Upotreba molekularnih biljega u identifikaciji različitih vrsta kamenica u Jadranu

Vondrak, Tihana

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:444893

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-16**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Tihana Vondrak

Upotreba molekularnih biljega u identifikaciji različitih vrsta kamenica u Jadranu

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju za strukturu i funkciju heterokromatina Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom dr. sc. Brankice Mravinac, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Veliku zahvalnost, u prvom redu, dugujem mentorici dr. sc. Brankici Mravinac za vodstvo prilikom izrade ovog diplomskog rada. Nadalje, zahvaljujem se svim djelatnicima Laboratorija za strukturu i funkciju heterokromatina na suradnji i pomoći.

Zahvaljujem se svim profesorima, kolegama, prijateljima i prijateljicama koji su studij učinili zanimljivim i uspješnim.

Također zahvaljujem se svojoj obitelji koja mi je uvijek bila podrška.

I na kraju najveću zaslugu za sve što sam postigla pripisujem svojim roditeljima, koji su uvijek bili uz mene i bez kojih sve što sam dosad postigla ne bi bilo moguće.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

Upotreba molekularnih biljega u identifikaciji različitih vrsta kamenica u Jadranu

Tihana Vondrak

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Školjkaš *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793) prirodno je rasprostranjen na obalama Japana te jugoistočne Azije. Ova vrsta uvedena je na područje Europe 1960-tih godina kako bi zamijenila izlovljene populacije autohtone vrste *Ostrea edulis* (Linnaeus 1758). Vrsta *O. edulis* je gospodarski vrlo važan školjkaš široko prisutan u Jadranu, dok je vrsta *C. gigas* u hrvatski dio Jadrana unesena relativno nedavno. Isključivo morfološko razlikovanje vrsta *O. edulis* i *C. gigas* može biti nepouzdano. Stoga su u ovom radu korišteni mitohondrijski biljezi 16S rDNA i COI kako bi se potvrdila prisutnost alohtone vrste *C. gigas* u području sjevernog Jadrana kao i njezino širenje u područje srednjeg Jadrana. Ovim radom dokazano je također da se nuklearni biljezi 5S rDNA, ITS1 i ITS2 mogu koristiti u svrhu uspješnog razlikovanja jedinki vrsta *C. gigas* i *O. edulis*.

(42 stranice, 15 slika, 8 tablica, 37 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnoj biološkoj knjižnici
Ključne riječi: *Crassostrea gigas, Ostrea edulis,* 16S rDNA, COI, ITS1, ITS2, 5S rDNA
Voditelj: Dr. sc. Brankica Mravinac, znanstveni suradnik
Ocjenitelji: Dr. sc. Maja Matulić, izv. prof.
Dr. sc. Ana Galov, izv. prof
Dr. sc. Ivana Buj, doc.
Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

Molecular markers in identification of oyster species in the Adriatic sea

Tihana Vondrak

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The clam *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793) is a native species on the coast of Japan and Southeast Asia. *C. gigas* was introduced into European coastal waters in the 1960's in an attempt to replace the overexploited populations of the native clam *Ostrea edulis* (Linnaeus 1758). The species *O. edulis* is economically very important and is widely present on the coast of the Adriatic sea, while the species *C. gigas* has been recently introduced onto the Croatian coast of the Adriatic. Discrimination between species *O. edulis* and *C. gigas* based only on morphology can be unreliable. Therefore the mitochondrial markers 16S rDNA and COI were used to confirm the presence of the invasive species *C. gigas* in the northern Adriatic as well as its propagation to the central Adriatic. Furthermore this thesis proved that nuclear markers 5S rDNA, ITS1 and ITS2 can be used for successful differentiation between the species *C. gigas* and *O. edulis.*

(42 pages, 15 figures, 8 tables, 37 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library
Key words: *Crassostrea gigas, Ostrea edulis,* 16S rDNA, COI, ITS1, ITS2, 5S rDNA
Supervisor: Brankica Mravinac, PhD, Research Associate
Reviewers: Maja Matulić, PhD, Assoc. Prof.
Ana Galov, PhD, Assoc. Prof.
Ivana Buj, PhD, Asst. Prof.
Thesis accepted:

POPIS KRATICA

KRATICA	OBJAŠNJENJE
COI	citokrom c oksidaza I
16S rDNA	16S ribosomalna DNA
5S rDNA	5S ribosomalna DNA
ITS	eng. *internal transcribed spacer*
NTS	eng. *non-transcribed spacer*
pb	parova baza
PCR	lančana reakcija polimeraze; eng. *polymerase chain reaction*
RAPD	eng. *random amplified polymorphic DNA*
AFLP	eng. *amplified fragment length polymorphism*
SSR	mikrosateliti, eng. *simple sequence repeats*
BLAST	eng. *Basic Local Alignment Search Tool*
ML	eng. *Maximum Likelihood*
NJ	eng. *Neighbour Joining*
MP	eng. *Maximum Parsimony*
BIC	eng. *Bayesian Information Criterion*
NNI	eng. *Nearest-Neighbour-Interchange*
CNI	eng. *Close-Neighbor-Interchange*

SADRŽAJ

1. UVOD.....1
1.1. Kamenice *Ostrea edulis* i *Crassostrea gigas*.....1
1.1.1. Vrsta *Ostrea edulis*.....1
1.1.2. Vrsta *Crassostrea gigas*.....2
1.2. Molekularni biljezi u identifikaciji vrsta.....4
1.3. Cilj istraživanja.....6
2. MATERIJALI I METODE.....7
2.1. Materijali.....7
2.1.1. Životinjski materijal.....7
2.1.2. Osnovne kemikalije.....8
2.1.3. Puferi i otopine.....8
2.1.4. Kompleti reagencija.....8
2.1.5. Elektroforetski biljeg.....9
2.1.6. Tehnička oprema i uređaji.....9
2.2. Metode.....10
2.2.1. Izolacija genomske DNA.....10
2.2.2. Umnažanje odsječaka DNA metodom lančane reakcije polimerazom (PCR).....10
2.2.2.1. Početnice.....11
2.2.2.2. Reakcijske smjese PCR-a i uvjeti reakcije.....11
2.2.2.3. Elektroforetsko razdvajanje odsječaka DNA u agaroznom gelu.....13
2.2.2.4. Određivanje nukleotidnih sljedova PCR produkata.....13
2.2.2.5. Bioinformatička analiza nukleotidnih sljedova.....14
3. Rezultati.....15
3.1. Identifikacija jadranskih primjeraka kamenica analizom molekularnih biljega COI i 16S rDNA.....15
3.1.1. Analiza haplotipova 16S rDNA.....18
3.1.2. Analiza haplotipova COI.....24
3.2. Testiranje jadranskih primjeraka kamenica analizom biljega 5S rDNA, ITS1 i ITS2..28
3.2.1. Optimizacija uvjeta za PCR analizu biljega 5S rDNA, ITS1 i ITS2.....28
3.2.2. Identifikacija deset jadranskih primjeraka kamenica analizom biljega 5S rDNA, ITS1 i ITS2.....30
4. RASPRAVA.....32

5. ZAKLJUČAK.....36
6. LITERATURA.....37
7. PRILOZI.....42

1. UVOD

1.1. Kamenice *Ostrea edulis* i *Crassostrea gigas*

Vrste *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793) i *Ostrea edulis* (Linnaeus 1758) pripadaju porodici školjkaša Ostreidae razreda Bivalvia (školjkaši) iz koljena Mollusca (mekušci) (Salvi i sur., 2014). Porodica Ostreidae obuhvaća 75 identificiranih vrsta rasprostranjenih po svim kontinentima, osim po Antarktici i nekim oceanskim otocima (Liu i sur., 2011). Osim po širokoj rasprostranjenosti, ova porodica je značajna i po ekonomskoj važnosti.

1.1.1. Vrsta *Ostrea edulis*

Vrsta *Ostrea edulis,* poznata pod hrvatskim nazivom europska kamenica, autohtona je europska vrsta koja je rasprostranjena od obale Norveške do Maroka u sjeverno-istočnom Atlantiku i cijelom Mediteranskom moru (FAO, 2017a). Vrsta *O. edulis* se može pronaći na tvrdim podlogama u vodama dubine do 20 metara.

Ovaj školjkaš ovalnog je ili kruškolikog oblika s asimetričnim ljušturama. Lijeva (donja) ljuštura je konkavnog oblika i vezana za podlogu, dok je desna (gornja) ljuštura plosnata. Desna ljuštura je bijele ili žute boje sa smeđim ili plavim koncentričnim prugama, dok je unutrašnjost ljušture bijele ili sivo-plave boje s tamnijim plavim regijama (slika 1.). Ova vrsta može se pronaći u estuarijima i područjima saliniteta do 23 ‰. Odrasle jedinke mogu biti duge 10 do 12 centimetara.

Slika 1. Slika ljušture vrste *O. edulis* (preuzeto iz Lapègue i sur., 2010).

Vrsta *O. edulis* je u Jadranu uvijek bila gospodarski značajna vrsta. Zbog izuzetno kvalitetnog i ukusnog mesa ovaj školjkaš se skupljao u prehrambene svrhe unatrag najmanje 6000 godina (Lapègue i sur., 2010). Najznačajnije mjesto uzgoja ove kamenice u hrvatskom dijelu Jadrana je Malostonski zaljev. Populacija kamenica u istočnom dijelu Jadrana različite je genetičke linije u odnosu na kamenice rasprostranjene izvan Jadrana (Horváth i sur., 2013). Mortalitet populacija ove vrste još uvijek raste zbog parazita unesenih iz Sjeverne Amerike. Međutim, populacije na istoku Jadrana nisu inficirane nametnicima zbog izostanka uvođenja mlađi iz Europe i oceanografskih svojstava Jadranskog mora (Viličić, 2017).

1.1.2. Vrsta *Crassostrea gigas*

Vrsta *Crassostrea gigas*, poznata u hrvatskom nazivlju kao pacifička kamenica, prirodno je rasprostranjena na obalama Japana i području jugoistočne Azije.

Populacije školjkaša *C. gigas* se većinom smještaju na područja kamenitog dna, ali preživljavaju i na mekim podlogama ili na ljušturama drugih školjkaša. Nalaze se na dubinama do 15 metara u zaštićenim vodama saliniteta od 10 do 42 ‰. Morfologija ovog školjkaša je izuzetno varijabilna te ovisi o tipu podloge i napučenosti staništa. Ukoliko su smještene na tvrdoj podlozi ljušture su hrapave i okruglog oblika, a ukoliko se nalaze na mekoj podlozi (pijesak, blato...) ljušture su glatke i ovalne (FAO, 2017b). Ljušture su asimetrične, lijeva (donja) je konveksna i pričvršćena za podlogu dok je desna (gornja) konkavna. Ljušture su bijele boje s ljubičastim oznakama i koncentrični lamelama koje se šire od umba. Unutrašnjost ljušture je bijela (slika 2.).

Slika 2. Vanjska i unutarnja strana ljušture vrste *C. gigas* (preuzeto iz Nehring, 2011)

Smanjenjem brojnosti prirodnih populacija vrste *O. edulis* kao posljedica izlovljavanja, vrsta *C. gigas* je uvedena u Europu u svrhu akvakulturne proizvodnje. Prvo je uvedena u Dansku 1964. godine, a danas je rasprostranjena od Skandinavije do Portugala te u Mediteranskom i Crnom moru (FAO, 2017b). Vrsta *C. gigas* je uvezena i u talijanski dio Jadrana odakle se proširila istočno na slovensku i hrvatsku obalu. Trenutno je vrlo brojna na području Istre, te se nedavno molekularnim metodama potvrdilo da se proširila i na središnji Jadran (Šegvić-Bubić i sur., 2016). Populacije vrste *C. gigas* u Jadranu pronađene su same ili u zajednici s dagnjom *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819).

Isključivo morfološka determinacija školjkaša ponekad je nepouzdana budući da školjkaši mogu biti morfološki izuzetno plastični. Pritom, školjkaši mogu prijeći velike udaljenosti u ličinačkom stadiju, a vrlo lako se prirodnim ili ljudskim vektorima šire na nova područja. Također, ponekad je moguća i hibridizacija jedinki srodnih vrsta, pri čemu je identifikacija križanaca dodatno otežana. Tako se donedavno smatralo da su školjkaši *C. gigas* i *Crassostrea angulata* ista vrsta (Boudry i sur., 2003). Međutim, analizom DNA sekvenci molekularnog biljega citokrom c oksidaze podjedince 1 (COI) dokazano je da je udvojena udaljenost sekvenci manja nego što bi se očekivalo od sekvenci odvojenih vrsta, ali da postoje razlike koje ih odvajaju (Liu i sur., 2011). S obzirom da je vrlo teško isključivo morfološki razlikovati vrstu *C. gigas* od vrste *C. angulata,* proveden je veliki broj

molekularnih studija kako bi se potvrdila pripadnost jedinki jednoj ili drugoj vrsti. Primjerice, studija provedena na području Tajvana, gdje se smatralo da populacija istraživanih kamenica pripada vrsti *C. gigas,* dokazala je da jedinke pripadaju vrsti *C. angulata* (Jozefowicz i Foighil, 1998). Ova i slične studije ukazuju na važnost upotrebe molekularnih biljega u identifikaciji školjkaša roda *Crassostrea*.

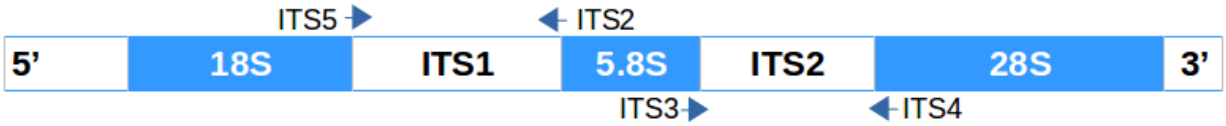
1.2. Molekularni biljezi u identifikaciji vrsta

Unapređenjem tehnologije sekvenciranja, kao dodatak morfološkoj determinaciji vrste, sve češće se za determinaciju vrsta koristi metoda barkodiranja. Metoda barkodiranja uključuje analizu kratkih DNA segmenata koje nazivamo molekularnim biljezima. Kako bi se neki segment mogao koristiti kao molekularni biljeg, interspecijska varijacija nukleotidnog slijeda mora biti velika u odnosu na intraspecijsku varijaciju nukleotidnog slijeda (Sekino i Yamashita, 2013). Razlikujemo veliki broj mitohondrijskih i nuklearnih biljega koji se koriste u analizi identiteta vrsta, ali i u proučavanju srodstvenih odnosa.

Mitohondrijska DNA se od njenog otkrića 1970. godine pokazala vrlo korisnom za analizu molekularnih biljega iz nekoliko razloga: organizirana je u mali, strukturno jednostavni, kružni genom; prisutna je u stanici u velikom broju kopija pa je zbog toga jednostavna za izolaciju; nasljeđuje se isključivo po majčinoj liniji; ne sadrži introne niti bilo koje druge nekodirajuće sekvence; ne podliježe rekombinaciji; evoluira brže od nuklearne DNA; najčešće sadrži 37 gena (13 proteina, 22 tRNA i 2 rRNA) različitog stupnja varijabilnosti za koje postoje dobro definirane univerzalne početnice PCR-a (Zhang i Hewitt, 1996). Gen za citokrom c oksidazu i to podjedinicu 1 (COI) ima robustan set univerzalnih početnica, što omogućava umnažanje 5' kraja gena iz gotovo svih Metazoa te je postao najčešće korišteni mitohondrijski biljeg (Hebert i sur., 2003). Osim biljega COI, u identifikaciji i određivanju srodstvenih odnosa školjkaša od mitohondrijskih biljega često se koristi i biljeg 16S rDNA (Canapa, 1996).

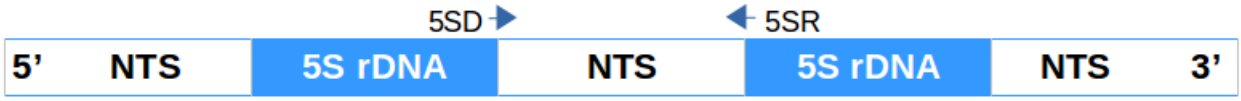
Nuklearna DNA također se koristi u proučavanju srodstvenih odnosa i identifikaciji vrsta. Često upotrebljavani molekularni biljezi nuklearne DNA su RAPD (akronim od eng. *random amplified polymorphic DNA*), AFLP (eng. *amplified fragment length polymorphism*) te mikrosateliti (nazivani još i SSR biljezima (eng. *short sequence repeats*)). Isto tako

koriste se biljezi ITS (eng. *internal transcribed spacer*), ITS1 i ITS2. Biljezi ITS su smješteni između rRNA gena i transkribiraju se u cjelini s policistronskim rRNA prekursorom. ITS1 biljeg se nalazi između 18S i 5.8S gena, a ITS2 između 5.8S i 28S gena (slika 3.). Budući da su sekvence gena dobro očuvane, koriste se početnice smještene unutar gena te se umnažaju varijabilne, ali vrsno-specifične regije ITS. ITS regije međusobno se razlikuju duljinom i slijedom sekvence između pojedinih vrsta, što ih čini pogodnima za ovakvu analizu.



Slika 3. Shema regija ITS1 i ITS2 u ponavljajućim jedinicama rDNA. Strelicama su označene pozicije vezanja početnica koje se koriste u amplifikaciji biljega ITS1 i ITS2.

Na sličan način koristi se nuklearni biljeg 5S rRNA koji kodira podjedinicu ribosoma 5S. 5S rRNA geni se tandemski ponavljaju u genomu, a međusobno su odvojeni regijama NTS (eng. *non-transcribed spacer*) koje se razlikuju po svojoj duljini i slijedu sekvence. Upravo varijabilnost regija NTS omogućavaju korištenje 5S rRNA u identifikaciji vrsta i određivanju srodstvenih odnosa. Za umnažanje PCR koriste se univerzalne početnice koje se vežu unutar 5S rRNA gena (slika 4.).



Slika 4. Shema gena za 5S rRNA razdvojenih neprepisujućim segmentima DNA (NTS).

Strelicama su označeni položaji vezanja početnica koje se koriste u amplifikaciji biljega 5S rDNA.

Prilikom analize svakako je poželjno koristiti veći broj različitih biljega. Pritom idealnu kombinaciju čini združena analiza nuklearnih i mitohondrijskih biljega. Iako su mitohondrijski biljezi preferirani, zbog nasljeđivanja po majčinskoj liniji njihovom analizom nije moguće otkriti križane jedinke. Taj problem može se premostiti analizom nuklearnih biljega.

1.3. Cilj istraživanja

Cilj ovog rada bio je potvrditi prisutnost invazivnog školjkaša *C. gigas* u području zapadne obale Istre te ispitati njegovo potencijalno širenje na južnije lokalitete hrvatske obale.

U tu svrhu analizirani su nukleotidni sljedovi gena citokrom c oksidaze podjedinice 1 (COI) i 16S rRNA. Upotrijebljena je analiza dvaju molekularnih biljega kako bi se ispitivane jedinke determinirale s velikom sigurnošću. Također je testirano mogu li se nuklearni biljezi 5S rDNA, ITS1 i ITS2 koristiti u svrhu uspješnog razlikovanja jedinki vrsta *C. gigas* i *O. edulis*.

2. Materijali i metode

2.1. Materijali

2.1.1. Životinjski materijal

Kamenice roda *Crassostrea* i *Ostrea* prikupljene su na lokacijama: Tar, Poreč, Zelena Laguna, otok Sveti Nikola, Lim, Pula, Pomer, kamp Tunarica, Bakar, Crikvenica, Senj, Zadar, Split, Podstrana, Lovište i Ston (slika 5.). Broj jedinki prikupljenih na pojedinoj lokaciji te vrste kojima jedinke pripadaju navedeni su u tablici 6 u poglavlju 3.1. .

Slika 5. Zemljopisna karta Hrvatske s označenim lokalitetima na kojima su prikupljene jedinke vrsta *Crassostrea gigas, Ostrea edulis* i *Ostrea stentina* analizirane u ovome radu.

Uzorke je prikupila i morfološki determinirala dr. sc. Vedrana Nerlović iz Centra za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju. Morfološka determinacija prikupljenih jedinki napravljena je na temelju analize morfoloških karakteristika ljuštura.

2.1.2. Osnovne kemikalije

- etidijev bromid (Serva)
- etanol (Kemika)
- agaroza (Sigma)
- orange G (Sigma)
- octena kiselina (Kemika)
- etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) (Sigma)
- Tris (Sigma)

2.1.3. Puferi i otopine

- TAE (pH 8,3): 40 mM Tris-HCl, 20 mM Na-acetat, 2 mM EDTA

2.1.4. Kompleti reagencija

- komplet „DNeasy Blood and Tissue Kit“ za izdvajanje DNA iz tkiva (QIAGEN)

- komplet „GoTaq Green Master Mix“ za lančanu reakciju polimerazom, koji sadržava u 2x koncentriranom reakcijskom puferu Green GoTaq: DNA polimerazu GoTaq , 400 μM smjesu dNTP i 3 mM MgCl 2 (Promega)

- kombinacija enzima Exonuclease I i FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (ThermoFisher Scientific) za pročišćavanje produkata reakcije PCR-a

2.1.5. Elektroforetski biljeg

- O'GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas), koji sadrži smjesu odsječaka DNA duljine 100 pb, 200 pb, 300 pb, 400 pb, 500 pb, 600 pb, 700 pb, 800 pb, 900 pb, 1000 pb, 1200 pb, 1500 pb, 2000 pb, 2500 pb, 3000 pb, 3500 pb, 4000 pb, 5000 pb, 6000 pb, 8000 pb i 10000 pb

2.1.6 Tehnička oprema i uređaji

- PCR uređaj 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems)
- sustav za elektroforezu (Bio-Rad)
- UV transiluminator sa sustavom za snimanje agaroznih gelova G:BOX (Syngene)
- stolna mikrocentrifuga Minispin (Eppendorf)
- termoblok (Bioblock Scientific)
- termostatski inkubator (Sutjeska)
- spektrofotometar NanoDrop (ThermoFisher Scientific)

2.2. METODE

2.2.1. Izolacija genomske DNA

Genomska DNA izolirana je komercijalnim kompletom „DNeasy Blood and Tissue Kit“ iz mišića zatvarača kamenica prema uputama proizvođača. Koristeći sterilni skalpel i pincetu odrezano je 25 mg tkiva. Tkivu je dodano 180 µL pufera ATL i 20 µL proteinaze K. Tkivo je dodatno usitnjeno sterilnim plastičnim štapićem te je smjesa inkubirana na 56 °C tijekom jednog sata. Nakon inkubacije smjesi je dodano 6 µL enzima RNaze A (100 mg/mL), 200 µL pufera AL te 200 µL 96% etanola. Smjesa je potom prebačena na membransku kolonu i centrifugirana pri brzini 6000 x g tijekom 1 minute. Prvo ispiranje vezane DNA napravljeno je s 500 µL pufera AW1, iza čega je uslijedilo centrifugiranje pri brzini 6000 x g 1 minutu. Drugo ispiranje napravljeno je puferom AW2, a popraćeno je centrifugiranjem pri brzini 20000 x g kroz 1 minutu. DNA je s membrane eluirana dodatkom 200 µL AE pufera te centrifugiranjem pri brzini 6000 x g tijekom 1 minute. Elucijski pufer sadržavao je 10 mM Tris-Cl i 0.5 mM EDTA(pH 9.0), dok sastav ostalih pufera nije naveden od strane proizvođača. Kvaliteta i količina izolirane DNA provjerene su elektroforetskim razdvajanjem na 1% agaroznom gelu i usporedbom s λ-DNA poznate koncentracije te mjerenjem koncentracije izolirane DNA pomoću NanoDrop spektrofotometra. Uvjeti provedene elektroforeze su opisani u poglavlju 2.2.2.3. (Elektroforetsko razdvajanje odsječaka DNA u agaroznom gelu).

2.2.2. Umnažanje odsječaka DNA metodom lančane reakcije polimerazom (PCR)

Iz izolirane genomske DNA jedinki roda *Crassostrea* i *Ostrea* umnoženi su odsječci biljega metodom lančane reakcije polimerazom (PCR).

2.2.2.1. Početnice

Korištene su početnice za umnažanje pet molekularnih biljega: citokrom oksidaza podjedinica 1 (COI), 16S rDNA, 5S rDNA, regije ITS1 i ITS2. Sekvence korištenih početnica prikazane su u tablici 1. Navedene oligonukleotidne početnice sintetizirane su u korisničkom servisu Invitrogen (SAD). Pomoću metode gradijentnog PCR-a određene su optimalne temperature sparivanja pojedinog para početnica s kalupom DNA.

Tablica 1. Parovi početnica korišteni pri umnažanju biljega COI, 16S rDNA, 5S rDNA, ITS1 i ITS2 metodom PCR

DNA biljeg	nukleotidni slijed početnica	izvor
COI	LCO-1490 5' -GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG- 3' HCO-2198 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'	Folmer i sur., 1994
16S rDNA	16S-LRN 5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT- 3' 16S-br 5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'	Palumbi i sur., 2002
5S rDNA	5SD 5'-CAACGTGATATGGTCGTAGAC – 3' 5SR 5'-AACACCGGTTCTCGTCCGATC - 3'	Hurtado i sur., 2011
ITS1	ITS5 5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC - 3' ITS2 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG - 3'	Hurtado i sur., 2011
ITS2	ITS3 5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC - 3' ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3'	Hurtado i sur., 2011

2.2.2.2. Reakcijske smjese PCR-a i uvjeti reakcije

Reakcije umnažanja odsječaka DNA provodile su se u ukupnom reakcijskom volumenu od 20 µl. Reakcijska smjesa ukupnog volumena 20 µl sadržavala je: 10 µl 2xGoTaq Green Buffer, 1 µM početnica, 5.2 µl mQ-vode i 8 ng genomske DNA.
Programi ciklusa umnažanja pojedinih biljega navedeni su u tablicama 2.-5.

Tablica 2. Program ciklusa umnažanja odsječaka citokrom oksidaze (COI) metodom PCR.

korak reakcije PCR	temperatura	vrijeme	broj
početna denaturacija	94ºC	3 min	1
denaturacija	94ºC	30 s	35
sparivanje	52ºC	30 s	
produljenje	72ºC	30 s	
završno produljenje	72ºC	10 min	1

Tablica 3. Program ciklusa umnažanja odsječaka 16S rDNA metodom PCR.

korak reakcije PCR	temperatura	vrijeme	broj
početna denaturacija	94ºC	3 min	1
denaturacija	94ºC	20 s	35
sparivanje	55ºC	20 s	
produljenje	72ºC	20 s	
završno produljenje	72ºC	10 min	1

Tablica 4. Program ciklusa umnažanja odsječaka ITS1 metodom PCR.

korak reakcije PCR	temperatura	vrijeme	broj
početna denaturacija	94ºC	3 min	1
denaturacija	94ºC	20 s	35
sparivanje	53ºC	20 s	
produljenje	72ºC	20 s	
završno produljenje	72ºC	10 min	1

Tablica 5. Program ciklusa umnažanja odsječaka ITS2 i 5S rDNA metodom PCR.

korak reakcije PCR	temperatura	vrijeme	broj
početna denaturacija	94ºC	3 min	1
denaturacija	94ºC	20 s	35
sparivanje	47ºC	20 s	
produljenje	72ºC	20 s	
završno produljenje	72ºC	10 min	1

2.2.2.3. Elektroforetsko razdvajanje odsječaka DNA u agaroznom gelu

Umnoženi odsječci DNA razdvojeni su elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu. Gel je pripremljen otapanjem agaroze u 1x TAE puferu kojemu je dodan etidijev bromid (0.5 µg/ml) u svrhu vizualizacije DNA. Elektroforeza se odvijala na sobnoj temperaturi pri 80 V. Duljina razdvojenih odsječaka je procijenjena usporedbom s elektroforetskim biljegom „O'GeneRuler DNA Ladder Mix“, a za procjenu količine odsječaka korištena je λ-DNA poznate koncentracije. Nakon elektroforetskog razdvajanja gelovi su fotografirani pomoću uređaja G:BOX, koji omogućava i računalnu pohranu fotografije gela.

2.2.2.4. Određivanje nukleotidnih sljedova PCR produkata

Prije određivanja nukleotidnih sljedova bilo je potrebno pročistiti produkte reakcije PCR. U reakciji enzimatskog pročišćavanja koristila se kombinacija enzima Exonuclease I i FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase prema protokolu tvrtke ThermoFisher Scientific “PCR Product Clean-Up Prior to Sequencing“. U tubicu s produktom reakcije PCR dodano je 0,3 µL egzonukleaze I te 1,5 µL alkalne fosfataze. Smjesa je inkubirana 45 minuta na 37 °C, a potom 15 minuta na 80 °C.

Egzonukleaza I je enzim koji hidrolizira fosfodiestersku vezu jednolančane DNA u 3'→5' smjeru, te se u ovom slučaju koristi za degradaciju suvišnih početnica. Alkalna fosfataza ima ulogu uklanjanja fosfatnih grupa sa suvišnih dNTP, koji kao i suvišne početnice mogu uzrokovati pojavu artefakata prilikom određivanja nukleotidnih sljedova.

Određivanje nukleotidnih sljedova produkata provedeno je u servisu za sekvenciranje Macrogen (Amsterdam, Nizozemska). Svi odsječci su sekvencirani u oba smjera. Kao početnice za sekvenciranje korištene su iste početnice kao i pri umnažanju pojedinih biljega (tablica 1.).

2.2.2.5. Bioinformatička analiza nukleotidnih sljedova

Za uređivanje i bioinformatičku manipulaciju nukleotidnih sljedova korišten je program BioEdit v.7.2.5 (Hall, 1999). Točnost nukleotidnih sljedova uspoređena je sparivanjem komplementarnih lanaca i odgovarajućih kromatograma. Kako sekvence početnica ne bi utjecale na daljnju analizu, sljedovima su uklonjeni krajevi komplementarni početnicama.

Svi nukleotidni sljedovi uspoređeni su s nukleotidnim sljedovima pohranjenima u genskoj bazi NCBI GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). U tu svrhu korišten je *on-line* alat BLAST (eng. *Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul i sur., 1990). Uspoređivanje je provedeno prema algoritmu *megablast,* koji osigurava pronalazak vrlo sličnih nukleotidnih sljedova.

Za filogenetske analize korišteno je više različitih programa. Višestruko sravnjivanje nukleotidnih sljedova napravljeno je programom ClustalX v.2.1. (Larkin i sur., 2007). Program MEGA6 v. 06 (Tamura i sur., 2013) korišten je za provođenje metoda: najveće vjerojatnosti (eng. *Maximum Likelihood,* ML), udruživanje susjeda (eng. *Neighbor Joining,* NJ) i najveće parsimonije (eng. *Maximum Parsimony,* MP) te za račun unutarvrsne i međuvrsne nekorigirane udvojene genetičke udaljenosti (eng. *uncorrected pairwise distance, p-distance*). Za pojedine setove podataka pomoću programa jModelTest (Posada, 2008) odabrani su najpovoljniji modeli nukleotidne supstitucije za analizu ML prema parametru Bayesovog informacijskog kriterija (eng. *Bayesian Information Criterion,* BIC). U analizi ML korištena je heuristička metoda odabira stabla zamjene najbližih susjeda (eng. *Nearest-Neighbor-Interchange,* NNI). U analizi NJ korištene su nekorigirane udvojene udaljenosti (*p-distance*), dok je u analizi MP za pretraživanje stabala korištena metoda zamjene bliskih susjeda (eng. *Close-Neighbor-Interchange,* CNI). Statistička podrška za topologiju filogenetskih stabala određena je na temelju 1000 replikacija (*bootstrap* ponavljanja).

U svrhu analize različitih haplotipova za sekvence citokrom oksidaze (COI) i 16S rDNA, proizvedene su haplotipske mreže programom TCS 1.21 (Clement, Posada i Crandall, 2000) upotrebom metode statističke parsimonije s pragom povezivanja od 90 do 99%.

3. REZULTATI

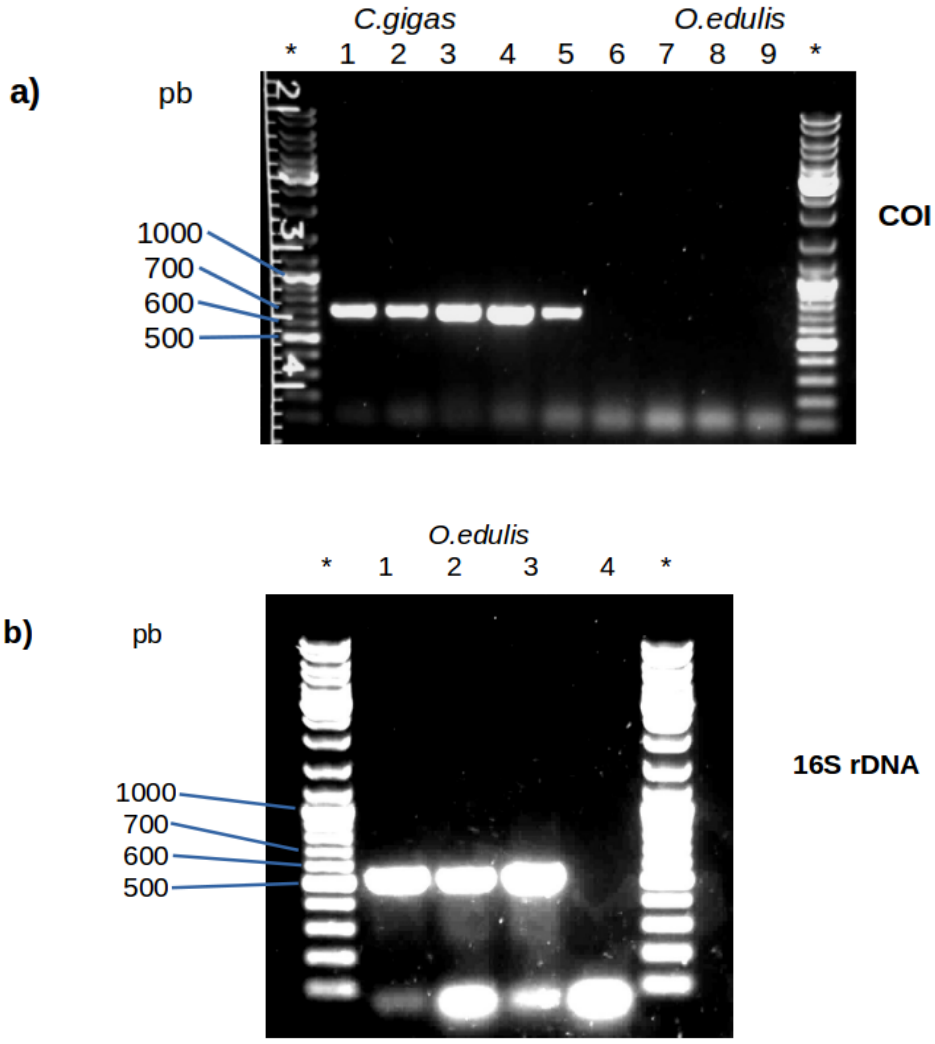
3.1. Identifikacija jadranskih primjeraka kamenica analizom molekularnih biljega COI i 16S rDNA

Tijekom izrade diplomskog rada izolirana je DNA iz 59 jedinki kamenica prikupljenih na 17 različitih lokaliteta duž hrvatske jadranske obale (tablica 6.). Metodom PCR inicijalno je umnožen mitohondrijski biljeg COI. Međutim, kod nekih jedinki je umnažanje biljega COI bilo neuspješno pa se pristupilo također i umnažanju mitohondrijskog biljega 16S rDNA. Prema literaturnim podatcima, očekivana duljina umnoženih odsječaka za vrstu *Crassostrea gigas* trebala bi iznositi 649 pb za fragment COI i 488 pb za 16S rDNA (Liu i sur., 2011), dok se za vrstu *Ostrea edulis* očekuju duljine fragmenata 660 pb za COI (Giribet i Wheeler, 2002) i 489 pb za 16S rDNA (Liu i sur., 2011).

Slika 6. prikazuje elektroforetsko razdvajanje pet uspješno umnoženih fragmenta COI u agaroznom gelu. Prema elektroforetskom biljegu vidljivo je da su fragmenti dobiveni metodom PCR duljine od 600 do 700 pb, u skladu s literaturnim podatcima. Sekvenciranjem i analizom nukleotidnih sljedova utvrđeno je da pet uspješno umnoženih fragmenata COI pripadaju vrsti *C. gigas* (Folmer i sur., 1994). U svrhu identifikacije uzoraka kod kojih je umnažanje biljega COI bilo neuspješno, metodom PCR umnožen je fragment 16S rDNA (slika 6.b). Duljina umnoženih fragmenata 16S iznosi oko 500 pb, što je u skladu s literaturnim podatcima za kamenice (Salvi i sur., 2014). Sukcesivnom analizom nukleotidnih sljedova 16S utvrđeno je da ove jedinke pripadaju vrsti *O. edulis.*

Metodom PCR i sekvenciranjem umnoženih odsječaka analizirani su fragmenti COI za 25 jedinki te fragmenti 16S rDNA za ukupno 48 jedinki. Razlike u nukleotidnim sljedovima utvrđene su poravnavanjem odsječaka 16S rDNA (prilog 1) i odječaka COI (prilog 2). Kombiniranom analizom nukleotidnih sljedova 16S rDNA i COI te njihovom usporedbom s podatcima u bazi NCBI/GenBank utvrđeno je da od ukupno 59 molekularno obrađenih jedinki, 44 jedinke pripadaju vrsti *C. gigas,* 14 jedinki pripada vrsti *O. edulis*, a jedna jedinka pripada vrsti *O. stentina*. Sumarni rezultati su prikazani u tablici 6.

Analizom nukleotidnih sljedova 16S rDNA i COI nedvosmisleno je dokazano da jedinke kod kojih je umnažanje biljega COI bilo neuspješno, pripadaju vrstama *O. edulis* ili *O. stentina.*



Slika 6. Elektroforetsko razdvajanje odsječaka molekularnih biljega COI i 16S rDNA umnoženih u reakciji PCR. **(a)** Biljeg COI umnožen u uzorcima**:** KA11-1 (**1**), KA13-1 (**2**), KA14-1(**3**), KA15-3 (**4**), KA15-4 (**5**), KA17-2 (**6**), KA18-2 (**7**) i KA20-2 (**8**). Brojkom 9 na slici označena je negativna kontrola, a znakom * položaj elektroforetskog biljega. **(b)** Biljeg 16S rDNA umnožen u uzorcima: KA17-2 (**1**), KA18-2 (**2**) i KA20-2 (**3**). Brojkom 4 na slici označena je negativna kontrola, a znakom * položaj elektroforetskog biljega.

Tablica 6. Identifikacija 59 jedinki kamenica iz Jadrana na temelju analize nukleotidnih sljedova molekularnih biljega COI i 16S rDNA.

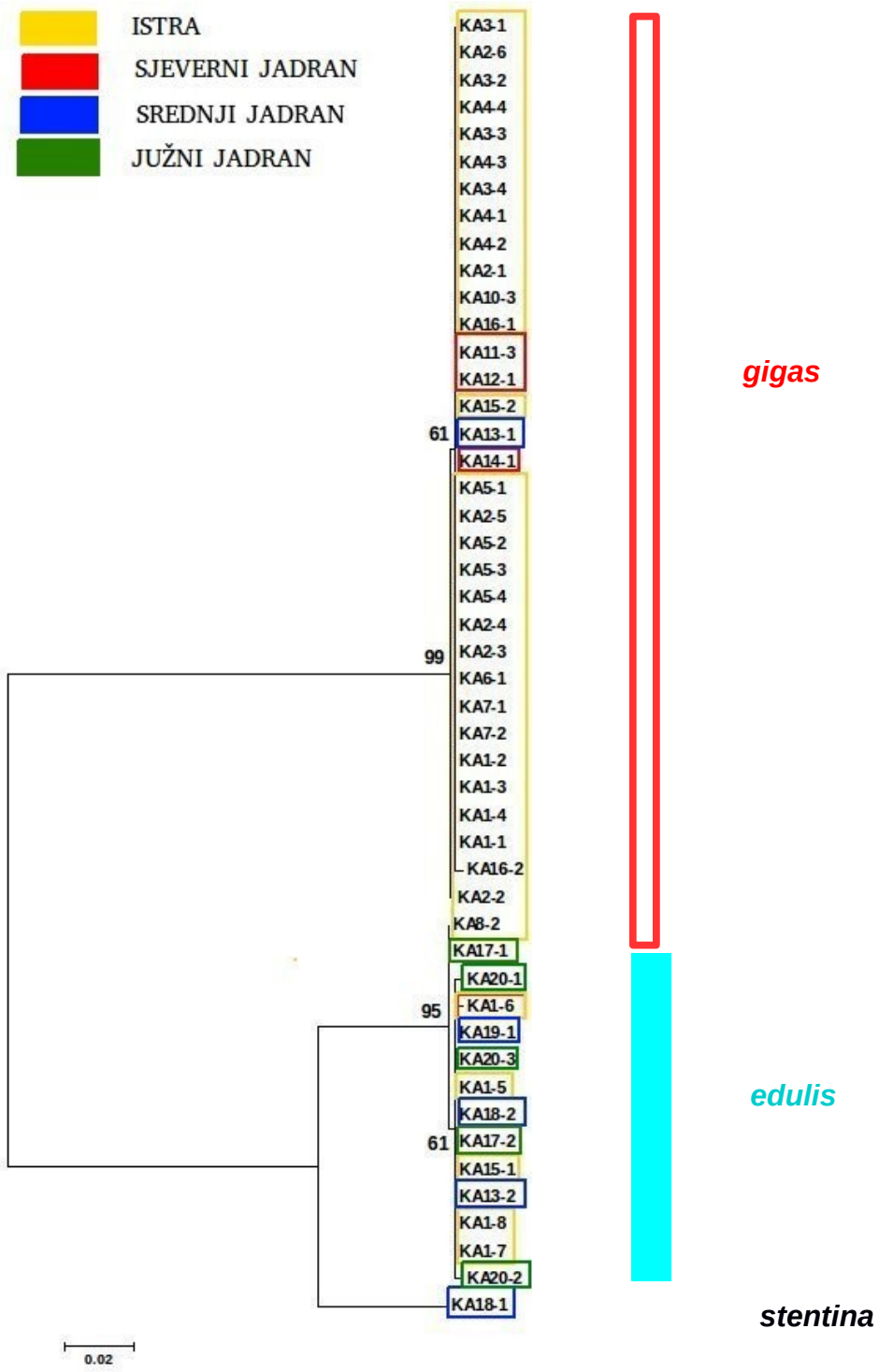
Lokacija i datum uzorkovanja	Oznaka uzorka	Vrsta	16S haplotip	COI haplotip
Pomer 07/2013	KA1-1	*C. gigas*	cg16Shap1	cgCOIhap1a
	KA1-2	*C. gigas*	cg16Shap1	cgCOIhap1
	KA1-3	*C. gigas*	cg16Shap1	cgCOIhap1
	KA1-4	*C. gigas*	cg16Shap1	
	KA1-5	*O. edulis*	oe16Shap1	
	KA1-6	*O. edulis*	oe16Shap1a	
	KA1-7	*O. edulis*	oe16Shap1	
	KA1-8	*O. edulis*	oe16Shap1	
Pula Veruda 07/2013	KA2-1	*C. gigas*	cg16Shap1	cgCOIhap1b
	KA2-2	*C. gigas*	cg16Shap1a	cgCOIhap1
	KA2-3	*C. gigas*	cg16Shap1	cgCOIhap1
	KA2-4	*C. gigas*	cg16Shap1	cgCOIhap1
	KA2-5	*C. gigas*	cg16Shap1	cgCOIhap1
	KA2-6	*C. gigas*	cg16Shap1	cgCOIhap1
Pomer 11/2013	KA3-1	*C. gigas*	cg16Shap1	cgCOIhap1
	KA3-2	*C. gigas*	cg16Shap1	cgCOIhap1
	KA3-3	*C. gigas*	cg16Shap1	cgCOIhap1
	KA3-4	*C. gigas*	cg16Shap1	cgCOIhap1
Pula-Katarina 02/2014	KA4-1	*C. gigas*	cg16Shap1	cgCOIhap1
	KA4-2	*C. gigas*	cg16Shap1	cgCOIhap1
	KA4-3	*C. gigas*	cg16Shap1	cgCOIhap1
	KA4-4	*C. gigas*	cg16Shap1	cgCOIhap1
Pula-ACY 02/2014	KA5-1	*C. gigas*	cg16Shap1	cgCOIhap1
	KA5-2	*C. gigas*	cg16Shap1	cgCOIhap1
	KA5-3	*C. gigas*	cg16Shap1	cgCOIhap1
	KA5-4	*C. gigas*	cg16Shap1	cgCOIhap1
Tar 05/2014	KA6-1	*C. gigas*	cg16Shap1	cgCOIhap1e
Zelena laguna 11/2015	KA7-1	*C. gigas*	cg16Shap1	cgCOIhap1
	KA7-2	*C. gigas*	cg16Shap1	cgCOIhap1
Pula Veruda 03/2016	KA8-1	*C. gigas*		cgCOIhap1
	KA8-2	*O. edulis*	oe16Shap1b	
Zelena laguna 29/05/2016	KA9-1	*C. gigas*		cgCOIhap1c
	KA9-2	*C. gigas*		cgCOIhap1
Otok Sv. Nikola (Poreč) 08/2016	KA10-1	*C. gigas*	cg16Shap1	cgCOIhap1
	KA10-2	*C. gigas*	cg16Shap1	cgCOIhap1
	KA10-3	*C. gigas*	cg16Shap1	cgCOIhap1d
Crikvenica 07/2016	KA11-1	*C. gigas*		cgCOIhap1
	KA11-2	*C. gigas*		cgCOIhap1
	KA11-3	*C. gigas*	cg16Shap1	
Senj 07/2016	KA12-1	*C. gigas*	cg16Shap1	cgCOIhap1
	KA12-2	*C. gigas*		cgCOIhap1
Split-Bene 07/2016	KA13-1	*C. gigas*	cg16Shap1	cgCOIhap1
	KA13-2	*O. edulis*	oe16Shap1	
Bakar 07/2016	KA14-1	*C. gigas*	cg16Shap1	cgCOIhap1
Kamp Tunarica 07/2016	KA15-1	*O. edulis*	oe16Shap1	
	KA15-2	*C. gigas*	cg16Shap1	cgCOIhap1
	KA15-3	*C. gigas*		cgCOIhap1
	KA15-4	*C. gigas*		cgCOIhap1

Lim 07/2016	KA16-1	*C. gigas*	cg16Shap1	cgCOIhap1
	KA16-2	*C. gigas*	cg16Shap1	cgCOIhap1
	KA16-3	*C. gigas*	cg16Shap1b	cgCOIhap1
Lovište 07/2016	KA17-1	*O. edulis*	oe16Shap1b	
	KA17-2	*O. edulis*	oe16Shap1	
Zadar 07/2016	KA18-1	*O. stentina*	os16Shap1	
	KA18-2	*O. edulis*	oe16Shap1	
Podstrana 07/2016	KA19-1	*O. edulis*	oe16Shap1	
Ston 07/2016	KA20-1	*O. edulis*	oe16Shap1c	
	KA20-2	*O. edulis*	oe16Shap1d	
	KA20-3	*O. edulis*	oe16Shap1	

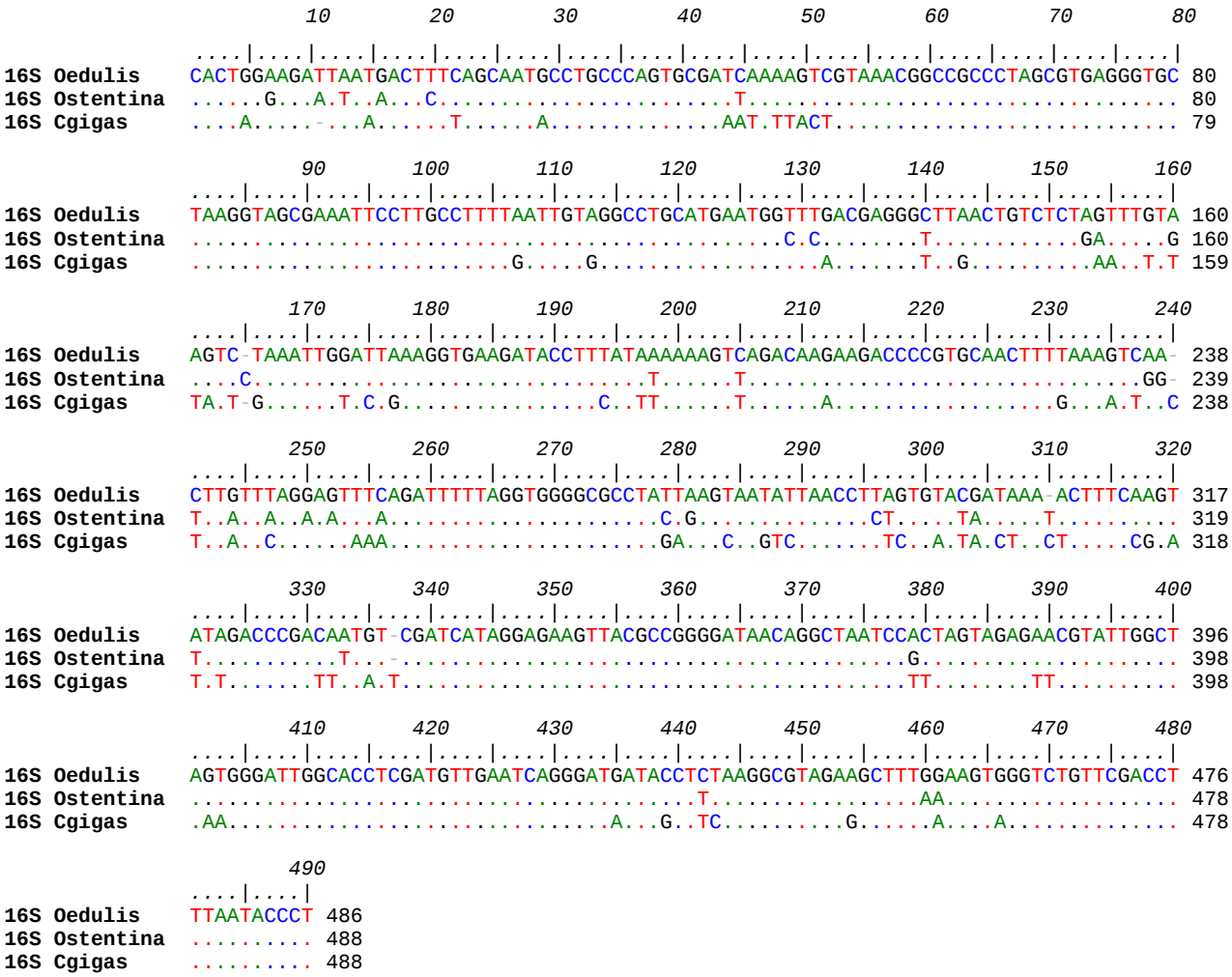
3.1.1. Analiza haplotipova 16S rDNA

Na temelju sravnjenja 48 nukleotidnih sljedova 16S rDNA (prilog 1, slika P1) izrađena su filogenetska stabla metodama Maximum Likelihood (ML), Neighbor Joining (NJ) i Maximum Parsimony (MP). Sve tri metode rezultirale su prikazom stabala koja su se podudarala u osnovnoj topologiji te je zbog jednostavnosti prikaza na slici 7. predočeno samo stablo dobiveno metodom ML. Iz filogenetskog stabla vidljivo je grananje odsječaka 16S rDNA u dvije glavne skupine koje pokazuju vrsnu specifičnost s visokom vrijednošću podrške *bootstrap* od 99%. Veća skupina, koju čine 33 taksona, nazvana je grupom *gigas* budući da jedinke te skupine pripadaju vrsti *C. gigas*. Manja skupina od 15 taksona se dodatno dijeli s podrškom *bootstrap* od 95% na grupu *edulis* (14 taksona), čiji članovi pripadaju vrsti *O. edulis*, i grupu *stentina* (uzorak KA18-1), gdje jedna jedinka pripada vrsti *O. stentina*. Za svaku od grupa izvedeni su konsenzusni nukleotidni sljedovi čije je sravnjenje prikazano na slici 8.

Konsenzusni nukleotidni sljedovi 16S rDNA uspoređeni su s podatcima pohranjenim u genskoj bazi NCBI GenBank. Pretraživanje baze podataka uz upotrebu algoritma megablast, koji osigurava pretraživanje vrlo sličnih sljedova, pokazalo je da konsenzusni slijed 16S vrste *C. gigas* kao najsrodnije sekvence uz 99-100% sličnosti u bazi pronalazi sekvencu mRNA podjedinice 1 citokrom oksidaze, cjeloviti mitohondrijski genom i odsječke 16S rDNA vrste *C. gigas*. Nadalje, konsenzusni slijed 16S vrste *O. stentina* se povezuje s 99% sigurnošću s odsječcima 16S rDNA vrste *O. stentina*, dok se konsenzusni slijed 16S vrste *O. edulis* povezuje sa 16S rDNA odsječcima i mitohondrijskim genomom vrste *O. edulis* sa 100% sigurnošću.



Slika 7. Filogenetski odnosi odsječaka 16S rDNA jedinki vrsta *C. gigas*, *O. edulis* i *O. stentina* dobiveni metodom Maximum Likelihood prema Tamura-3-parametarskom modelu. Brojevi u čvorištu grana predstavljaju postotak stabala koja su podržala prikazanu topologiju u nasumičnoj statističkoj analizi u 1000 navrata (prikazane su samo podrške *bootstrap* koje prelaze 50%). Duljina grana predstavlja broj nukleotidnih promjena po nukleotidnom mjestu.



Slika 8. Poravnanje konsenzus sekvenci 16S rDNA za vrste *O. edulis, O. stentina i C. gigas.* 16S konsenzus za vrstu *O. edulis* prikazan je punim nukleotidnim slijedom, dok su u 16S konsenzus sekvencama za vrste *O. stentina* i *C. gigas* podudarnosti sa sekvencom 16S *O. edulis* prikazane točkama, nukleotidne promjene odgovarajućim slovom, a delecije crticama.

Nakon što je na molekularnom nivou utvrđena/potvrđena pripadnost jedinki pojedinim vrstama, pristupilo se detaljnoj analizi njihovih odsječaka 16S rDNA te izračunu udvojenih udaljenosti (eng. *pairwise distance*, PD) između parova nukleotidnih sljedova unutar i između grupa *gigas*, *edulis* i *stentina*. Analiza udvojenih udaljenosti pokazala je nešto veću divergenciju unutar grupe *edulis*. Naime, prosječna vrijednost za grupu *edulis* iznosi 0.001, dok za grupu *gigas* iznosi 0.000. Analiza prosječnih udvojenih udaljenosti za odsječke 16S rDNA između grupa *gigas*, *edulis* i *stentina* (tablica 7.), pokazala je istu prosječnu vrijednost (0.161) između grupa *gigas-edulis* (u rasponu od 0.159 do 0.163) te *gigas-stentina* (u rasponu od 0.161 do 0.163). Međutim, udvojena udaljenost između grupa *edulis-stentina* niža je i prosječno iznosi 0.068 (u rasponu od 0.066 do 0.070), sugerirajući veću međusobnu sličnost vrsta *O. edulis* i *O. stentina* u odnosu na vrstu *C. gigas*. Vrijednosti udvojenih udaljenosti konzistentne su sa smanjenom podrškom *bootstrap* dijeljenja grane ML stabla na grupe *edulis* i *stentina* (slika 7.).

Tablica 7. Interspecijske udvojene udaljenosti (eng. *pairwise distance*, PD) za odsječke 16S rDNA.

	C. gigas	***O. edulis***
O. edulis	**0.161** (0.159-0.163)	
O. stentina	**0.161** (0.161-0.163)	**0.068** (0.066-0.070)

S obzirom na veći broj analiziranih odsječaka unutar grupa *gigas* i *edulis* pristupilo se njihovoj unutarvrsnoj analizi. Obje grupe pokazale su dodatno raščlanjivanje osnovnih haplotipova, čije je sravnjenje prikazano na slici 9. U svrhu bolje vizualizacije haplotipova, konstruirane su haplotipske mreže (slika 10.). Dominantan haplotip među jedinkama vrste *C. gigas* podržava čak 94% uzoraka, dok dva podhaplotipa koji se iz njega izvode zahvaćaju tek dva uzorka (6% ukupno analiziranih odsječaka). Kod vrste *O. edulis* uočena je veća divergencija te se iz osnovnog, ancestralnog haplotipa, koji zahvaća 64% uzoraka, izvode dodatna četiri haplotipa. Budući da je vrsta *O. stentina* u analizi zastupljena samo jednom jedinkom, njezin odsječak 16S rDNA ujedno predstavlja i jedini utvrđeni haplotip.

Na temelju haplotipskih analiza zaključeno je da, unatoč postojanju različitih haplotipova promatranog odsječka 16S rDNA, ne postoji izravna korelacija između pojedinih haplotipova i zemljopisne distribucije pripadajućih jedinki vrsta *C. gigas, O. edulis* i *O. stentina* (slika 7.).

a)

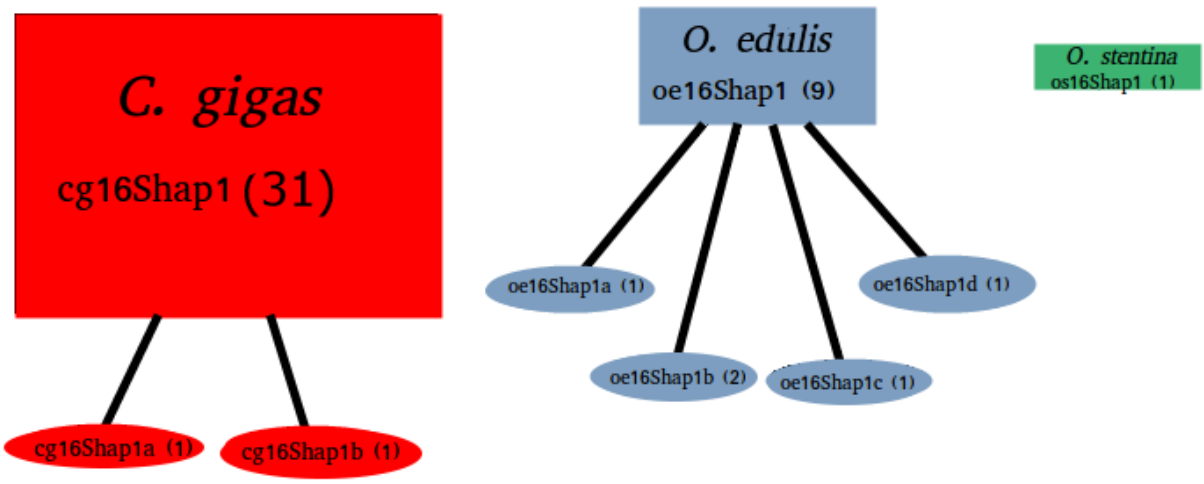
```
                10        20        30        40        50        60        70        80
           ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
cg16Shap1  CACTAGAAGATAAAGACTTTTAGCAATACCTGCCCAGTGCGAAATATTACTGTAAACGGCCGCCCTAGCGTGAGGGTGCT 80
cg16Shap1a ................................................................................ 80
cg16Shap1b ........................G....................................................... 80

                90       100       110       120       130       140       150       160
           ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
cg16Shap1  AAGGTAGCGAAATTCCTTGCCTTTTGATTGTGGGCCTGCATGAATGGTTTAACGAGGGTTTGACTGTCTCTAAATTTTTT 160
cg16Shap1a .............................................................................C 160
cg16Shap1b ................................................................................ 160

                170       180       190       200       210       220       230       240
           ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
cg16Shap1  ATTGAAATTGTACTGAAGGTGAAGATACCTTCATTTAAAAGTTAGACAAAAAGACCCCGTGCAACTTTGAAAATTAACTT 240
cg16Shap1a ................................................................................ 240
cg16Shap1b ................................................................................ 240

                250       260       270       280       290       300       310       320
           ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
cg16Shap1  TATTCAGGAGTAAAAGATTTTTAGGTGGGGCGCCTAGAAAGCAAGTCTAACCTTTCTGAATAACTAACTCTTTCCGGATT 320
cg16Shap1a ................................................................................ 320
cg16Shap1b ................................................................................ 320

                330       340       350       360       370       380       390       400
           ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
cg16Shap1  TGACCCGATTATATTCGATCATAGGAGAAGTTACGCCGGGGATAACAGGCTAATCCTTTAGTAGAGTTCGTATTGGCTAA 400
cg16Shap1a ................................................................................ 400
cg16Shap1b ................................................................................ 400

                410       420       430       440       450       460       470       480
           ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
cg16Shap1  AGGGATTGGCACCTCGATGTTGAATCAGGGATAATAGCTTCAAGGCGTAGAGGCTTTGAAAGTAGGTCTGTTCGACCTTT 480
cg16Shap1a ................................................................................ 480
cg16Shap1b ................................................................................ 480


           ....|...
cg16Shap1  AATACCCT 488
cg16Shap1a ........ 488
cg16Shap1b ........ 488
```

b)

```
                10        20        30        40        50        60        70        80
           ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
oe16Shap1  CACTGGAAGATTAATGACTTTCAGCAATGCCTGCCCAGTGCGATCAAAAGTCGTAAACGGCCGCCCTAGCGTGAGGGTGC 80
oe16Shap1a ................................................................................ 80
oe16Shap1b ................................................................................ 80
oe16Shap1c ................................................................................ 80
oe16Shap1d ................T............................................................... 80

                90       100       110       120       130       140       150       160
           ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
oe16Shap1  TAAGGTAGCGAAATTCCTTGCCTTTTAATTGTAGGCCTGCATGAATGGTTTGACGAGGGCTTAACTGTCTCTAGTTTGTA 160
oe16Shap1a ................................................................................ 160
oe16Shap1b ................................................................................ 160
oe16Shap1c ..........................................C..................................... 160
oe16Shap1d ................................................................................ 160

                170       180       190       200       210       220       230       240
           ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
oe16Shap1  AGTCTAAATTGGATTAAAGGTGAAGATACCTTTATAAAAAAGTCAGACAAGAAGACCCCGTGCAACTTTTAAAGTCAACT 240
oe16Shap1a ................................................................................ 240
oe16Shap1b ................................................................................ 240
oe16Shap1c ................................................................................ 240
oe16Shap1d ................................................................................ 240

                250       260       270       280       290       300       310       320
           ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
oe16Shap1  TGTTTAGGAGTTTCAGATTTTTAGGTGGGGCGCCTATTAAGTAATATTAACCTTAGTGTACGATAAAACTTTCAAGTATA 320
oe16Shap1a ............T................................................................ 320
oe16Shap1b ...........................................................T.................... 320
oe16Shap1c ................................................................................ 320
oe16Shap1d ................................................................................ 320


                330       340       350       360       370       380       390       400
           ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
oe16Shap1  GACCCGACAATGTCGATCATAGGAGAAGTTACGCCGGGGATAACAGGCTAATCCACTAGTAGAGAACGTATTGGCTAGTG 400
oe16Shap1a ................................................................................ 400
oe16Shap1b ................................................................................ 400
oe16Shap1c ................................................................................ 400
oe16Shap1d ................................................................................ 400
```

```
                410       420       430       440       450       460       470       480
          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
oe16Shap1 GGATTGGCACCTCGATGTTGAATCAGGGATGATACCTCTAAGGCGTAGAAGCTTTGGAAGTGGGTCTGTTCGACCTTTAA 480
oe16Shap1a ................................................................................ 480
oe16Shap1b ................................................................................ 480
oe16Shap1c ................................................................................ 480
oe16Shap1d ................................................................................ 480

          ....|.
oe16Shap1 TACCCT 486
oe16Shap1a ...... 486
oe16Shap1b ...... 486
oe16Shap1c ...... 486
oe16Shap1d ...... 486
```

Slika 9. a) Poravnanje 16S rDNA konsenzusnih nukleotidnih sljedova za tri haplotipa vrste *C. gigas.* **b)** Poravnanje 16S rDNA konsenzusnih nukleotidnih sljedova za pet haplotipova vrste *O. edulis.*



Slika 10. Haplotipska mreža odsječaka 16S rDNA analiziranih kamenica. Pravokutnikom je označen ancestralni haplotip, a izvedeni haplotipovi predstavljeni su ovalima. Broj jedinki koje podržavaju određeni haplotip naveden je u zagradi. Mreža je dobivena odabirom praga povezivanja (eng. connection limit) od 98%.

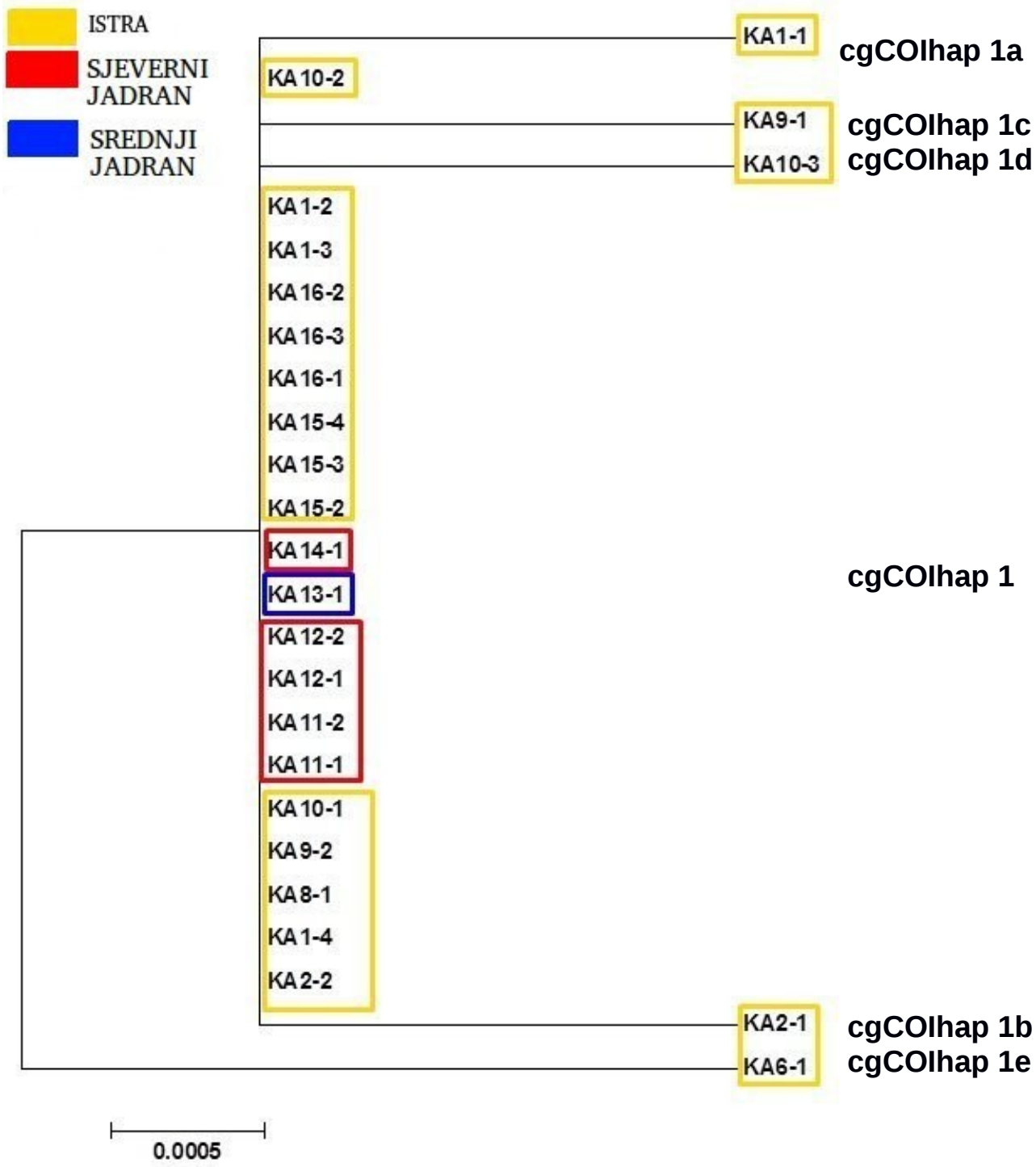
3.1.2. Analiza haplotipova COI

Od 59 analiziranih jadranskih uzoraka, 38 uzoraka podvrgnuto je analizi biljega COI. Upotrebom specifičnih početnica PCR za odsječak COI uspješno je umnožen kod 25 uzoraka, dok je umnažanje upotrebom početnica COI bilo neuspješno kod 13 uzoraka. 25 uspješno umnoženih odsječaka COI sekvencirano je te BLAST analizom uspoređeno s podatcima u bazama NCBI/GenBank i BOLD Systems. Na temelju pretrage utvrđeno je da svih 25 jedinki pripada vrsti *C. gigas*. Za 13 uzoraka kod kojih je umnažanje odsječka COI bilo neuspješno, daljnjom analizom biljega 16S rDNA utvrđeno je da 12 jedinki pripada vrsti *O. edulis*, dok jedna jedinka pripada vrsti *O. stentina* (tablica 7.). Podbačaj PCR reakcije upotrebom univerzalnih početnica za biljeg COI u vrstama *O. edulis* i *O. stentina* upućuje na promijenjena vezna mjesta za početnice unutar gena za COI kod ovih vrsta.

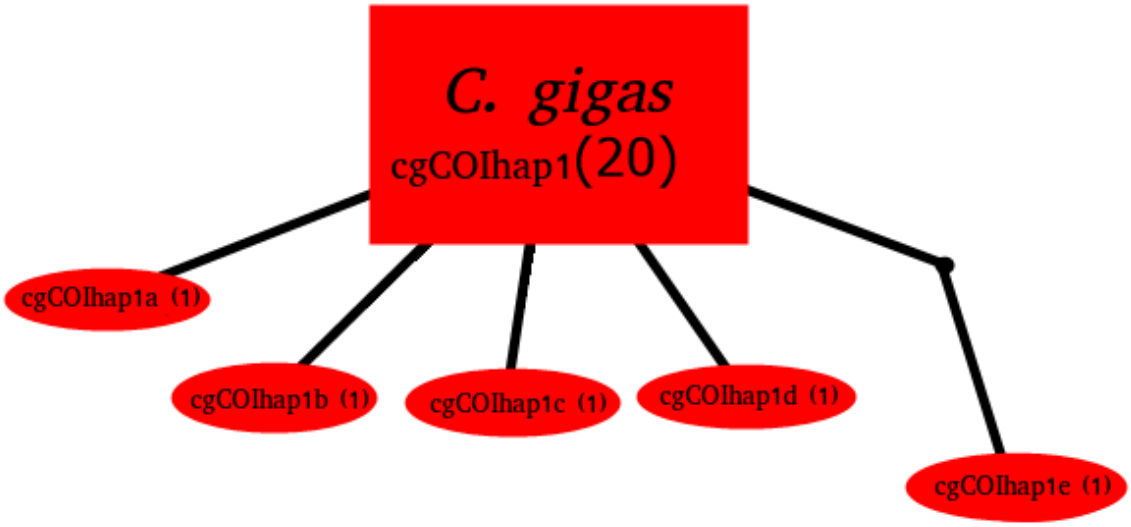
Sravnjenje 25 sekvenciranih odsječaka COI prikazano je na slici u prilogu 2 (slika P2). Prosječna vrijednost udvojenih udaljenosti između parova nukleotidnih sljedova COI iznosi 0.001, a kreće se u rasponu 0.000-0.005.

Na temelju sravnjenja nukleotidnih sljedova konstruirana su filogenetska stabla bazirana na metodama ML, NJ i MP. Sva tri stabla pokazala su istu topologiju, ali je zbog jednostavnosti prikaza u sliku 11. uvršteno samo stablo ML, konstruirano prema Hasegawa-Kishino-Yano modelu. Topologija filogenetskog stabla upućivala je na postojanje više različitih haplotipova unutar 25 analiziranih odsječaka. Na prikazu stabla ML istaknuto je odjeljivanje haplotipova u šest različitih grupa.

Divergentnost je dodatno vizualizirana prikazom haplotipske mreže. Dominantan haplotip, koji je time proglašen i ancestralnim, čini 80% svih uzoraka. Ostalih pet haplotipova, koji se iz njega izvode, ukupno čine preostalih 20%, a svaki je zastupljen samo jednim uzorkom. Haplotipska mreža ukazuje na veću udaljenost uzorka KA6-1, koji pripada haplotipu 1e. Ovakva konstrukcija mreže posljedica je prisutnosti dviju tranzicijskih promjena kod haplotipa hap1e spram ancestralnog haplotipa dok je u ostalih haplotipova prisutna samo jedna tranzicija (slika 12.). Usporedba konsenzus sekvenci COI haplotipova prikazana je na slici 13.

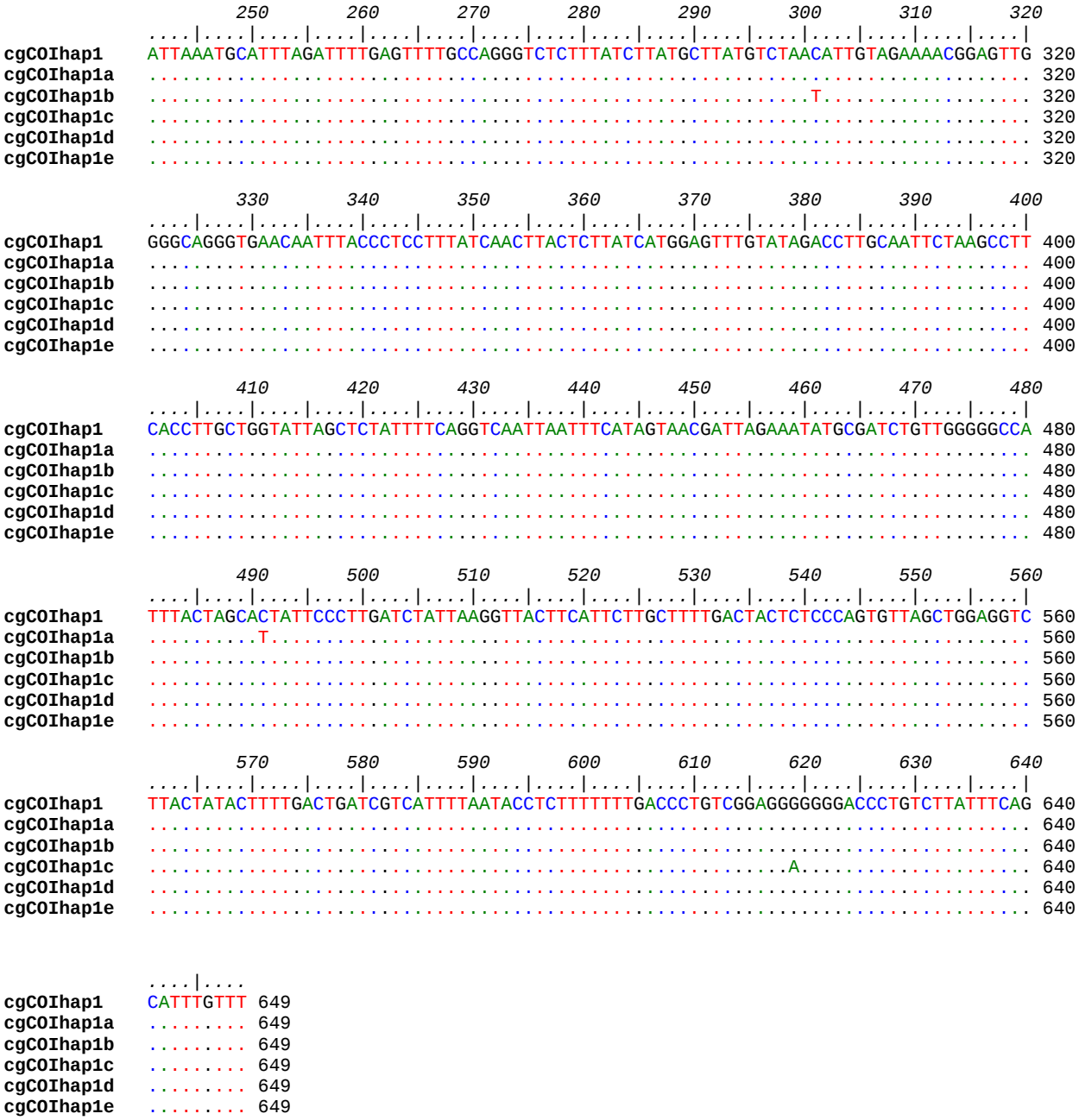


Slika 11. Filogenetski odnosi odsječaka COI među jedinkama vrste *C. gigas* dobiveni metodom Maximum Likelihood prema Hasegawa-Kishino-Yano modelu. Brojevi u čvorištu grana predstavljaju postotak stabala koja su podržala prikazanu topologiju u nasumičnoj statističkoj analizi u 1000 navrata (prikazane su samo podrške *bootstrap* koje prelaze 50%). Duljina grana predstavlja broj nukleotidnih promjena po nukleotidnom mjestu.



Slika 12. Haplotipska mreža odsječaka COI analiziranih kamenica. Pravokutnikom je označen ancestralni haplotip, a izvedeni haplotipovi predstavljeni su ovalima. Broj jedinki koje podržavaju određeni haplotip naveden je u zagradi. Mreža je dobivena odabirom praga povezivanja (eng. *connection limit*) od 98%.

```
                10        20        30        40        50        60        70        80
           ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
cgCOIhap1  AAGGTTTTATATAGTATTTGGATTTTGAGCTGTTCTTGCGGGAACTAGGTTTAGGTCTCTTATTCGTTGGAGACTTTATA 80
cgCOIhap1a ................................................................................ 80
cgCOIhap1b ................................................................................ 80
cgCOIhap1c ................................................................................ 80
cgCOIhap1d ................................................................................ 80
cgCOIhap1e ...............................................................G.............. 80

                90       100       110       120       130       140       150       160
           ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
cgCOIhap1  ACCCTGGAGCTAAGTTTTTAGACCCCGTGACTTATAATGCAGTTGTAACTAGGCATGCGTTGGTTATGATTTTTTTCTTT 160
cgCOIhap1a ................................................................................ 160
cgCOIhap1b ................................................................................ 160
cgCOIhap1c ................................................................................ 160
cgCOIhap1d ................................................................................ 160
cgCOIhap1e ................................................................................ 160

               170       180       190       200       210       220       230       240
           ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
cgCOIhap1  GTTATACCTGTAATAATTGGGGGGTTTGGTAACTGGCTTATCCCTTTGATGCTTCTAGTAGCAGACATGCAATTTCCTCG 240
cgCOIhap1a ................................................................................ 240
cgCOIhap1b ................................................................................ 240
cgCOIhap1c ................................................................................ 240
cgCOIhap1d ...........................................................A.................... 240
cgCOIhap1e .....G.......................................................................... 240
```



Slika 13. Nukleotidni sljedovi haplotipova COI u vrsti *C. gigas*.

Zamjetno je da je za vrstu *C. gigas* analiza odsječaka COI pokazala veću unutarvrsnu divergenciju i veći broj različitih haplotipova u odnosu na biljeg 16S rDNA, premda je ukupno analiziran manji broj jedinki (25 za biljeg COI, 33 za biljeg 16S rDNA). Također, pokazalo se da je ancestralni COI haplotip cgCOIhap1 proširen u području Istre, Sjevernog i Srednjeg Jadrana, dok su odvedeniji COI haplotipovi cgCOIhap1a, cgCOIhap1b, cgCOIhap1c, cgCOIhap1d i cgCOIhap1e prisutni isključivo na istarskim lokacijama (slika 11.).

3.2. Testiranje jadranskih primjeraka kamenica analizom biljega 5S rDNA, ITS1 i ITS2

Za razliku od mitohondrijskih biljega COI i 16S rDNA, molekularni biljezi 5S rDNA, ITS1 i ITS2 predstavljaju nuklearne biljege. Iako se u molekularnoj identifikaciji vrsta prvenstveno koriste mitohondrijski biljezi, nuklearni biljezi mogu dodatno poduprijeti identifikacijske studije, a njihova analiza neophodna je pri otkrivanju križanih jedinki. U sklopu diplomskog rada istražila sam je li moguće molekularno razlikovati kamenice isključivo na temelju elektroforetskog razdvajanja PCR-om umnoženih spomenutih nuklearnih biljega, bez dodatnog određivanja njihovih nukleotidnih sljedova metodom sekvenciranja.

3.2.1. Optimizacija uvjeta za PCR analizu biljega 5S rDNA, ITS1 i ITS2

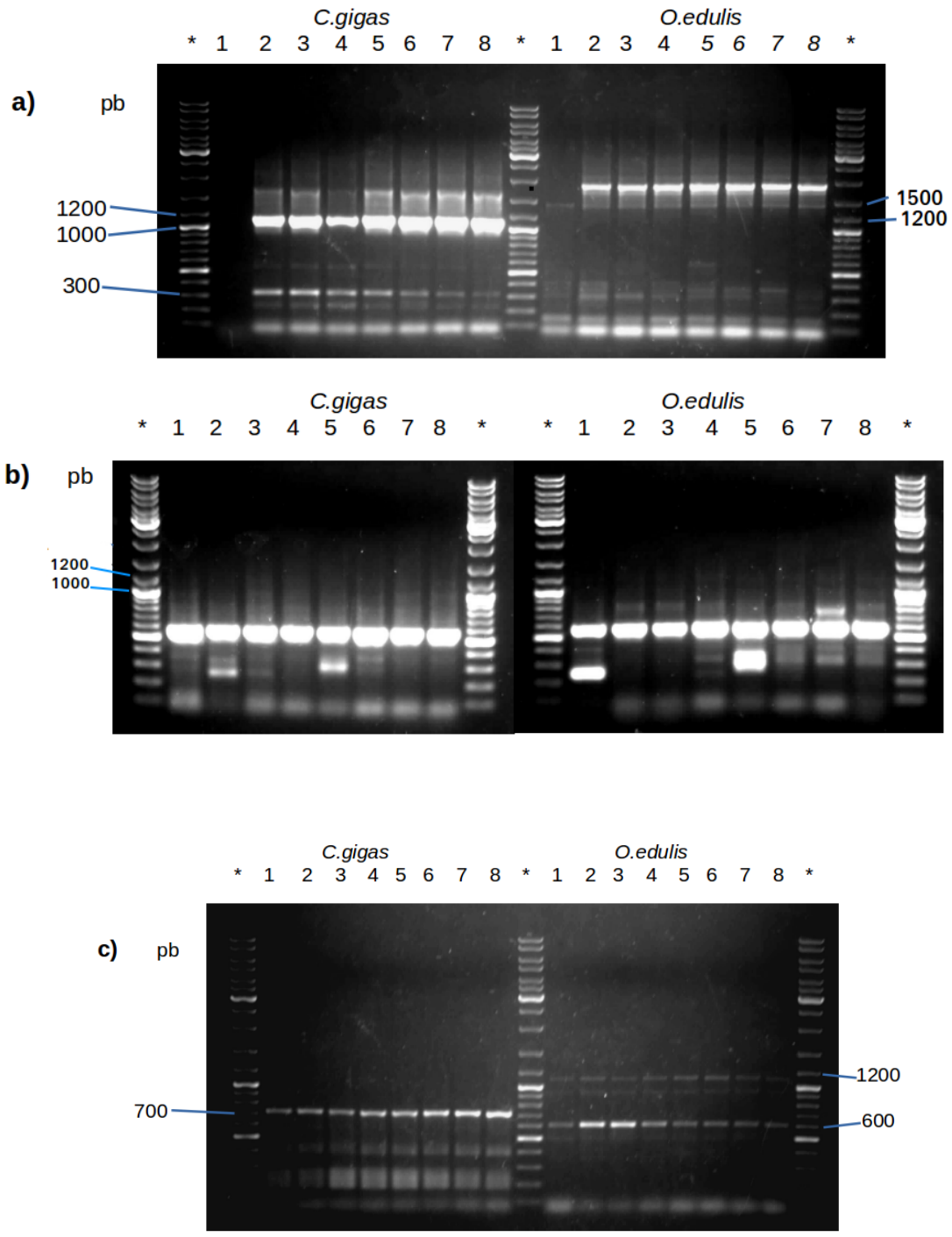
U svrhu optimizacije uvjeta za reakciju PCR analize biljega 5S rDNA, ITS1 i ITS2, bilo je potrebno odrediti optimalnu temperaturu lijepljenja početnica (eng. *annealing temperature,* T_a). Stoga su T_a uvjeti ispitani gradijentnom reakcijom PCR koristeći temperaturni raspon od 46-53˚C.

Slika 14. prikazuje elektroforetski razdvojene fragmente 5S rDNA, ITS1 i ITS2 umnožene u vrstama *C. gigas* i *O. edulis* upotrebom različitih temperatura T_a. Najveća razlika u duljini fragmenata između vrsta je vidljiva kod biljega 5S rDNA, nešto manja razlika je vidljiva kod biljega ITS2, dok je razlika kod biljega ITS1 gotovo neprimjetna. Duljine dobivenih fragmenata za vrstu *C. gigas* iznose ~1100 pb za biljeg 5S, ~550 pb za biljeg ITS1 i ~710 pb za biljeg ITS2, dok duljine za vrstu *O. edulis* iznose ~1900 pb za biljeg 5S, ~580 pb za biljeg ITS1 i ~610 pb za biljeg ITS2. Na temelju elektroforetskih profila, zaključeno je da odsječci 5S rDNA i ITS2 predstavljaju pogodnije biljege za određivanje vrsne pripadnost jer se već na temelju elektroforetskog razdvajanja umnoženih odsječaka može zaključiti kojoj vrsti jedinka pripada.

Nadalje, osim dominantno umnoženih odsječaka za svaki od biljega, na fotografijama gela uočljiva je prisutnost multiplih fragmenata poglavito kod ITS1 i ITS2 molekularnih biljega što je objašnjivo njihovim intergenskim smještajem i tandemskim ponavljanjem u genomu.

S obzirom na temperaturu sljepljivanja početnica najveći raspon prihvatljive temperature T_a uočen je za biljeg 5S rDNA, nešto manji za biljeg ITS1, dok je za biljeg ITS2 optimalna

temperatura ograničena na 47 °C (slika 14., tablica 8.). U tablici 8. navedene su odabrane temperature T_a korištene u daljnjim eksperimentima.



Slika 14. Elektroforetsko razdvajanje odsječaka DNA molekularnih biljega 5S rDNA (a), ITS1 (b) i ITS2 (c) umnoženih metodom PCR u vrstama *Crassostrea gigas* i *Ostrea edulis*. Temperature sljepljivanja početnica (T_a) iznose: 46 °C (**1**), 46,5 °C (**2**), 47,3 °C (**3**), 48,7 °C (**4**), 50,4 °C (**5**), 51,6 °C (**6**), 52,4 °C (**7**), 53 °C (**8**).

Tablica 8. Duljina umnoženih odsječaka i temperature sljepljivanja PCR početnica (T_a) za molekularne biljege 5S rDNA, ITS1 i ITS2 u vrstama *C. gigas* i *O. edulis*.

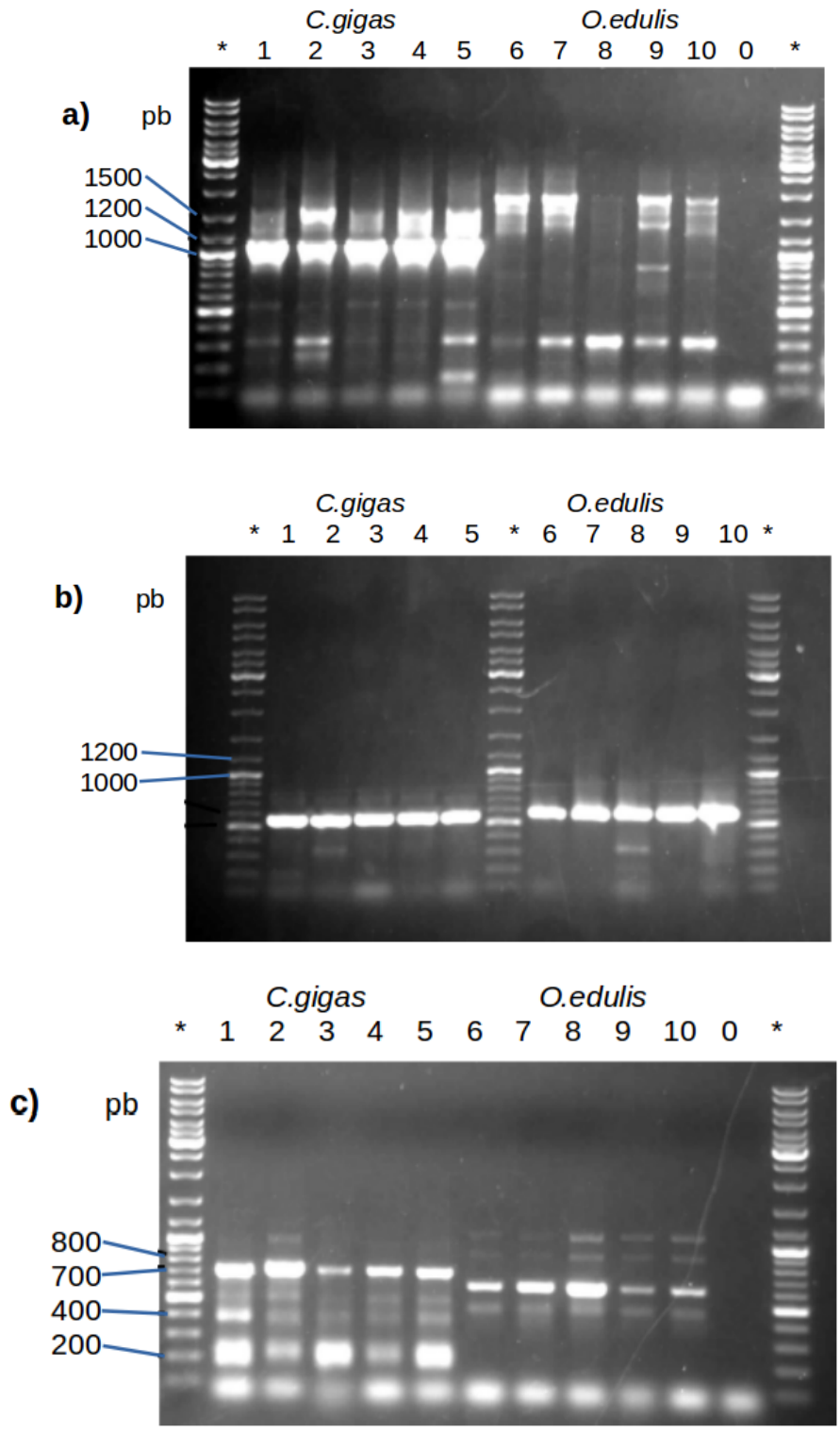
	5S rDNA	**ITS1**	**ITS2**
C. gigas	~1100 bp	~550 bp	~710 pb
O. edulis	~1900 bp	~580 bp	~610 pb
Prihvatljiva T_a	46-53°C	51-53°C	47°C
Korištena T_a	47°C	53°C	47°C

3.2.2. Identifikacija deset jadranskih primjeraka kamenica analizom biljega 5S rDNA, ITS1 i ITS2

Nakon što su određeni optimalni uvjeti za umnažanje biljega 5S rDNA, ITS1 i ITS2 u školjkašima *C. gigas* i *O. edulis*, testirana je njihova upotrebljivost za identifikaciju vrsta putem elektroforetskog razdvajanja PCR-om umnoženih produkata. Za testiranje je odabrano 10 jedinki, koje su prethodnom analizom mitohondrijskih biljega identificirane kao vrsta *C. gigas* (uzorci KA1-2, KA9-2, KA12-2, KA14-1 i KA16-1), odnosno vrsta *O. edulis* (uzorci KA1-6, KA13-2, KA15-1, KA17-2 i KA20-2).

Umnažanje nuklearnih biljega 5S rDNA, ITS1 i ITS2 rezultiralo je vrsno-specifičnom duljinom fragmenata te je bilo u suglasju s prethodnom determinacijom vrsta provedenom na temelju analize mitohondrijskih biljega (slika 15.). Jedini podbačaj reakcije zabilježen je kod uzorka KA15-1 prilikom umnažanja biljega 5S rDNA (slika 15.a), no budući da su upotrebom iste DNA umnažanja biljega ITS1 i ITS2 pokazala vrsnu specifičnost (slika 15.b i 15.c), zaključeno je da bi neuspjela reakcija u analizi 5S rDNA mogla biti posljedica eksperimentalne greške.

Na temelju testiranja deset jadranskih primjeraka kamenica analizom biljega 5S rDNA, ITS1 i ITS2, zaključeno je da bi se spomenuta tri nuklearna biljega mogla uspješno koristiti u razlikovnoj identifikaciji školjkaša *C. gigas* i *O. edulis*.



Slika 15. Elektroforetsko razdvajanje umnoženih fragmenata biljega 5S rDNA **(a)**, ITS1 **(b)** i ITS2 **(c)** u jedinkama: KA1-2 (**1**), KA9-1 (**2**), KA12-2 (**3**), KA14-1 (**4**), KA16-1 (**5**), KA6-1 (6), KA13-2 (**7**), KA15-1 (**8**), KA17-2 (**9**), KA20-2 (**10**). Oznaka * predstavlja molekularni marker, a linija 0 predstavlja negativnu kontrolnu reakciju (PCR reakciju bez kalupa DNA).

4. RASPRAVA

Školjkaš *O. edulis* autohtona je vrsta u Jadranskom moru, te spada u gospodarski vrlo važnu skupinu zbog izuzetno kvalitetnog i ukusnog mesa. U literaturi su dostupni podatci o životnom ciklusu ove vrste te uzgoju u hrvatskom dijelu Jadrana (Tomšić i Lovrić, 2004; Viličić, 2017). U ovom diplomskom radu analizirane su nukleotidne sekvence molekularnog biljega 16S rDNA 14 jedinki vrste *O. edulis* prikupljenih na 8 lokaliteta od obale Istre do južne obale Jadrana. Analizom je utvrđena prisutnost 5 različitih haplotipova, od kojih je najzastupljeniji, prisutan u 64.3% analiziranih jedinki, definiran kao ancestralni. Međutim, analizom 16S haplotipova nije uočena korelacija između pojedinih haplotipova i zemljopisne distribucije jedinki vrste *O. edulis* što je objašnjivo dugogodišnjom rasprostranjenošću ove vrste u hrvatskom dijelu Jadrana

Unutar 59 analiziranih primjeraka kamenica, utvrđen je i jedan primjerak patuljaste kamenice *Ostrea stentina*. Vrsta *O. stentina* je autohtona mediteranska vrsta (Lapègue i sur., 2006), također prisutna u Jadranu, no nešto rjeđe od kongenerične vrste *O. edulis* (Hrs-Brenko i Legac, 2006). S obzirom na veliku morfološku sličnost dviju spomenutih vrsta roda *Ostrea*, analiza molekularnih biljega pokazala se krucijalnom u otkrivanju identiteta ove jednike, koja je na temelju morfološke analize prvotno proglašena vrstom *O. edulis*.

Pacifička kamenica *C. gigas* se smatra invazivnom vrstom na globalnoj razini, međutim njezina rasprostranjenost na području Jadranskog mora donedavno nije bila potvrđena molekularnim metodama (Bubić i sur., 2016). U ovom radu analizom 16S rDNA biljega identificirane su 33 jedinke vrste *C. gigas*, čije intraspecijske udvojene udaljenosti iznose 0.000 te su prema nukleotidnom slijedu biljega identificirana samo tri haplotipa. Ancestralni haplotip prisutan je u 93.4% analiziranih jedinki. Povećani broj 16S haplotipova vrste *O. edulis* u odnosu na vrstu *C. gigas* objašnjiv je dugovremenskom prisutnošću vrste *O. edulis* na prostoru Jadrana, dok nukleotidna homogenost vrste *C. gigas* upućuje na njezino recentno širenje na područje sjevernog i centralnog dijela Jadrana. Ovakva homogenost u prvoj fazi širenja vrste na novo područje uočena je i kod drugih invazivnih vrsta, primjerice u invazivnog raka *Carcinus maenas* (Darling i sur., 2008) te invazivnog školjkaša *Mytilus galloprovincialis* (Maria i Lemos, 2003).

Biljeg COI analiziran je isključivo u jedinki vrste *C. gigas,* te je pokazao veću intraspecijsku udvojenu udaljenost od 16S rDNA biljega. Uočeno je 6 različitih haplotipova biljega COI, gdje je ancestralni haplotip prisutan u 80% analiziranih jedinki. Nadalje, uočena je povezanost između pojedinih haplotipova i zemljopisne distribucije jedinki *C. gigas.* Ancestrali haplotip pronađen je na području Istre te sjevernog i srednjeg Jadrana, dok su ostali haplotipovi prisutni isključivo u Istri. Prema većoj genetičkoj varijabilnosti na području Istre, može se zaključiti da su se prve samoodržive populacije *C. gigas* pojavile upravo u Istri te se vrsta nastavlja širiti prema jugu hrvatske obale Jadrana.

Akvakulturna proizvodnja je jedna od glavnih načina širenja stranih vrsta u nova staništa. Na taj način su se nove vrste počele javljati i na području Sredozemnog mora. Trenutno se 5% svih vrsta u Sredozemnom moru smatra invazivnim ili stranim (Zenetos i sur., 2012). Vrsta *C. gigas* je unesena u Europu 1960-tih godina u Dansku, Francusku, Njemčku te Italiju (Nehring, 2011) s područja Kanade i Japana. Vrlo brzo su se pojavile divlje, samoodržive populacije školjkaša *C. gigas* u sjeverozapadnoj Europi kao posljedica rasta temperature mora, odakle se ova vrsta proširila po gotovo cijeloj obali Europe (Troost, 2010). Školjkaš *C. gigas* se prvi puta javlja u hrvatskom dijelu Jadrana 1963. godine (Hrs-Brenko, 1982) na području Limskog kanala te se smatralo da se vrsta nije proširila na područje srednjeg i južnog Jadrana. Prema novijoj literaturi, potvrđeno je postojanje vrste *C. gigas* na području Istre te srednjeg Jadrana, ali vrsta nije pronađena na lokalitetu Mali Ston (Šegvić-Bubić i sur., 2016). Ovakvi rezultati u suglasju su s rezultatima ovog diplomskog rada, koji kao najjužniju točku prodora invazivne vrste *C. gigas* bilježi područje grada Splita.

Poznato je da je vrsta *C. gigas* uvedena u područja uz talijansku obalu Jadrana kako bi se njezinim uzgojem zamijenile izlovljene populacije školjkaša *O. edulis.* Nakon pojave divljih populacija uz talijansku obalu, školjkaš se proširio prema sjeveroistoku uz slovensku obalu (Lipej i sur., 2012). Osim akvakulturne proizvodnje, najutjecajnijim vektorom širenja invazivnih vrsta morskih mekušaca smatraju se morske struje i vjetrovi (Zenetos i sur., 2012). Topla morska struja prolazi kroz Otrantska vrata iz Mediteranskog mora u Jadran, te se kreće u smjeru sjevera uz istočnu obalu Jadrana te u južnom smjeru duž zapadne obale. Osim kretanja tople morske struje u smjeru obrnutom od kazaljke na satu, vjetrovi značajno utječu na kretanje vode na lokalnoj razini (Pandžić i Likso, 2005). Autori Šegvić-

Bubić i suradnici pretpostavljaju da je na širenje vrste *C. gigas* na slovensku i hrvatsku obalu utjecao sjevernoistočni vjetar bura. Međutim bura je karakteristična za hladniji period godine, kada niti germinacija (idealno pri 12 ºC) niti razmnožavanje (u temperaturnom rasponu od 18-20 ºC) (Nehring, 2011) vrste *C. gigas* nije moguće, budući da je zimi temperatura vode na sjevernom Jadranu u prosjeku 10 ºC (Russo i Artegiani, 1996). Vrsta *C. gigas* može prijeći velike udaljenosti isključivo u ličinačkom stadiju. Najveća brojnost ličinki ove vrste u sjevernom Jadranu uočena je u kolovozu te rujnu (Hrs-Brenko, 1982). U tom periodu, od vjetrova koji pušu u smjeru sjevera prema jugu, dominantan je sjeverozapadni vjetar maestral (Russo i Artegiani, 1996). Nadalje, u Jadranu postoji longitudinalni temperaturni gradijent te je tijekom godine na sjevernom Jadranu temperatura vode u prosjeku 2 ºC niža nego temperatura vode na južnom Jadranu (Russo i Artegiani, 1996). Također je poznato da jedinke *C. gigas* pri nižim temperaturama proizvode veći broj manjih jajašaca, što značajno produljuje ličinački razvoj i vrijeme koje ličinke provode u pelagičkom dijelu životnog ciklusa (Miossec i sur., 2009). Produljenjem ličinačkog stadija znatno se povećava udaljenost koju ličinke mogu prijeći. Osim morskih struja, temperature i meteoroloških uvjeta, na širenje školjkaša može utjecati i salinitet. Vrsta *C. gigas* je eurihalina vrsta te prema tome, iako u Jadranu postoji longitudinalni gradijent saliniteta, školjkaš *C. gigas* ima potencijal daljnjeg širenja prema južnom Jadranu (Miossec i sur., 2009). Osim prirodnog širenja uz hrvatsku obalu, vjerojatno je da se vrsta *C. gigas* širi i ljudskim vektorima putem balastnih voda brodova ili se namjerno prenosi u svrhu uzgoja (Šegvić-Bubić i sur., 2016).

Ekološki utjecaj pojavljivanja ove vrste u hrvatskom dijelu Jadrana za sada je nepoznat. Međutim, postoje mnogi primjeri gdje je invazivna vrsta *C. gigas* značajno utjecala na brojnost autohtonih vrsta kompeticijom za prostor i hranu. U Njemačkoj na obalama mora Wadden proširila se vrsta *C. gigas* te kompeticijom smanjila brojnost autohtonih vrsta *Cerastoderma edule* i *Mytilus edulis* (Nehls i sur., 2006). Osim kompeticije s autohtonim vrstama koje sa školjkašem *C. gigas* dijele ekološku nišu, vrsta *C. gigas* može neposredno utjecati na vrste koje se hrane autohtonim školjkašima. Tako je na obalama mora Wadden reduciran izvor hrane za ptice koje se hrane vrstom *C. edule* (Smaal i sur., 2005). Nadalje, vrsta *Crassostrea angulata* se uzgajala na obalama Francuske. Međutim uvođenjem vrste *C. gigas* uveden je i iridovirus koji je gotovo izbrisao sve populacije vrste *C. angulata*. Prema literaturnim podatcima, invazivna vrsta *C. gigas* u Jadranu bi najveći utjecaj mogla

imati na autohtonu vrstu *O. edulis* ukoliko dođe do kompeticije među ovim vrstama (Šegvić-Bubić i sur., 2016).

Razlikovanje jedinki vrsta *O. edulis* i *C. gigas* isključivo morfološkom analizom može biti nepouzdano. Determinacija putem analize mitohondrijskih biljega PCR metodom te sukcesivnim određivanjem nukleotidnog slijeda PCR produkata metodom sekvenciranja znatno je preciznija i pouzdanija metoda, no može iziskivati prilična financijska sredstva ukoliko se radi o analizi velikog broja uzoraka. U ovom radu pokazano je da PCR umnažanje nuklearnih biljega ITS1, ITS2 i 5S te elektroforetsko razdvajanje omogućuje pouzdano razlikovanje vrsta *O. edulis* i *C. gigas.* Obje vrste za tri spomenuta nuklearna biljega pokazuju karakteristične, vrsno-specifične elektroforetske profile pri razdvajanju u agaroznom gelu te sukcesivna analiza nukleotidnih sljedova spomenutih biljega sekvenciranjem nije nužna. Izostanak troškova sekvenciranja uvelike pridonosi ekonomičnosti ovog tipa molekularne analize te bi ovaj pristup u razlikovnoj determinaciji vrsta *O. edulis* i *C. gigas* putem testiranja nuklearnih biljega ITS1, ITS2 i 5S mogao biti upotrjebljen pri analizi velikog broja uzoraka.

5. ZAKLJUČAK

Istraživanje molekularnih biljega 16S rDNA, COI, ITS1, ITS2 te 5S rDNA u 59 jedinki kamenica prikupljenih na 17 različitih lokaliteta duž hrvatske jadranske obale rezultiralo je sljedećim zaključcima:

1. Uz potvrdu prisutnosti školjkaša *C. gigas* duž istarske obale, potvrđena je njegova prisutnost i u području središnjeg Jadrana.

2. Analizom mitohondrijskog biljega 16S rDNA u vrsti *C. gigas* identificirana su samo 3 haplotipa, a genetska homogenost biljega 16S rDNA sugerira da je vrsta *C. gigas* relativno recentno unesena u hrvatske vode.

Analizom mitohondrijskog biljega COI u jedinkama vrste *C. gigas* identificirano je 6 različitih haplotipova, od kojih je dominantan haplotip proširen od istarskih lokaliteta do središnjeg Jadrana. Suprotno tome, manje zastupljeni, a time i potencijalno novonastali, haplotipovi zabilježeni su samo duž obale Istre što ukazuje da je vrsta *C. gigas* u hrvatske vode prvotno ušla upravo kroz istarske lokalitete.

3. Analizom mitohondrijskog biljega 16S rDNA u vrsti *O. edulis* identificirano je 5 haplotipova, ali nije uočena korelacija između pojedinih haplotipova i njihove zemljopisne distribucije što upućuje na dugovremensku prisutnost vrste *O. edulis* u Jadranu.

4. Umnažanjem nuklearnih fragmenata ITS1, ITS2 i 5S rDNA metodom PCR, a potom elektroforetskim razdvajanjem produkata PCR potvrđena je mogućnost razlikovanja vrsta *O. edulis* i *C. gigas* na temelju elektroforetskih profila spomenutih nuklearnih biljega.

6. LITERATURA

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990) ‘Basic local alignment search tool.’, *Journal of Molecular Biology* 215, 403–10.

Boudry, P., Heurtebise, S., Lapègue, S. (2003) ‘Mitochondrial and nuclear DNA sequence variation of presumed Crassostrea gigas and Crassostrea angulata specimens: a new oyster species in Hong Kong?’, *Aquaculture* 228, 15- 25.

Canapa, A. (1996) ‘Phylogenetic Analysis of Veneridae (Bivalvia): Comparison of Molecular and Palaeontological Data’, *Journal of Molecular Evolution* 43, 517–522.

Clement, M., Posada, D., Crandall, K. A. (2000) ‘TCS: A computer program to estimate gene genealogies’, *Molecular Ecology* 9, 1657–1659.

Darling, J. A., Bagley, M. J., Roman, J., Tepolt, C. K., Geller, J. B. (2008) ‘Genetic patterns across multiple introductions of the globally invasive crab genus *Carcinus*’, *Molecular Ecology* 17, 4992–5007.

FAO (2017) ‘*Ostrea edulis*’, Fisheries and Aquaculture Department.

http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Ostrea_edulis/en#tcNA0172

FAO (2017) ‘*Crassostrea gigas*’, Fisheries and Aquaculture Department.

http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/en

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.

Giribet, G., Wheeler, W. (2002) ‘On bivalve phylogeny: a high-level analysis on the Bivalvia (Mollusca) based on combined morphology and DNA sequence data’ , *Invertebrate Biology* 121, 271-314.

Hall, T. A. (1999) ‘BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT’, *Nucleic Acids Symposium Serie* 41, 95–98.

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., DeWaard, J. R. (2003) ‘Biological identifications through DNA barcodes’, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270, 313–321.

Horváth, Á., Kuzman, A., Bubalo, A., Bartulović, V., Patakiné Várkonyi, E., Urbányi, B., Glamuzina, B. (2013) ‘Karyological study reveals a putatively distinctive population of the European flat oyster (*Ostrea edulis*) in Mali Ston Bay, Croatia’, *Acta Adriatica* 54, 111–115.

Hrs-Brenko, M. (1982) ‘*Ostrea edulis* (linnaeus) and C*rassostrea gigas* (thunberg) larvae in the plankton of limski kanal in the northern adriatic sea’, *Acta Adriatica* 23, 399–407.

Hrs-Brenko, M., Legac, M. (2006) ‘Inter-and intra-species relationships of sessile bivalves on the eastern coast of the Adriatic Sea.’, *Natura Croatica* 15, 203–230.

Hurtado, N. S., Pérez-García, C., Morán, P., Pasantes, J. J. (2011) ‘Genetic and cytological evidence of hybridization between native *Ruditapes decussatus* and introduced *Ruditapes philippinarum* (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) in NW Spain’, *Aquaculture* 311, 123–128.

Jozefowicz, C. J. , Foighil, D. O. (1998) ‘Phylogenetic analysis of southern hemisphere flat oysters based on partial mitochondrial 16S rDNA gene sequences.’, *Molecular phylogenetics and evolution* 10, 426–435.

Lapègue, S., Ben Salah, I., Batista, F. M., Heurtebise, S., Neifar, L., Boudry , P. (2006) ‘Phylogeographic study of the dwarf oyster, *Ostreola stentina*, from Morocco, Portugal and Tunisia: Evidence of a geographic disjunction with the closely related taxa, *Ostrea aupouria* and *Ostreola equestris*’, *Marine Biology* 150, 103–110.

Lapègue, S., Beaumont, A. R., Boudry, P., Goulletquer, P. (2010) ‘European flat oyster - *Ostrea edulis*’, *Genimpact final scientific report,* 70–75.

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., Mcgettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., Higgis, D. G. (2007) ‘Clustal W and Clustal X version 2.0’, *Bioinformatics* 23, 2947–2948.

Lipej, L., Mavrič, B., Orlando-Bonaca, M., Malej, A. (2012) ‘State of the art of the marine non-indigenous flora and fauna in Slovenia’, *Mediterranean Marine Science* 13, 243–249.

Liu, J., Li, Q., Kong, L., Yu, H., Zheng, X. (2011) ‘Identifying the true oysters (*Bivalvia: Ostreidae*) with mitochondrial phylogeny and distance-based DNA barcoding’, *Molecular Ecology Resources* 11, 820–830.

Maria, P., Lemos, M. (2003) ‘Unexpected genetic structure of mussel populations in South Africa: indigenous *Perna perna* and invasive *Mytillus galoprovincialis*’ 337, 135-144.

Miossec, L., Le Deuff, R.-M.,Goulletquer, P. (2009) ‘Alien species alert: *Crassostrea gigas* (Pacific oyester)’, ICES Cooperative Research Report 299, 1-42

Nehls, G., Diederich, S., Thieltges, D. W., Strasser, M. (2006) ‘Wadden Sea mussel beds invaded by oysters and slipper limpets: Competition or climate control?’, *Helgoland Marine Research* 60, 135–143.

Nehring, S. (2011) ‘NOBANIS – Invasive Alien Species Fact Sheet – *Crassostrea gigas*’, *Online Database of the European Network on Invasive Alien Species - NOBANIS www.nobanis.org*, 1–18.

Palumbi, S., Martin, A., Romano, S., McMillan, W. O., Stice, L., Grabowski, G. (2002) ‘The simple fool's guide to PCR’, University of Hawaii, Honolulu, Hawaii.

Pandžić, K., Likso, T. (2005) ‘Eastern adriatic typical wind field patterns and large-scale atmospheric conditions’, *International Journal of Climatology* 25, 81–98.

Russo, A., Artegiani, A. (1996) ‘Adriatic sea hydrography’, *Scientia Marina* 60, 33–43.

Salvi, D., Macali, A. and Mariottini, P. (2014) ‘Molecular phylogenetics and systematics of the bivalve family *Ostreidae* based on rRNA sequence-structure models and multilocus species tree’, *PLoS ONE*, 9, e108696.

Sekino, M., Yamashita, H. (2013) ‘Mitochondrial DNA barcoding for Okinawan oysters: A cryptic population of the Portuguese oyster *Crassostrea angulata* in Japanese waters’, *Fisheries Science* 79, 61–76.

Smaal, A., Stralen, M., Craeymeersch, J. (2005) ‘Does the Introduction of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* Lead to Species Shifts in the Wadden Sea?’, *The Comparative Roles of Suspension-Feeders in Ecosystems* 47, 277–289.

Šegvić-Bubić, T., Grubišić, L., Zrnčić, S., Jozić, S., Žužul, I., Talijančić, I., Oraić, D., Relić, M., Katavić, I. (2016) ‘Range expansion of the non-native oyster’, *Acta Adriatica* 57, 321–330.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013) ‘MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0’, *Molecular Biology and Evolution* 30, 2725–2729.

Tomšić, S., Lovrić, J. (2004) ‘Povijesni pregled uzgoja kamenica u Malostonskom zaljevu’, *Naše more* 51, 17–23.

Troost, K. (2010) ‘Causes and effects of a highly successful marine invasion: Case-study of the introduced Pacific oyster *Crassostrea gigas* in continental NW European estuaries’, *Journal of Sea Research* 64, 145–165.

Viličić, D. (2017) ‘Zaštita uzgajališta kamenica od antropogenog utjecaja u Malostonskom zaljevu’, *Hrvatske vode* 25, 59–64.

Zenetos, A., Gofas, S., Morri, C., Rosso, A., Violanti, D., Garcia Raso, J. E., Cinar, M. E., Almogi-Labin, A., Ates, A. S., Azzuro, E., Ballesteros, E., Bianchi, C. N., Bilecenoglu, M., Gambi, M. C., Giangrande, A., Gravili, C., Hyiams-Kaphzan, O., Karachle, P. K., Katsanevakis, S., Lipej, L., Mastrototaro, F., Mineur, F., Pancucci-Papadopoulou, M. A., Ramos Espla, A., Salas, C., San Martin, G., Sfriso, A., Streftaris, N., Verlaque, M. (2012) ‘Alien species in the Mediterranean Sea by 2012. A contribution to the application of European Union’s Marine Strategy Framework Directive (MSFD). Part 2. Introduction trends and pathways’, *Mediterranean Marine Science* 13, 95–118.

Zhang, D., Hewitt, G. M. (1996) ‘Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers’, *Science* 11, 247-251.

7. PRILOZI

Prilog 1.

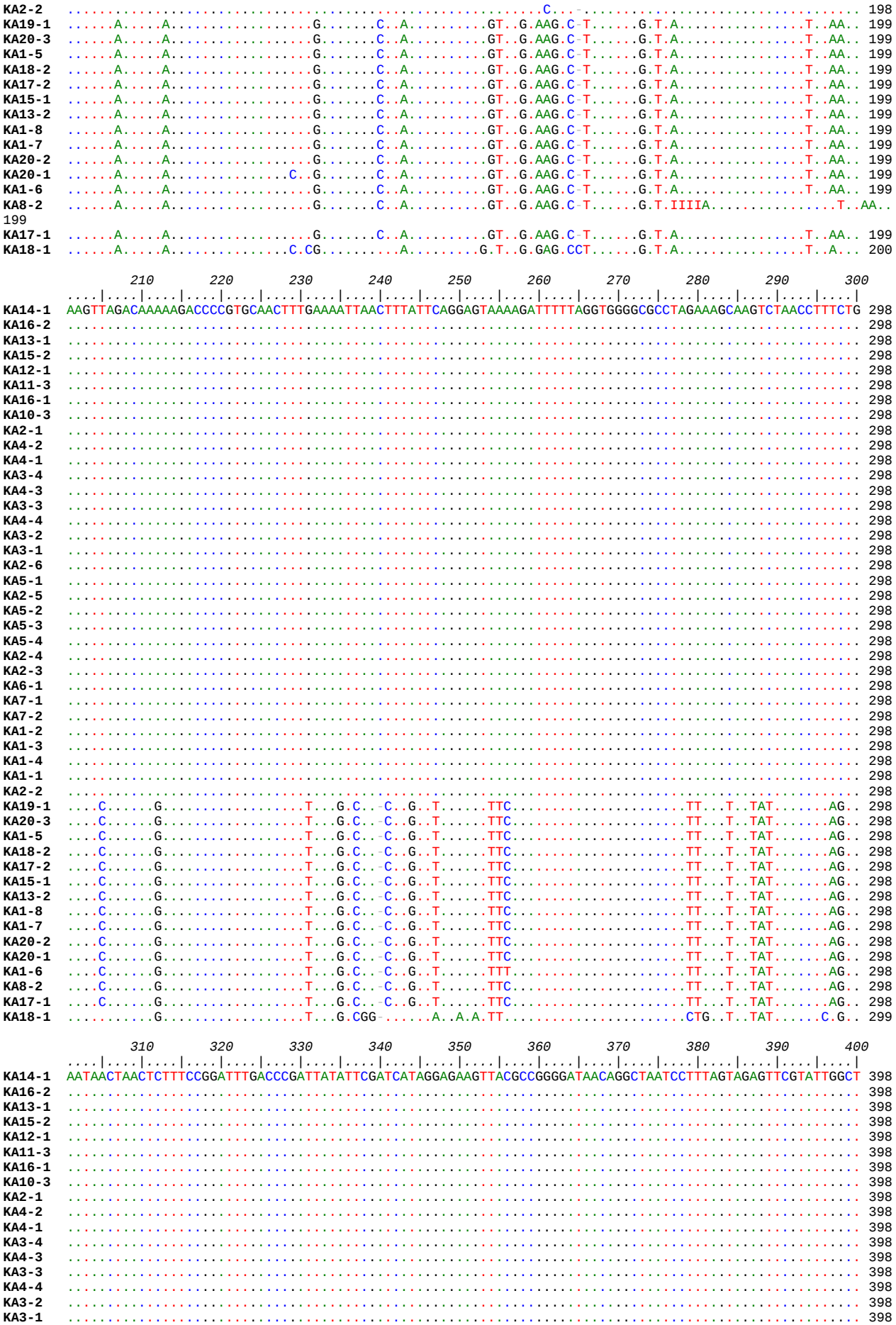
Slika P1. Poravnanje sekvenci fragmenata 16S rDNA analiziranih jedinki kamenica u ovom radu.

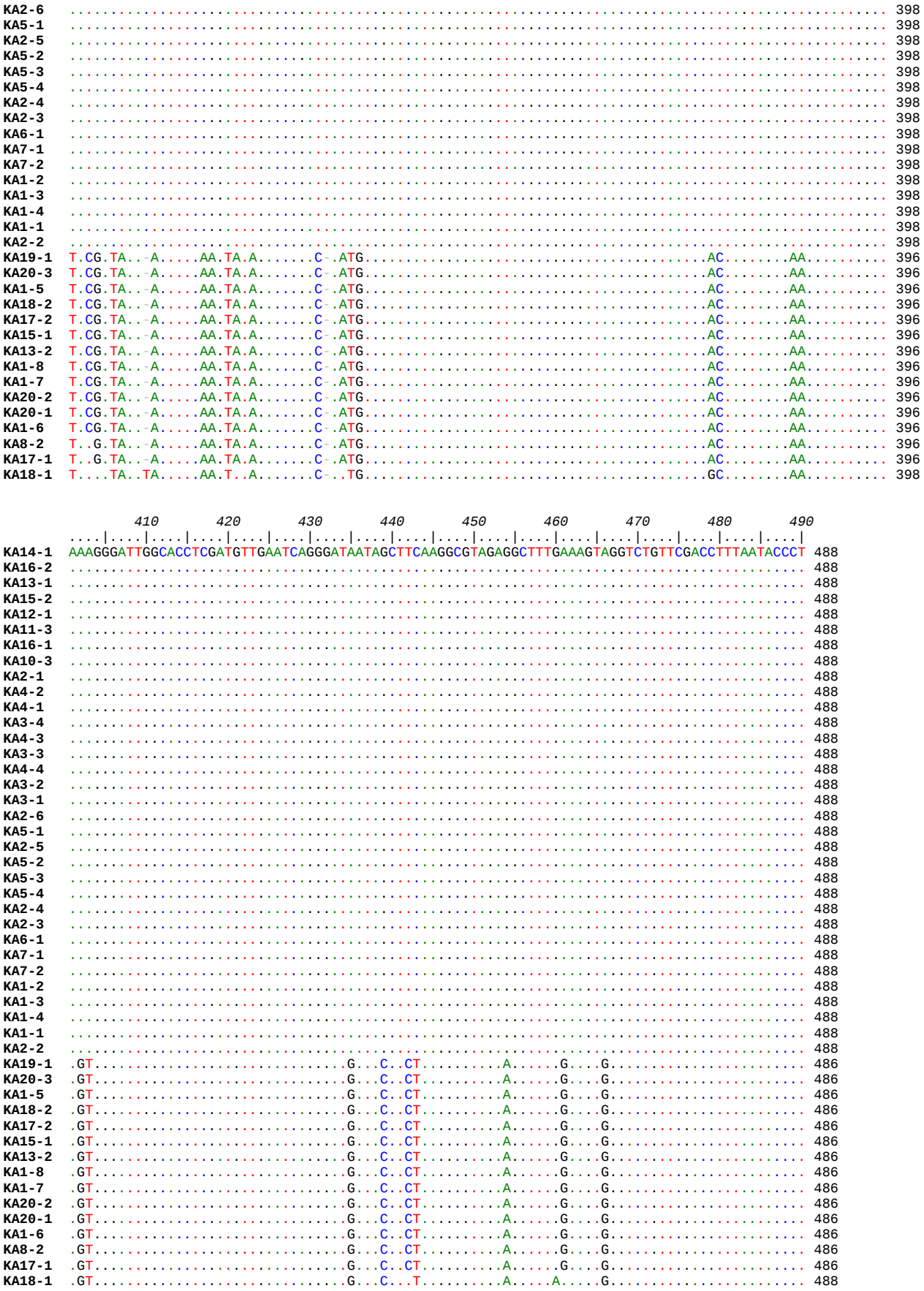
Prilog 2.

Slika P2. Poravnavanje sekvenci fragmenata COI analiziranih jedinki kamenica u ovom radu.

Prilog 1.

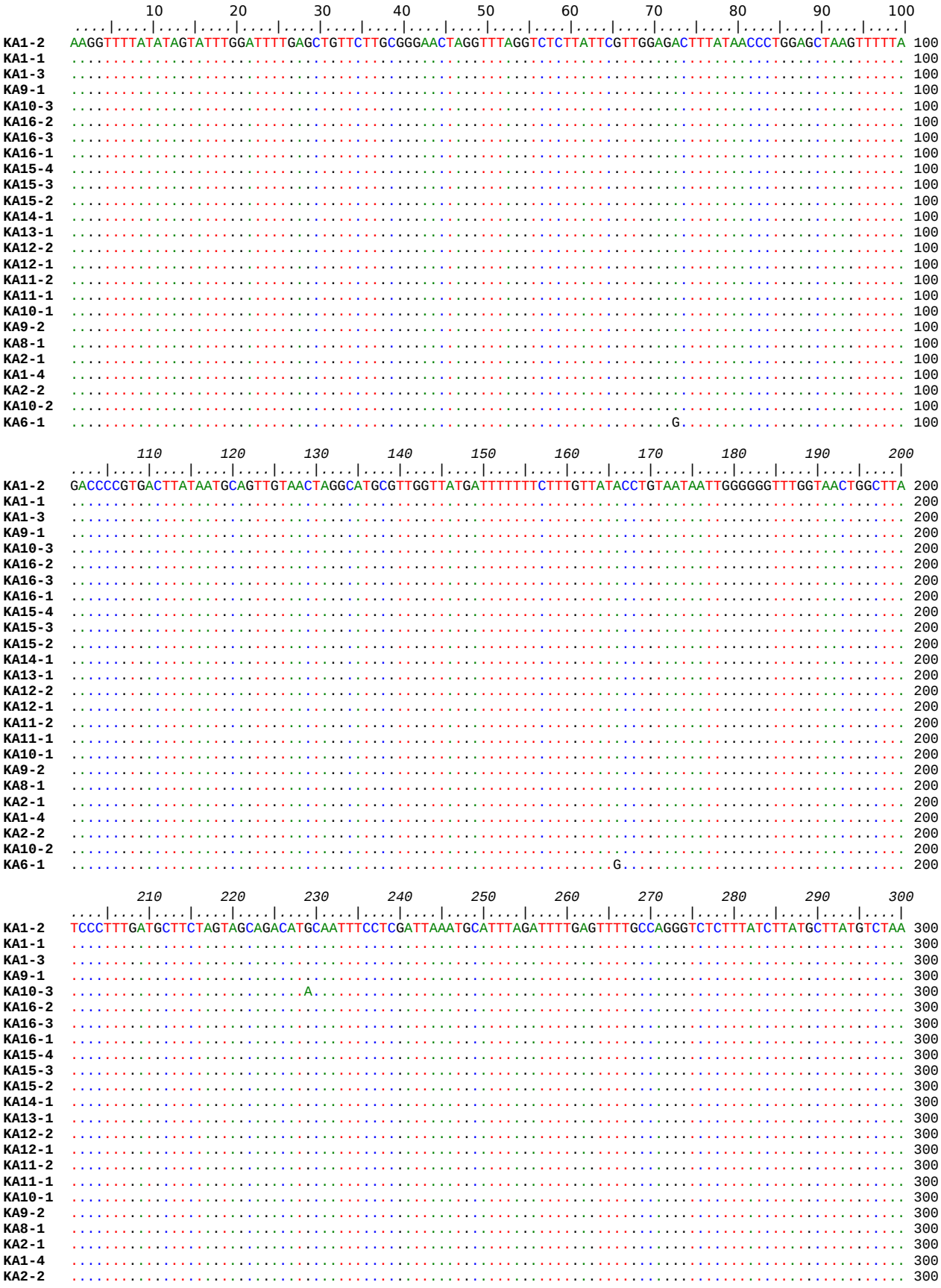
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
KA14-1 CACTAGAAGA-TAAAGACTTTTAGCAATACCTGCCCAGTGCGAAATATTACTGTAAACGGCCGCCCTAGCGTGAGGGTGCTAAGGTAGCGAAATTCCTTG 99
KA16-2 .....G..... 99
KA13-1 99
KA15-2 99
KA12-1 99
KA11-3 99
KA16-1 99
KA10-3 99
KA2-1 99
KA4-2 99
KA4-1 99
KA3-4 99
KA4-3 99
KA3-3 99
KA4-4 99
KA3-2 99
KA3-1 99
KA2-6 99
KA5-1 99
KA2-5 99
KA5-2 99
KA5-3 99
KA5-4 99
KA2-4 99
KA2-3 99
KA6-1 99
KA7-1 99
KA7-2 99
KA1-2 99
KA1-3 99
KA1-4 99
KA1-1 99
KA2-2 99
KA19-1 ....G.....T...T......C......G.............TCA.AAGTC..... 100
KA20-3 ....G.....T...T......C......G.............TCA.AAGTC..... 100
KA1-5 ....G.....T...T......C......G.............TCA.AAGTC..... 100
KA18-2 ....G.....T...T......C......G.............TCA.AAGTC..... 100
KA17-2 ....G.....T...T......C......G.............TCA.AAGTC..... 100
KA15-1 ....G.....T...T......C......G.............TCA.AAGTC..... 100
KA13-2 ....G.....T...T......C......G.............TCA.AAGTC..... 100
KA1-8 ....G.....T...T......C......G.............TCA.AAGTC..... 100
KA1-7 ....G.....T...T......C......G.............TCA.AAGTC..... 100
KA20-2 ....G.....T...T..T...C......G.............TCA.AAGTC..... 100
KA20-1 ....G.....T...T......C......G.............TCA.AAGTC..... 100
KA1-6 ....G.....T...T......C......G.............TCA.AAGTC..... 100
KA8-2 ....G.....T...T......C......G.............TCA.AAGTC..... 100
KA17-1 ....G.....T...T......C......G.............TCA.AAGTC..... 100
KA18-1 ....G.G...A.T.TA...C.C......G.............TTA.AAGTC..... 100
110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
KA14-1 CCTTTTGATTGTGGGCCTGCATGAATGGTTTAACGAGGGTTTGACTGTCTCTAAATTTTTTATT-GAAATTGTACTGAAGGTGAAGATACCTTCATTTAA 198
KA16-2 198
KA13-1 198
KA15-2 198
KA12-1 198
KA11-3 198
KA16-1 198
KA10-3 198
KA2-1 198
KA4-2 198
KA4-1 198
KA3-4 198
KA4-3 198
KA3-3 198
KA4-4 198
KA3-2 198
KA3-1 198
KA2-6 198
KA5-1 198
KA2-5 198
KA5-2 198
KA5-3 198
KA5-4 198
KA2-4 198
KA2-3 198
KA6-1 198
KA7-1 198
KA7-2 198
KA1-2 198
KA1-3 198
KA1-4 198
KA1-1 198

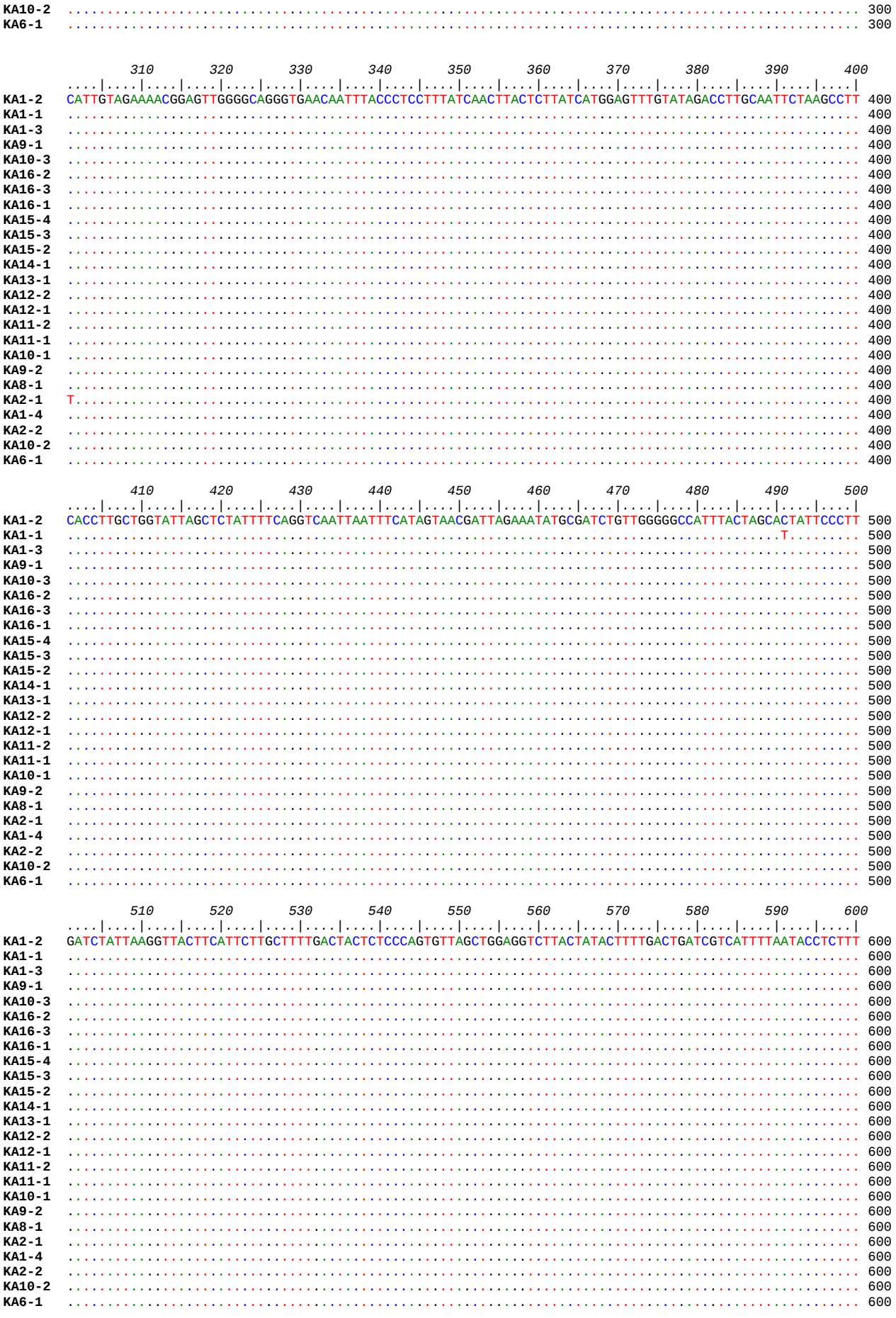


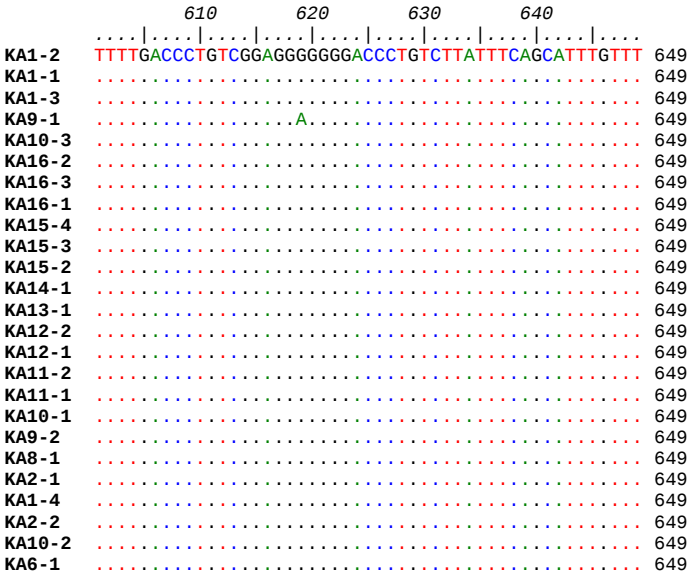

KA2-6 398
KA5-1 398
KA2-5 398
KA5-2 398
KA5-3 398
KA5-4 398
KA2-4 398
KA2-3 398
KA6-1 398
KA7-1 398
KA7-2 398
KA1-2 398
KA1-3 398
KA1-4 398
KA1-1 398
KA2-2 398
KA19-1 T.CG.TA..-A.....AA.TA.A.......C-.ATG.....AC.....AA..... 396
KA20-3 T.CG.TA..-A.....AA.TA.A.......C-.ATG.....AC.....AA..... 396
KA1-5 T.CG.TA..-A.....AA.TA.A.......C-.ATG.....AC.....AA..... 396
KA18-2 T.CG.TA..-A.....AA.TA.A.......C-.ATG.....AC.....AA..... 396
KA17-2 T.CG.TA..-A.....AA.TA.A.......C-.ATG.....AC.....AA..... 396
KA15-1 T.CG.TA..-A.....AA.TA.A.......C-.ATG.....AC.....AA..... 396
KA13-2 T.CG.TA..-A.....AA.TA.A.......C-.ATG.....AC.....AA..... 396
KA1-8 T.CG.TA..-A.....AA.TA.A.......C-.ATG.....AC.....AA..... 396
KA1-7 T.CG.TA..-A.....AA.TA.A.......C-.ATG.....AC.....AA..... 396
KA20-2 T.CG.TA..-A.....AA.TA.A.......C-.ATG.....AC.....AA..... 396
KA20-1 T.CG.TA..-A.....AA.TA.A.......C-.ATG.....AC.....AA..... 396
KA1-6 T.CG.TA..-A.....AA.TA.A.......C-.ATG.....AC.....AA..... 396
KA8-2 T..G.TA..-A.....AA.TA.A.......C-.ATG.....AC.....AA..... 396
KA17-1 T..G.TA..-A.....AA.TA.A.......C-.ATG.....AC.....AA..... 396
KA18-1 T....TA..TA.....AA.T..A.......C-..TG.....GC.....AA..... 398
410 420 430 440 450 460 470 480 490
KA14-1 AAAGGGATTGGCACCTCGATGTTGAATCAGGGATAATAGCTTCAAGGCGTAGAGGCTTTGAAAGTAGGTCTGTTCGACCTTTAATACCCT 488
KA16-2 488
KA13-1 488
KA15-2 488
KA12-1 488
KA11-3 488
KA16-1 488
KA10-3 488
KA2-1 488
KA4-2 488
KA4-1 488
KA3-4 488
KA4-3 488
KA3-3 488
KA4-4 488
KA3-2 488
KA3-1 488
KA2-6 488
KA5-1 488
KA2-5 488
KA5-2 488
KA5-3 488
KA5-4 488
KA2-4 488
KA2-3 488
KA6-1 488
KA7-1 488
KA7-2 488
KA1-2 488
KA1-3 488
KA1-4 488
KA1-1 488
KA2-2 488
KA19-1 .GT.....G...C..CT.....A.....G....G..... 486
KA20-3 .GT.....G...C..CT.....A.....G....G..... 486
KA1-5 .GT.....G...C..CT.....A.....G....G..... 486
KA18-2 .GT.....G...C..CT.....A.....G....G..... 486
KA17-2 .GT.....G...C..CT.....A.....G....G..... 486
KA15-1 .GT.....G...C..CT.....A.....G....G..... 486
KA13-2 .GT.....G...C..CT.....A.....G....G..... 486
KA1-8 .GT.....G...C..CT.....A.....G....G..... 486
KA1-7 .GT.....G...C..CT.....A.....G....G..... 486
KA20-2 .GT.....G...C..CT.....A.....G....G..... 486
KA20-1 .GT.....G...C..CT.....A.....G....G..... 486
KA1-6 .GT.....G...C..CT.....A.....G....G..... 486
KA8-2 .GT.....G...C..CT.....A.....G....G..... 486
KA17-1 .GT.....G...C..CT.....A.....G....G..... 486
KA18-1 .GT.....G...C...T.....A.....A.....G..... 488

Slika P1. Poravnanje sekvenci fragmenata 16S rDNA analiziranih jedinki kamenica u ovom radu.

Prilog 2.




KA10-2 300
KA6-1 300
310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
KA1-2 CATTGTAGAAAACGGAGTTGGGGCAGGGTGAACAATTTACCCTCCTTTATCAACTTACTCTTATCATGGAGTTTGTATAGACCTTGCAATTCTAAGCCTT 400
KA1-1 400
KA1-3 400
KA9-1 400
KA10-3 400
KA16-2 400
KA16-3 400
KA16-1 400
KA15-4 400
KA15-3 400
KA15-2 400
KA14-1 400
KA13-1 400
KA12-2 400
KA12-1 400
KA11-2 400
KA11-1 400
KA10-1 400
KA9-2 400
KA8-1 400
KA2-1 T 400
KA1-4 400
KA2-2 400
KA10-2 400
KA6-1 400
410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
KA1-2 CACCTTGCTGGTATTAGCTCTATTTTCAGGTCAATTAATTTCATAGTAACGATTAGAAATATGCGATCTGTTGGGGGCCATTTACTAGCACTATTCCCTT 500
KA1-1 T 500
KA1-3 500
KA9-1 500
KA10-3 500
KA16-2 500
KA16-3 500
KA16-1 500
KA15-4 500
KA15-3 500
KA15-2 500
KA14-1 500
KA13-1 500
KA12-2 500
KA12-1 500
KA11-2 500
KA11-1 500
KA10-1 500
KA9-2 500
KA8-1 500
KA2-1 500
KA1-4 500
KA2-2 500
KA10-2 500
KA6-1 500
510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
KA1-2 GATCTATTAAGGTTACTTCATTCTTGCTTTTGACTACTCTCCCAGTGTTAGCTGGAGGTCTTACTATACTTTTGACTGATCGTCATTTTAATACCTCTTT 600
KA1-1 600
KA1-3 600
KA9-1 600
KA10-3 600
KA16-2 600
KA16-3 600
KA16-1 600
KA15-4 600
KA15-3 600
KA15-2 600
KA14-1 600
KA13-1 600
KA12-2 600
KA12-1 600
KA11-2 600
KA11-1 600
KA10-1 600
KA9-2 600
KA8-1 600
KA2-1 600
KA1-4 600
KA2-2 600
KA10-2 600
KA6-1 600



Slika P2. Poravnanje sekvenci fragmenata COI analiziranih jedinki kamenica u ovom radu.

ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI

Ime: Tihana
Prezime: Vondrak
Datum rođenja: 29. 11. 1993.
Mjesto rođenja: Osijek, Hrvatska

KONTAKTNI PODATCI

Adresa: Orahovačka 35
3100 Osijek
Telefon: 099 2911 993
E-mail: tihana.vondrak12@gmail.com

OBRAZOVANJE

2012-2015 *Preddiplomski studij:* Odjel za biologiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera
Sveučilišni preddiplomski studij biologije

2008-2012 *Srednja škola:* Isusovačka Klasična Gimnazija s pravom javnosti u Osijeku, Osijek

VJEŠTINE I KOMPETENCIJE

Strani jezici: Engleski (izvrsno)

Računalne vještine: Odlično poznavanje MS Office aplikacija (Word, Excel, PowerPoint)
Odlično poznavanje Linux operativnog sustava
Odlično poznavanje programskih jezika: Bash, R i Python
Dobro poznavanje programskog jezika Perl
Osnovno poznavanje programa BioEdit