Croatian).
- Gross R., Lovrenčić L., Jelić M., Grandjean F., Đuretanić S., Simić V., Burimski O., Bonassin L., Groza M.-I., Maguire I., 2021. Genetic diversity and structure of the noble crayfish populations in the Balkan Peninsula revealed by mitochondrial and microsatellite DNA markers. *PeerJ* **9**, e1183.
- Gross R., Kõiv K., Pukk L., Kaldre K., 2017. Development and characterization of novel tetranucleotide microsatellite markers in the noble crayfish (*Astacus astacus*) suitable for highly multiplexing and for detecting hybrids between the noble crayfish and narrow-clawed crayfish (*A. leptodactylus*). *Aquaculture* **472**, 50-56.
- Gross R., Palm S., Kõiv K., Prestegard T., Jussila J., Paaver T., Geist J., Kokko H., Karjalainen A., Edsman L., 2013. Microsatellite markers reveal clear geographic structuring among threatened noble crayfish (*Astacus astacus*) populations in Northern and Central Europe. *Conservation Genetics* **14**, 809-821.
- Goudet J., 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3).

- Guo S. W., Thompson E. A., 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics* **48**, 361-372.
- Harrison H. B., Feldheim K. A., Jones G. P., Mansour H., Perumal S., Williamson D. H., Berumen M. L., 2014. Validation of microsatellite multiplexes for parentage analysis in a coral reef fish (*Lutjanus carponotatus*, Lutjanidae). *Conservation Genetics Resources* **6**, 803-806.
- Hewitt G. M., 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **359**, 183-195.
- Hewitt G. M., 1999. Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological journal of the Linnean Society* **68**, 87-112.
- Hillen J. E. J., Coscia I., Vandeputte M., Herten K., Hellemans B., Maroso F., Volckaert F. A. M. et al., 2017. Estimates of genetic variability and inbreeding in experimentally selected populations of European sea bass. *Aquaculture* **479**, 742-749.
- Holdich D. M., 2002. Biology of freshwater crayfish. Blackwell Science, Oxford.
- Hughes J. M., Schmidt D. J., Finn D. S., 2009. Genes in streams: using DNA to understand the movement of freshwater fauna and their riverine habitat. *BioScience* **59**, 573-583.
- Hwang U. W., Kim W., 1999. General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *The Korean journal of parasitology* **37**, 215.
- Jarne P., Lagoda P. J. L., 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution* **11**, 424-429.
- Jelić M., Klobučar G. I., Grandjean F., Puillandre N., Franjević D., Futo M, Amouret J., Maguire I., 2016. Insights into the molecular phylogeny and historical biogeography of the white-clawed crayfish (Decapoda, Astacidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **103**, 26-40.
- Katoh K., Stanley D. M., 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* **30**, 772-780.
- Kimura M., Crow J. F., 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* **49**, 725.
- Kõiv K., Gross R., Paaver T., Hurt M., Kuehn R., 2008. Isolation and characterization of 11 novel microsatellite DNA markers in the noble crayfish, *Astacus astacus*. *Animal Genetics* **40**, 124-126.

- Kopelman N. M., Mayzel J., Jakobsson M., Rosenberg N. A., Mayrose I., 2015. Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular Ecology Resources* **15**, 1179-1191.
- Kouba A., Petrusek A., Kozák P., 2014. Continental-wide distribution of crayfish species in Europe: update and maps. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* **413**, 5.
- Lacy R. C., 1997. Importance of genetic variation to the viability of mammalian populations. *Journal of mammalogy* **78**, 320-335.
- Laggis A., Baxevaniam A.D., Charalampidou A., Maniatsi S., Triantafyllidis A., Abatzopoulos T. J., 2017. Microevolution of the noble crayfish (*Astacus astacus*) in the Southern Balkan Peninsula. *BMC Evolutionary Biology* **17**, 1-19.
- Langella O., 1999. Populations 1.2.32: a population genetic software. <https://bioinformatics.org/populations/>.
- Leigh J. W., Bryant D., 2015. popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution* **6**, 1110-1116.
- Levinson G., Gutman G. A., 1987. High frequencies of short frameshifts in poly-CA/TG tandem repeats borne by bacteriophage M13 in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Research* **15**, 5323-5338.
- Piry S., Luikart G., Cornuet J. M., 1999. BOTTLENECK: a program for detecting recent effective population size reductions from allele data frequencies. *Journal of Heredity* **90**, 502-503.
- Lyko F., 2017. The marbled crayfish (Decapoda: Cambaridae) represents an independent new species. *Zootaxa* **4363**, 544-552.
- Klobučar G., Podnar M., Jelić M., Franjević D., Faller M., Štambuk A. et al., 2013. Role of the Dinaric Karst (western Balkans) in shaping the phylogeographic structure of the threatened crayfish *Austropotamobius torrentium*. *Freshwater Biology* **58**, 1089-1105.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* **35**, 1547-1549.
- 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**, 2.
- Maguire I., 2014. Nacionalni programi za praćenje stanja očuvanosti vrsta i staništa u Hrvatskoj. Plemeniti ili riječni rak *Astacus astacus* (Linnaeus, 1758). Državni zavod za zaštitu prirode.

- Maguire I., Jelić M., Klobučar G., 2011. Update on the distribution of freshwater crayfish in Croatia. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* **401**, 31.
- Maguire I., Gottstein-Matočec S., 2004. The distribution pattern of freshwater crayfish in Croatia. *Crustaceana* **77**, 25-49.
- McKeown N. J., Hauser L., Shaw P. W., 2017. Microsatellite genotyping of brown crab *Cancer pagurus* reveals fine scale selection and 'non-chaotic' genetic patchiness within a high gene flow system. *Marine Ecology Progress Series* **566**, 91-103.
- Miyazono F., Schneider P. M., Metzger R., Warnecke-Eberz U., Baldus S. E., Dienes H. P., Hoelscher A. H. Et al., 2002. Mutations in the mitochondrial DNA D-Loop region occur frequently in adenocarcinoma in Barrett's esophagus. *Oncogene* **21**, 3780-3783.
- Narodne Novine 2013. Pravilnik o strogo zaštićenim vrstama. Narodne novine 144/13
- Narodne Novine 2013. Zakon o zaštiti prirode. Narodne novine 80/13
- Nei M., 1973. Analysis of genetic diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **70**, 3321-3323.
- Nyström P., 1999. The Effects of Crayfish on Interactions in Freshwater Benthic Communities. PhD thesis. Lund University, Lund.
- O'Donnell K. H., Chen C. T., Wensink C., 1994. Insulating DNA directs ubiquitous transcription of the *Drosophila melanogaster* alpha1 tubulin gene. *Molecular and Cell Biology* **14**, 6398-6408.
- Ohta T., Kimura M. A., 1973. model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genetics Research* **22**, 201-204.
- Oliveira E. J., Pádua J. G., Zucchi M. I., Vencovsky R., Vieira M. L. C., 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* **29**, 294-307.
- Ozturk R. C., Altinok I., 2017. Analysis of Microsatellite Data for Population Genetics of Aquatic Organisms. *Genetics of Aquatic Organisms* **1**, 71-79.
- Paaver T., Hurt M., 2009. Status and management of noble crayfish *Astacus astacus* in Estonia. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* **18**, 394-395.
- Panciz R., Napora-Rutkowski L., Keszka S., Skuza L., Szenejko M., Śmietana P., 2019. Genetic diversity in natural populations of noble crayfish (*Astacus astacus* L.) in north-western Poland on the basis of combined SSR and AFLP data. *PeerJ* **7**, e7301.
- Park L. K., Moran P., 1994. Developments in molecular genetic techniques in fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **4**, 272-299.

- Pârvulescu L., Pacioglu O., Hamchevici C., 2011. The assessment of the habitat and water quality requirements of the stone crayfish (*Austropotamobius torrentium*) and noble crayfish (*Astacus astacus*) species in the rivers from the Anina Mountains (SW Romania). *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* **401**, 3.
- Peakall R., Smouse P. E., 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* **28**, 2537-2539.
- Petit R. J., Excoffier L., 2009. Gene flow and species delimitation. *Trends in Ecology & Evolution* **24**, 386-393.
- Phumichai C., Phumichai T., Wongkaew A., 2015. Novel Chloroplast Microsatellite (cpSSR) Markers for Genetic Diversity Assessment of Cultivated and Wild Hevea Rubber. *Plant Molecular Biology Reporter* **33**, 1486-1498.
- Primmer C. R., Ellegren H., 1998. Patterns of molecular evolution in avian microsatellites. *Molecular Biology and Evolution* **15**, 997-1008.
- Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945-959.
- Rambaut A., 2018. FigTree. Version 1.4.4. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software-figtree/>
- Rambaut A., Drummond A. J., Xie D., Baele G., Suchard M. A., 2018. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic biology* **67**, 901.
- Raymond M., Rousset F., 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* **49**, 1280-1283.
- Reynolds J., Souty-Grosset C., Richardson A., 2013. Ecological roles of crayfish in freshwater and terrestrial habitats. *Freshwater Crayfish* **19**, 197-218.
- Rice W. R., 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* **43**, 223-225.
- Rousset F., 2008. GENEPOP'007: a complete re-implantation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* **8**, 103-106.
- Saitou N., Nei M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 406-425.
- 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.
- Schrimpf A., Theissinger K., Dahlem J., Maguire I., Pârvulescu L., Schulz H. K., Schulz R., 2014. Phylogeography of noble crayfish (*Astacus astacus*) reveals multiple refugia. *Freshwater Biology* **59**, 761-776.
- Schrimpf A., Schulz H., Theissinger K., Pârvulescu L., Schulz R., 2011. First large-scale genetic analysis of the vulnerable noble crayfish *Astacus astacus* reveals low haplotype



- diversity of central European populations. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* **401**, 35.
- Simon C., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H., Flook P., 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the entomological Society of America* **87**, 651-701.
- Skurdal J., Taugbøl T., 2002. *Astacus* U: Holdich D. M. (ur.), *Biology of Freshwater Crayfish*. Blackwell Science, Oxford, 467-510.
- Slavevska-Stamenković V., Paunović M., Smiljkov S., Stafilov T., Prelić D., Ristovska M., Gačić Z., A. Atanacković, 2012. Factors affecting distribution pattern of dominant macroinvertebrates in Mantovo Reservoir (Republic of Macedonia). *Biologia* **67**, 1129-1142.
- Souty-Grosset C., Holdich D. M., Noël P. Y., Reynolds J., Haffner P., 2006. Atlas of crayfish in Europe. Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris.
- Souty-Grosset C., Grandjean F., Gouin N., 2003. Involvement of genetics in knowledge, stock management and conservation of *Austropotamobius* in Europe. *Bulletin français de la pêche et de la pisciculture* **370-371**, 165-179.
- Strand M., Prolla T. A., Liskay R. M., Petes T. D., 1993. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* **365**, 274-276.
- Tao M., You C. P., Zhao R. R., Liu S. J., Zhang Z. H., Zhang C., Liu Y., 2014. Animal mitochondria: evolution, function, and disease. *Current molecular medicine* **14**, 115-124.
- Templeton A. R., Crandall K. A., Sing C. F., 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* **132**, 619-633.
- Thitaram C., 2009. Elephant reproduction: improvement of breeding efficiency and development of a breeding strategy. PhD thesis. Utrecht University, Utrecht.
- Trontelj P., Machino Y., Sket B., 2005 Phylogenetic and phylogeographic relationships in the crayfish genus *Austropotamobius* inferred from mitochondrial COI gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **34**, 212–226.
- van Oosterhout C., Hutchinson W. F., Wills D. P. M., Shipley P., 2004. MICROCHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* **4**, 535-538.

- Villesen P., 2007. FaBox: an online toolbox for fasta sequences. *Molecular ecology notes* **7**, 965-968.
- Wan Q. H., Wu H., Fujihara T., Fang S. G., 2004. Which genetic marker for which conservation genetics issue?. *Electrophoresis* **25**, 2165-2176.
- Weiss S., Persat H., Eppe R., Schlotterer C., Uiblein F., 2002. Complex patterns of colonization and refugia revealed for European grayling *Thymallus thymallus*, based on complete sequencing of the mitochondrial DNA control region. *Molecular Ecology* **11**, 1139-1407.
- Wilson A. C., Cann R. L., Carr S. M., George M., Gyllensten U. B., Helm-Bychowski K. M., Stoneking M. et al., 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society*, **26**, 375-400.

<https://commons.wikimedia.org> (pristupljeno 11. 5. 2021.)

<https://www.iucnredlist.org> (pristupljeno 11. 5. 2021.)

## **7. Prilozi**

### **Prilog 1.**

Tablica vrijednosti rezultata provjere viška heterozigotnosti pomoću tzv. *sign test-a*, *standard differences test-a* i *two tailed Wilcoxon sign test-a* pod tri mutacijska modela IAM, TPM i SMM. Značajne vrijednosti ( $p < 0,05$ ) označene su zvjezdicom \*.

### **Prilog 2.**

Grafički prikaz rezultata analize strukturiranosti populacija u programu STRUCTURE za  $\Delta K=8$  i  $\Delta K=12$ . Svaki klaster označen je jednom bojom. Nazivi ispod grafova označavaju populacije, a jedan stupac predstavlja jednu jedinku.

### **Prilog 3.**

Rezultati analize glavnih koordinata (PCoA) bez sjevernomakedonske populacije MAN.

### **Prilog 4.**

Neukorijenjeni dendrogram izrađen metodom susjednog sparivanja temeljen na matrici DA genetskih udaljenosti bez sjevernomakedonske populacije MAN. Prikazane su vrijednosti podržanosti veće od 50%.

### **Prilog 5.**

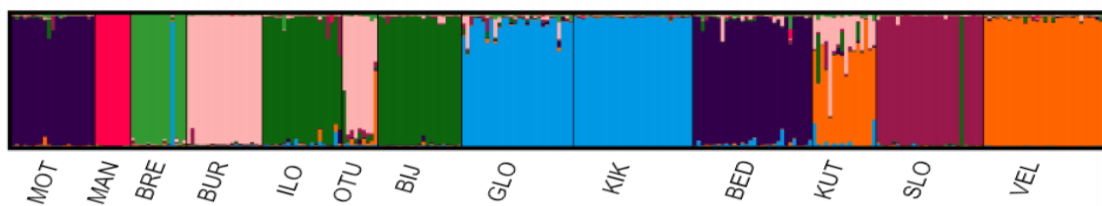
Tablica vrijednosti rezultata analize molekularne varijance (AMOVA) bez sjevernomakedonske populacija MAN. Populacije su grupirane prema pripadajućim pritokama: Sava, Drava, Zrmanja.

**Prilog 1.** Vrijednosti rezultata provjere viška heterozigotnosti pomoću tzv. *sign test-a*, *standard differences test-a* i *two tailed Wilcoxon sign test-a* pod tri mutacijska modela. IAM – model beskonačnog broja alela, TPM – dvofazni model, SMM – model postupnih mutacija. Značajne vrijednosti ( $p < 0,05$ ) označene su zvjezdicom \*.

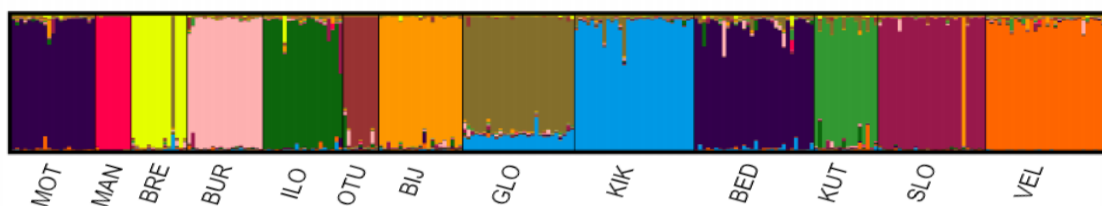
Populacija	Sign test			Standardized differences test			Two tailed Wilcoxon sign test		
	IAM	TPM	SMM	IAM	TPM	SMM	IAM	TPM	SMM
MOT	0,013 *	0,185	0,387	0,001 *	0,035 *	0,478	0,000 *	0,026 *	0,934
MAN	0,060	0,125	0,390	0,025 *	0,073	0,143	0,084	0,131	0,375
BRE	0,048 *	0,354	0,223	0,074	0,469	0,082	0,073	0,454	0,359
BUR	0,232	0,321	0,014 *	0,123	0,466	0,032 *	0,252	1,000	0,151
ILO	0,003 *	0,361	0,575	0,003 *	0,105	0,165	0,008 *	0,055	0,890
OTU	0,051	0,479	0,247	0,035 *	0,178	0,482	0,026 *	0,229	0,978
BIJ	0,135	0,449	0,238	0,024 *	0,284	0,062	0,095	0,720	0,454
GLO	0,068	0,584	0,010 *	0,018 *	0,382	0,0023 *	0,008 *	0,679	0,064
KIK	0,045 *	0,186	0,597	0,008 *	0,133	0,174	0,022 *	0,135	0,934
BED	0,455	0,047 *	0,011 *	0,257	0,022 *	0,000 *	0,421	0,121	0,008 *
KUT	0,019 *	0,379	0,104	0,007 *	0,147	0,145	0,000 *	0,121	0,389
SLO	0,003 *	0,434	0,143	0,003 *	0,087	0,277	0,001 *	0,104	0,583
VEL	0,159	0,548	0,040 *	0,066	0,342	0,000 *	0,107	0,720	0,095

**Prilog 2.** Grafički prikaz rezultata analize strukturiranosti populacija u programu STRUCTURE za  $\Delta K=8$  i  $\Delta K=12$ . Svaki klaster označen je jednom bojom. Nazivi ispod grafova označavaju populacije, a jedan stupac predstavlja jednu jedinku.

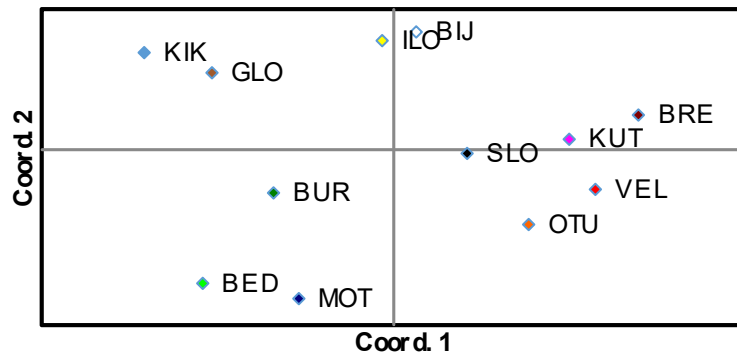
K=8



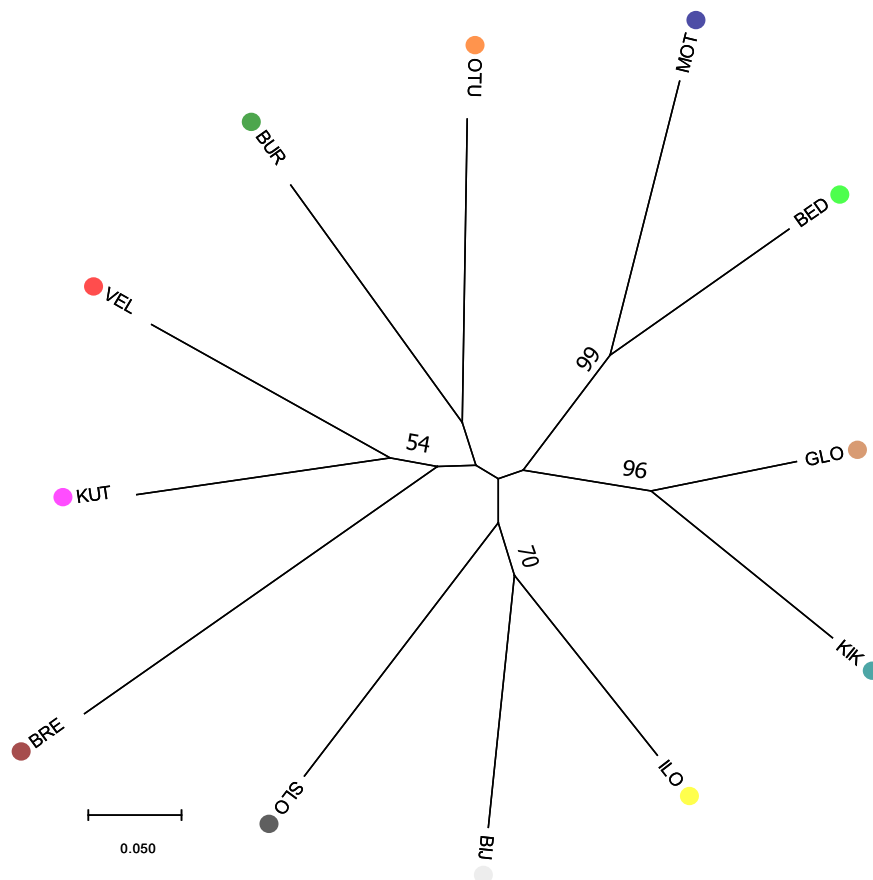
K=12



**Prilog 3.** Rezultati analize glavnih koordinata (PCoA) bez sjevernomakedonske populacije MAN.



**Prilog 4.** Neukorijenjeni dendrogram izrađen metodom susjednog sparivanja temeljen na matrici  $D_A$  genetskih udaljenosti bez sjevernomakedonske populacije MAN. Prikazane su vrijednosti podržanosti veće od 50%.



**Prilog 5.** Rezultati analize molekularne varijance (AMOVA) bez sjevernomakedonske populacije MAN. Populacije su grupirane prema pripadajućim pritokama: Sava, Drava, Zrmanja.

<b>Razina</b>	<b>Postotak varijance (%)</b>
Između grupa	3,50
Između populacija unutar grupe	22,32
Unutar populacija	74,12

## Životopis

Rođena sam u Zagrebu gdje sam pohađala OŠ Matije Gupca i OŠ Ivana Filipovića, a zatim Drugu gimnaziju. U akademskoj godini 2015./2016. redovno sam upisala Preddiplomski studij biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom trajanja preddiplomskog studija bila sam demonstratorica na vježbama iz bakteriologije, primala STEM stipendiju, aktivno sudjelovala u manifestaciji „Dan i noć na PMF-u“ 2017. i 2018. godine te bila dio organizacijskog tima trećeg Simpozija studenata bioloških usmjerenja. Također sam se učlanila u Udrugu studenata biologije – BIUS te kao aktivna članica sudjelovala u Istraživačko-edukacijskom projektu „Insula Tilagus 2017.“, a zatim organizirala i vodila Istraživačko-edukacijski projekt „Šuma Žutica 2018.“ Po završetku akademske godine 2017./2018. i napisanog završnog seminarara pod mentorstvom doc. dr. sc. Sunčice Bosak stekla sam diplomu sveučilišne prvostupnice biologije. U akademskoj godini 2018./2019. redovno sam upisala Diplomski studij eksperimentalne biologije na Prirodoslovnom-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Na prvoj godini diplomskog studija odradila sam laboratorijsku stručnu praksu na Biološkom odsjeku PMF-a pod mentorstvom doc. dr. sc. Anamarie Štambuk te održala predavanje na temu „Okolišna DNA u istraživanjima bioraznolikosti“ učenicima osnovnih i srednjih škola u sklopu javnog seminarara kolegija Raznolikost faune Hrvatske. Kao apsolvantica odradila sam stručnu praksu na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada pod mentorstvom dr. sc. Anje Katić.

### Nagrade

Rektorova nagrada za društveno koristan rad u akademskoj i široj zajednici, Treći simpozij studenta bioloških usmjerenja