

Identifikacija vrsta roda Ruditapes (Mollusca, Bivalvia) upotrebom molekularnih biljega

Pirija, Mario

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:169741>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Mario Pirija

**Identifikacija vrsta roda *Ruditapes* (Mollusca, Bivalvia)
upotrebom molekularnih biljega**

Diplomski rad

Zagreb, 2015.

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.

Zahvaljujem mentorici dr. sc. Brankici Mravinac na strpljenju, podršci i vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada. Također zahvaljujem svim djelatnicima Laboratorija za strukturu i funkciju heterokromatina Instituta Ruđer Bošković na pomoći i suradnji.

Zahvaljujem svim profesorima, kolegama i prijateljima bez kojih studij ne bi prošao tako uspješno i zanimljivo, a posebno mojoj obitelji na neizmjernom razumijevanju i podršci tijekom studiranja.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Identifikacija vrsta roda *Ruditapes* (Mollusca, Bivalvia) upotrebom molekularnih biljega

Mario Pirija

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Školjkaš *Ruditapes decussatus* (Linnaeus 1758) je autohtona vrsta koja živi u Sredozemnom moru pa tako i uzduž istočne obale Jadranskog mora. U novije vrijeme ova vrsta postaje istinski ugrožena od srodne vrste *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve 1850), koja je početkom 1980-tih godina unesena u Sredozemno more iz jugoistočne Azije, te invazivnošću i dobrom prilagodljivošću potiskuje autohtonu vrstu *R. decussatus*. Morfološka sličnost školjkaša *R. decussatus* i *R. philippinarum* te prisutnost obje vrste na istim staništima znatno otežavaju njihovo razlikovanje. U ovom su radu po prvi puta analizirane vrste roda *Ruditapes* u hrvatskom dijelu Jadrana upotrebom molekularnih biljega DNA. Primjenom analize jednog mitohondrijskog (16S rDNA) i tri nuklearna (5S rDNA, ITS1, ITS2) biljega utvrđena je prisutnost alohtone vrste *R. philippinarum* na lokalitetu Zelena Laguna u blizini grada Poreča. Ovaj nalaz ujedno predstavlja i prvu evidenciju invazivnog školjkaša *R. philippinarum* u hrvatskom dijelu Jadrana. Analizom jadranskih uzoraka nisu otkriveni križanci između vrsta *R. decussatus* i *R. philippinarum*. Križanci su, međutim, pronađeni u kontrolnoj skupini uzoraka porijeklom iz Mramornog mora. Detekcija križanaca potvrdila je opravdanost i efikasnost upotrebe više različitih biljega DNA u identifikaciji vrsta roda *Ruditapes* i njihovih hibrida.

(49 stranica, 17 slika, 7 tablica, 47 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: *Ruditapes decussatus*, *Ruditapes philippinarum*, hibridne jedinke, 16S rDNA, 5S rDNA, ITS1, ITS2

Voditelj: Dr. sc. Brankica Mravinac, znanstveni suradnik

Ocjenitelj: Dr. sc. Inga Marijanović, doc.

Dr. sc. Ana Galov, doc.

Dr. sc. Mirjana Kalafatić, red. prof.

Rad prihvaćen: 26. studenog 2015

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

Identification of the species of the genus *Ruditapes* (Mollusca, Bivalvia) using molecular markers

Mario Pirija

Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The clam *Ruditapes decussatus* (Linnaeus 1758) is an indigenous species in the Mediterranean Sea, so it also inhabits the eastern coast of the Adriatic Sea. In recent years, this species has been endangered by related species *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve 1850), which was introduced into the Mediterranean Sea from Southeast Asia in the early 1980s. Due to invasiveness and good adaptability, *R. philippinarum* is spreading rapidly, threatening the native clam *R. decussatus*. The morphological similarity between *R. decussatus* and *R. philippinarum* as well as the presence of both species at the same habitats make their identification extremely difficult. In this paper, for the first time the species from the genus *Ruditapes* have been analyzed in the Croatian part of the Adriatic Sea by using molecular DNA markers. Analysis of one mitochondrial (16S rDNA) and three nuclear (5S rDNA, ITS1, ITS2) markers revealed the presence of non-native species *R. philippinarum* at Zelena Laguna in the vicinity of the city Poreč. This is the first record of invasive bivalve *R. philippinarum* in the Croatian part of Adriatic Sea. Analyses of *R. decussatus* and *R. philippinarum* samples from the Adriatic Sea did not discover their hybrids. However, the hybrids have been detected in the control group of samples originating from the Marmara Sea. Detection of hybrids has confirmed the advisability and effectiveness of the use of different DNA markers to identify *Ruditapes* species and their hybrids.

(49 pages, 17 figures, 7 tables, 47 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: *Ruditapes decussatus*, *Ruditapes philippinarum*, hybrids, 16S rDNA, 5S rDNA, ITS1, ITS2

Supervisor: Brankica Mravinac, PhD, Research Associate

Reviewers: Inga Marijanović, PhD, Asst. Prof.

Ana Galov, PhD, Asst. Prof.

Mirjana Kalafatić, PhD, Prof.

Thesis accepted: 26. November 2015

SADRŽAJ

1. Uvod	1
1.1. Školjkaši roda <i>Ruditapes</i> (Mollusca, Bivalvia)	1
1.2. Upotreba molekularnih biljega DNA 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 reagensija	9
2.1.5. Enzimi	9
2.1.6. Elektroforetski biljeg	9
2.1.7. Plazmidni vektor	10
2.1.8. Bakterijski soj	10
2.1.9. Tehnička oprema i uređaji	10
2.2. Metode	11
2.2.1. Izolacija genomske DNA	11
2.2.2. Umnažanje odsječaka DNA metodom lančane reakcije polimerazom (PCR)	11
2.2.2.1. Početnice	11
2.2.2.2. Reakcijske smjese PCR-a i uvjeti reakcija	12
2.2.3. Elektroforetsko razdvajanje odsječaka DNA u agaroznom gelu	13
2.2.4. Izolacija odsječaka DNA iz agaroznog gela	13
2.2.5. Ligacija fragmenata DNA i plazmidnog vektora	13
2.2.6. Transformacija kompetentnih bakterijskih stanica	13
2.2.7. PCR na bakterijskim kolonijama	14
2.2.8. Izolacija plazmidne DNA	14
2.2.9. Razgradnja plazmidne DNA restrikcijskim endonukleazama	14
2.2.10. Određivanje nukleotidnih sljedova produkata PCR-a	15
2.2.11. Bioinformatička analiza nukleotidnih sljedova	15
3. Rezultati	17
3.1. Analiza molekularnih biljega u jadranskim populacijama školjkaša <i>Ruditapes</i> spp. metodom PCR	17

3.2. Analiza molekularnih biljega u turskim populacijama školjkaša <i>Ruditapes</i> spp. metodom PCR	20
3.3. Određivanje i usporedba nukleotidnih sljedova 16S rDNA, 5S rDNA, ITS1 i ITS2 vrsta <i>R. decussatus</i> i <i>R. philippinarum</i>	22
3.3.1. Analiza nukleotidnih sljedova 16S rDNA	22
3.3.2. Analiza nukleotidnih sljedova 5S rDNA	30
3.3.3. Analiza nukleotidnih sljedova ITS1	33
3.3.4. Analiza nukleotidnih sljedova ITS2	37
4. Rasprava	39
5. Zaključak	43
6. Literatura	44
7. Prilozi	49

POPIS KRATICA

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

1. UVOD

1.1. Školjkaši roda *Ruditapes* (Mollusca, Bivalvia)

Vrste roda *Ruditapes*, poznatog i pod imenom *Venerupis*, pripadnice su porodice Veneridae razreda Bivalvia (školjkaši) iz koljena Mollusca (mekušci) (Matonićkin i sur. 1998). Školjkaši roda *Ruditapes* nalaze se među najraširenijim morskim vrstama u svijetu, intenzivno korištenim u ribarstvu i akvakulturi (FAO, 2013). Najpoznatiji predstavnici ovog roda su gospodarski značajne vrste *Ruditapes decussatus* (Linnaeus 1758) i *Ruditapes philippinarum* (Adams i Reeve 1850).

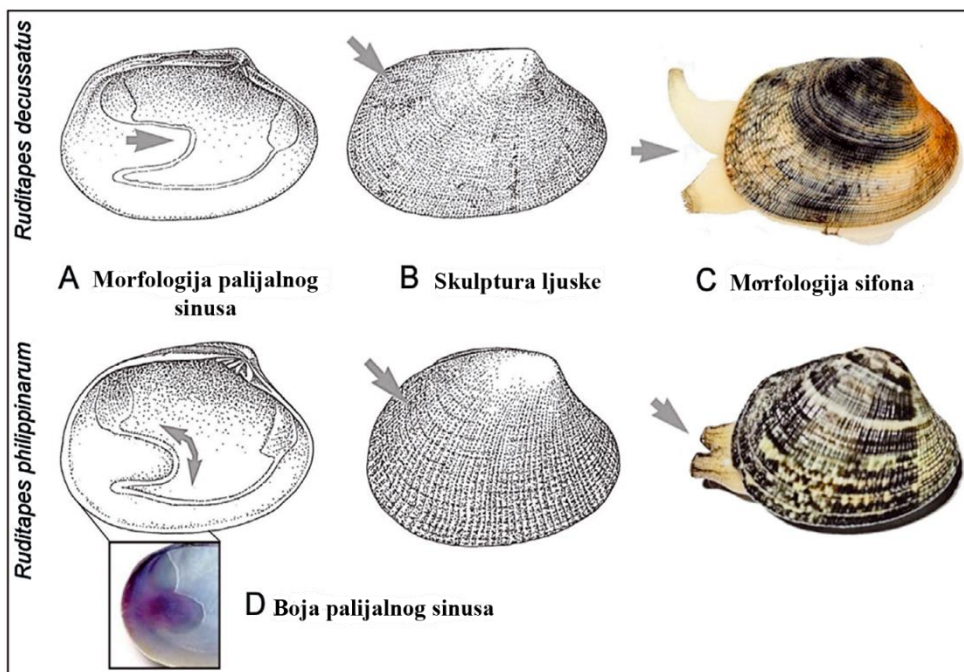
Školjkaš *R. decussatus* (poznat pod hrvatskim nazivom kućica, vongola ili lisanka) prirodno nastanjuje obalna i estuarijska područja Europe i sjeverne Afrike (Poppe i Goto 1991), živeći u muljevitim i pjeskovitim morskim dnima, ukopan u sediment i do 20 cm dubine. Tradicionalno sakupljan u prehrambene svrhe, zbog izuzetno kvalitetnog i ukusnog mesa ovaj školjkaš predstavlja gastronomski cijenjenog i traženog mekušca u području Mediterana. Međutim, prirodne populacije djelomično su smanjene uslijed intenzivnog izlovljavanja te onečišćenja voda. K tome, u novije vrijeme školjkaš *R. decussatus* postaje istinski ugrožen od srodne vrste *R. philippinarum*.

Izvorno podrijetlom iz Indo-Pacifičke regije Japana, Koreje i Kine, vrsta *R. philippinarum* unesena je tijekom sedamdesetih i osamdesetih godina prošlog stoljeća na prostore istočne obale Atlantika (Španjolska, Portugal, Irska i Engleska) te Mediterana (Francuska i Italija) u svrhu komercijalnog uzgoja, kako bi se povećala produktivnost i dohodak akvakultura (Gosling 2003). Nakon unosa u europske prostore, alohtoni školjkaš *R. philippinarum* se pokazao dobro adaptiranim i brže rastućim od autohtone vrste *R. decussatus*, kolonizirajući njezina staništa (Jensen i sur. 2004). Međutim, u usporedbi s autohtonom vrstom *R. decussatus*, unesena invazivna vrsta *R. philippinarum* slabije je kvalitete mesa te je time i manje cijenjena na tržištu. Školjkaš *R. philippinarum* unesen je 1983. godine u područje sjevernog Jadranskog mora u Venecijansku lagunu (Cesari i Pellizzato 1985, Breber 2002). U relativnom kratkom periodu invazivna vrsta kolonizirala je cijelu Venecijansku lagunu (Breber 2002), proširivši se također u obližnja područja uvale Marano (Zentilin 1990) kao i područje ušća rijeke Po (Carrieri i sur. 1992). Međutim, dosada u hrvatskom dijelu Jadrana prisutnost ove vrste nije literaturno zabilježena. Istovremeno, prirodne populacije vrste *R. decussatus*, determinirane isključivo na temelju morfoloških obilježja, prisutne su duž hrvatske obale (Peharda i sur. 2010).

Vrste *R. decussatus* i *R. philippinarum*, kao pripadnice istog roda dijele veliki broj morfoloških i anatomskih karakteristika. U tablici 1. navedene su okvirne razlikovne karakteristike između vrsta *R. decussatus* i *R. philippinarum* kako su ih sistematizirali Habtemariam i sur. (2015), a određene razlike u građi ljušture i sifona prikazane su na slici 1.

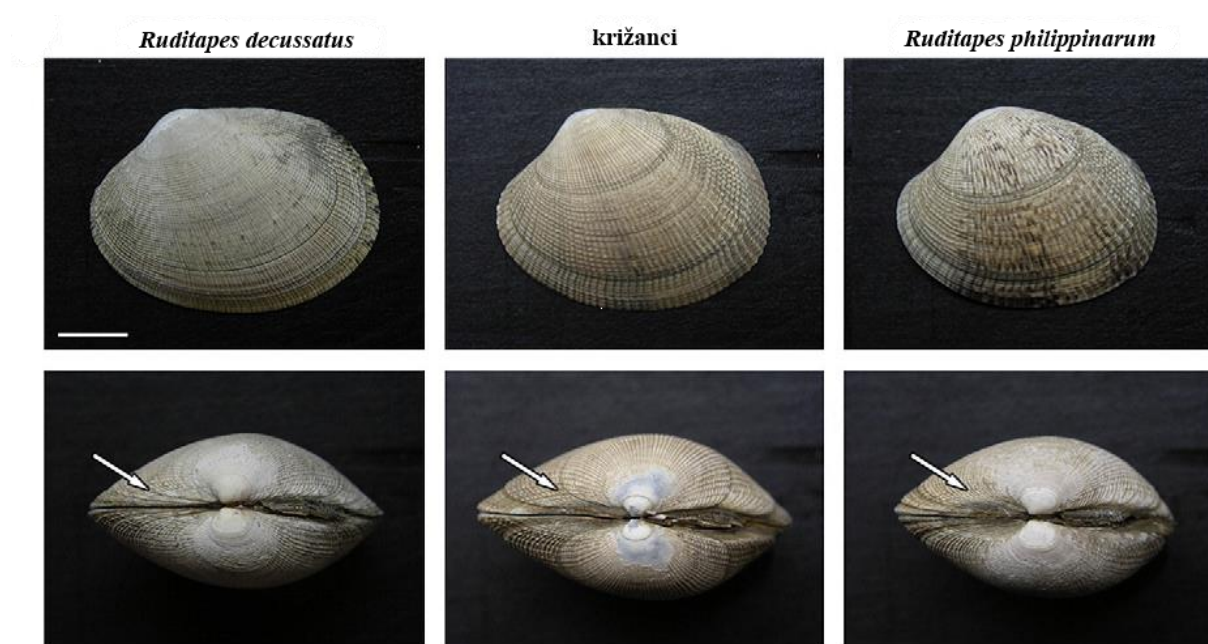
Tablica 1. Osnovne razlikovne karakteristike između vrsta *R. decussatus* i *R. philippinarum* (prema Habtemariam i sur. 2015)

	<i>Ruditapes decussatus</i>	<i>Ruditapes philippinarum</i>
Unutrašnjost školjke	Bijela ili svijetlo žuta bez ljubičastih točaka	Ljubičaste točke na mišićima, palijalnom sinusu i ventralnoj liniji ljuske
Skulptura ljušture	Isprepletena skulptura na anteriornom i posteriornom kraju školjke, ponekad odsutna na središnjem dijelu	Vrlo izražena isprepletena skulptura kroz cijelu površinu
Oblik školjke	Četverokutni oblik bez definirane lunule	Ovalni oblik s velikom srcolikom lunulom
Oblik sifona	Razdvojeni većinom duljine	Gotovo spojeni većinom duljine, razdvojeni samo pri vrhu



Slika 1. Pojednostavljena identifikacijska usporedba vrsta *R. decussatus* i *R. philippinarum* koja pokazuje glavne morfološke razlike između dviju vrsta (preuzeto iz Habtemariam i sur. 2015).

Morfološka sličnost školjkaša *R. decussatus* i *R. philippinarum*, znatna varijabilnost u vanjskoj površini ljuštura unutar svake vrste te naseljavanje istih tipova staništa, znatno otežavaju morfološko i *in situ* razlikovanje ovih vrsta. Dodatan problem pri utvrđivanju identiteta vrste proizlazi iz činjenice da je vrsta *R. philippinarum* sklona prirodno križati se s autohtonim kongeneričnim vrstama u čija staništa prodire (Kitada i sur. 2013). Križanci između alohtonih jedinki *R. philippinarum* i autohtonih jedinki *R. decussatus* pronađene su u španjolskim uvalama San Simon i Biscay (Hurtado i sur. 2011, Habtemariam i sur. 2015). Molekularno identificirane hibridne jedinke imale su intermedijarne karakteristike ljuštura (Slika 2), posjedujući u genomu biljege DNA obiju vrsta. Međutim, određeni broj jedinki, morfološki okarakteriziran kao vrsta *R. decussatus*, također je posjedovao biljege DNA specifične za križance (Hurtado i sur. 2011, Habtemariam i sur. 2015). Pronalazak križanaca između vrsta roda *Ruditapes* ukazuje na potrebu pomnog praćenja širenja invazivnih vrsta, kao i na važnost upotrebe molekularnih biljega u identifikaciji vrsta.



Slika 2. Morfologija školjke u školjkaša roda *Ruditapes*. Vanjska morfologija ljuštura u jedinkama *R. decussatus*, *R. philippinarum* i križanaca s razlikama u obrascu pruga (gornji red slika) i morfologiji lunule (donji red slika, označeno strelicama) (preuzeto iz Hurtado i sur. 2011).

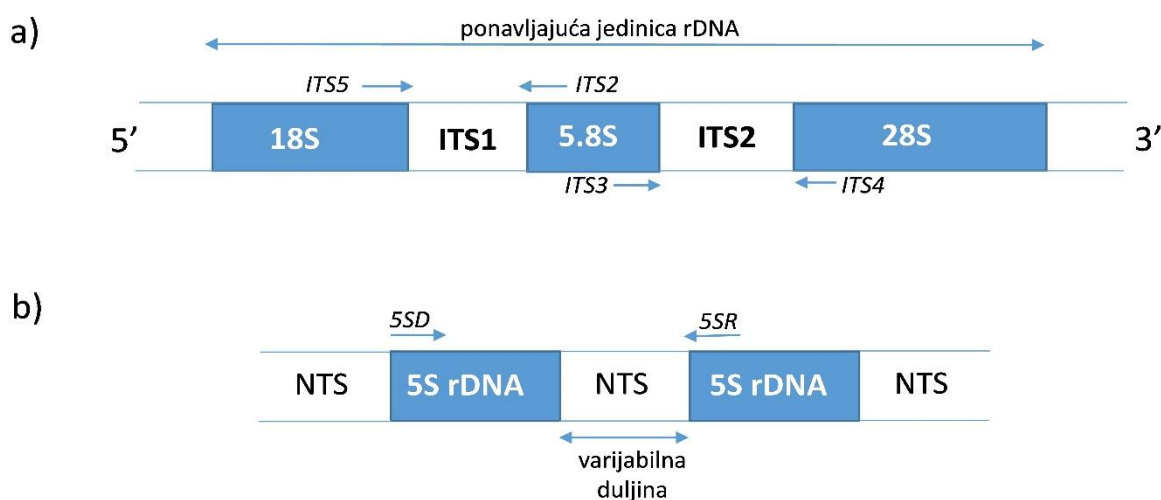
1.2. Upotreba molekularnih biljega DNA u identifikaciji vrsta

Molekula DNA, kao nasljedni materijal koji sadrži genetske upute za specifični biološki razvoj živih bića, u kombinaciji s metodom lančane reakcije polimerazom (PCR, skraćeno od eng. *polymerase chain reaction*) čini moćan alat za utvrđivanje identiteta vrsta. Postoji mnoštvo biljega DNA koji se koriste kako u analizi identiteta tako i pri određivanju srodstvenih odnosa između pojedinih vrsta. U analizi životinjskih vrsta uspješno se koriste biljezi DNA smješteni u mitohondrijskoj DNA (mtDNA), kao i oni koji se nalaze u jezgri DNA.

Mitohondrijska DNA (mtDNA) pogodna je za analizu biljega DNA iz nekoliko razloga: jednostavno je strukturirana u mali (15-20 kb), stabilan, kružni genom bez introna i drugih nekodirajućih sekvenca; nasljeđuje se po majčinskoj liniji; ne podliježe rekombinaciji; evoluira brže od jezgrine DNA; prisutna je u stanicama u velikom broju kopija (do nekoliko tisuća) što znatno olakšava njezinu izolaciju; 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). Među biljezima mtDNA za identifikaciju vrsta najupotrebljavaniji je gen koji kodira protein citokrom c oksidazu i to njezinu podjedinicu 1 (COI). Varijabilnost u sekvenci na 5' kraju gena COI uz upotrebu univerzalnih početnica PCR-a predstavlja temelj identifikacijskog sustava životinjskih vrsta pod nazivom *DNA barcoding* (Hebert i sur. 2003). Kao biljeg DNA također je vrlo upotrebljavan mitohondrijski gen za citokrom b (cytb) (Linacre 2006). Pri identifikaciji školjaka te razrješavanju njihovih srodstvenih odnosa, uz analizu COI vrlo često se analizira mitohondrijski gen za 16S rRNA (Canapa i sur. 1996, Fernandez i sur. 2002, Feng i sur. 2011, Chiesa i sur. 2014).

DNA smještena u jezgri također predstavlja dobar izvor razlikovnih informacija koje mogu pomoći u identifikaciji vrsta. Od nuklearnih biljega najčešće su upotrebljavani biljezi RAPD (akronim od eng. *random amplified polymorphic DNA*), AFLP (eng. *amplified fragment length polymorphism*) te mikrosateliti (nazivani još i SSR (eng. *short sequence repeats*) biljezima). Za identifikaciju vrsta također su vrlo korisne nekodirajuće regije tzv. ITS (eng. *internal transcribed spacer*), smještene unutar uzastopno ponavljajućih jedinica rRNA (slika 3a). Regija ITS1 je smještena između gena za 18S i 5.8S rRNA dok se ITS2 nalazi između gena za 5.8S i 28S rRNA (Slika 3a). Upotrebom početnica smještenih unutar sačuvanih gena za 18S, 5.8S i 28S rRNA umnažaju se vrsno-specifične regije ITS, koje se svojom sekvencom i duljinom razlikuju između pojedinih, pa čak i blisko srodnih vrsta, te na taj način omogućavaju identifikaciju vrsta. Na sličan način analizira se i tzv. biljeg 5S rDNA. Geni 5S rRNA, koji

kodiraju komponentu 5S rRNA velike ribosomske podjedinice, također su ponavljajući, a razdvojeni su regijama NTS (skraćeno od eng. *non-transcribed spacer*) varijabilnih duljina (slika 3b). Upravo varijabilnost sekvence NTS i njezine duljine između pojedinih organizama čini ovo područje odličnim biljekom u identifikaciji vrsta. Prilikom analize ovog područja metodom PCR koriste se univerzalne početnice smještene u području gena za 5S rRNA (slika 3b).



Slika 3. a) Shema regija ITS1 i ITS2 u ponavljajućim jedinicama rDNA. **b)** Shema gena 5S rRNA razdvojenih neprepisujućim segmentima DNA (NTS). Strelicama su označeni položaji početnica koje se koriste u amplifikaciji molekularnih biljega ITS1, ITS2 i 5S rDNA.

Pri identifikaciji DNA vrsta svakako je poželjno analizirati više neovisnih biljega, po mogućnosti kombinaciju mitohondrijskih i nuklearnih markera. Biljezi iz različitih izvora (mitohondrijski i jezgrini) posebno su važni pri određivanju križanih jedinki koje se mogu detektirati samo jezgrinim biljezima, budući da mitohondrijski biljezi upućuju isključivo na majčinsku liniju križanaca.

U identifikaciji vrsta roda *Ruditapes* najčešće se koristi mitohondrijski biljeg 16S rDNA (Canapa i sur. 1996, Fernandez i sur. 2002, Hurtado i sur. 2011, Chiesa i sur. 2011, 2014). Međutim, dodatna upotreba nuklearnih biljega ITS1, ITS2 i 5S rDNA otkrila je postojanje križanaca između jedinki *R. decussatus* i *R. philippinarum* (Hurtado i sur. 2011, Habtemariam i sur. 2015). Budući da biljezi 16S rDNA, 5S rDNA, ITS1 i ITS2 pokazuju vršno-specifičnu

duljinu fragmenata DNA, razlučivu već i pri elektroforetskom razdvajanju PCR-om umnoženih produkata, predstavljaju idealnu kombinaciju alata za razlikovanje kako samih vrsta *R. decussatus* i *R. philippinarum*, tako i njihovih križanaca (Hurtado i sur. 2011).

1.3. Cilj istraživanja

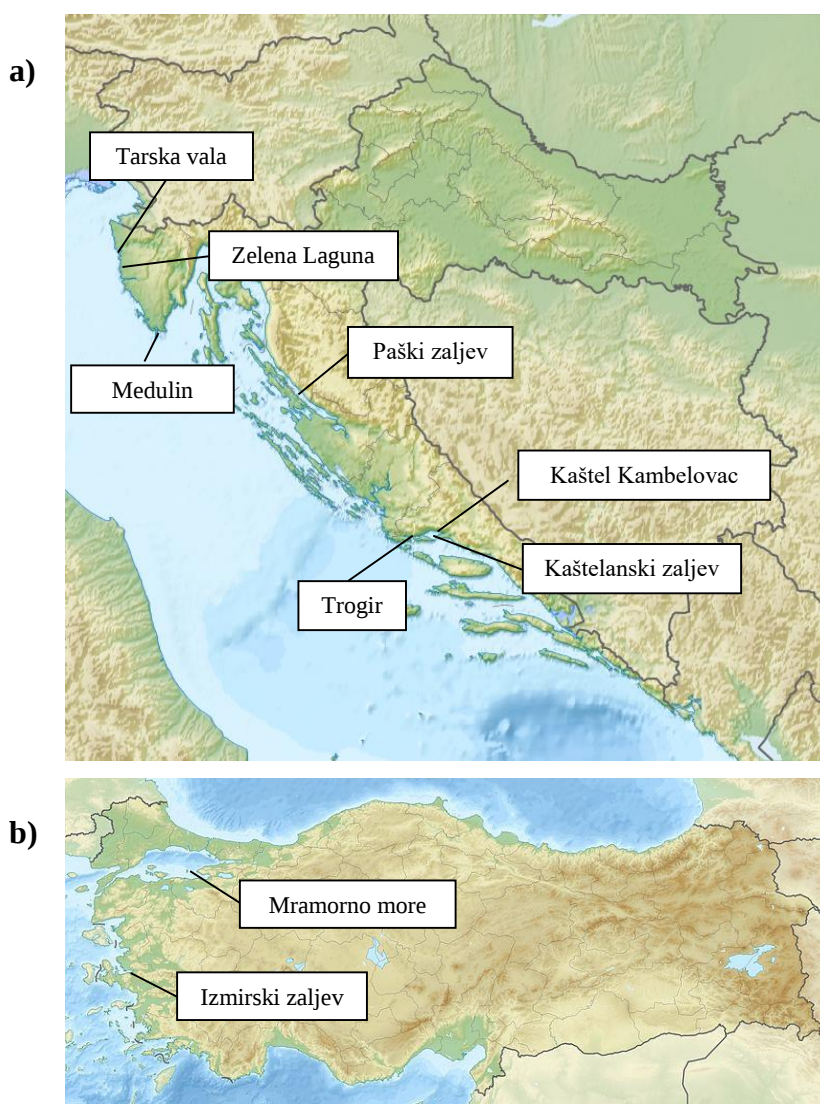
Cilj ovog rada bio je istražiti da li se u hrvatskim vodama Jadrana uz postojećeg autohtonog školjkaša *R. decussatus* pojavila i alohtona invazivna vrsta *R. philippinarum*. Budući da su navedene vrste morfološki vrlo slične što znatno otežava, a nerijetko i onemogućava točno utvrđivanje vrste, identifikacija je napravljena upotrebom molekularnih biljega. Time ovaj rad predstavlja prvu studiju vrsta roda *Ruditapes* u hrvatskom dijelu Jadrana upotrebom biljega DNA. Analizirani su nukleotidni sljedovi gena 16S rRNA i 5S rRNA te regija ITS1 i ITS2. Združena analiza četiri biljega (jednog mitohondrijskog i tri nuklearna) omogućila je nedvosmislenu identifikaciju vrsta, a također je ovakvim pristupom bilo moguće istražiti jesu li se u Jadranu pojavile hibridne jedinke nastale križanjem vrsta *R. decussatus* i *R. philippinarum*.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Materijali

2.1.1. Životinjski materijal

Korišteni su školjkaši roda *Ruditapes* prikupljeni na terenu područja Tarske vale, Zelene Lagune, Medulina, Paškog zaljeva, Trogira, Kaštelanskog zaljeva i Kaštel Kambelovca (slika 4a). U analizu su također uključeni uzorci vrste *R. decussatus* porijeklom iz Izmirskog zaljeva (Turska) te uzorci vrste *R. philippinarum* iz Mramornog mora (Turska) (slika 4b).



Slika 4. Zemljopisne karte Hrvatske (a) i Turske (b) s označenim lokalitetima na kojima su sakupljene jedinke vrsta *R. decussatus* i *R. philippinarum* analizirane u ovome radu.

Jadranske jedinke *Ruditapes* spp. sakupila je i prema morfološkim obilježjima determinirala dr. sc. Vedrana Nerlović iz Centra za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju. Turski primjerci vrsta *R. decussatus* i *R. philippinarum* dobiveni su ljubaznošću dr. sc. Alpera Dogana s Ribarskog fakulteta Sveučilišta Ege (Turska).

2.1.2. Osnovne kemikalije

- etidijev bromid (Serva)
- etanol (Kemika)
- agaroza (Sigma)
- orange G (Sigma)
- 5-brom-4-klor-3-indolil- β -D-galaktozid (X-gal) (GIBCO BRL)
- izopropil- β -D-tiogalaktozid (IPTG) (GIBCO BRL)
- natrijev hidroksid (Kemika)
- 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
- tekuća LB hranjiva podloga (pH 7,0): bakto tripton (10 g/L), ekstrakt kvasca (5 g/L), NaCl (10 g/L)
- kruta LB hranjiva podloga s antibiotikom (pH 7,0); bakto tripton (10 g/L), ekstrakt kvasca (5 g/L), NaCl (10 g/L), agar (10 g/L) i ampicilin (0.1 g/L)

2.1.4. Kompleti reagencija

- komplet „DNeasy Blood and Tissue Kit“ za izdvajanje DNA iz tkiva (QIAGEN)
- komplet „QIAquick Gel Extraction Kit“ za pročišćavanje odsječaka DNA iz agaroznog gela (QIAGEN)
- komplet „GoTaq Flexi DNA Polymerase“ za lančanu reakciju polimerazom, koji sadržava: DNA polimerazu GoTaq (5U/μl), 5x koncentrirani pufer GoTaq Flexi i 25mM MgCl₂ (Promega)
- komplet „GoTaq Green Master Mix“ za lančanu reakciju polimerazom, koji sadržava u 2x koncentriranom reakcijskom puferu Green GoTaq: DNA polimerazu GoTaq , 400μM smjesu dNTP i 3mM MgCl₂ (Promega)
- komplet „QIAquick PCR Purification Kit“ za pročišćavanje produkata reakcije PCR-a (QIAGEN)
- komplet „pGEM-T Easy Vector System I“ za kloniranje produkata PCR-a koji sadržava: plazmidni vektor pGEM-T (50 ng/μl), enzim T4 DNA ligazu (3 Weiss U/μl) i 2x koncentrirani pufer za T4 DNA ligazu (Promega)
- komplet „DNA-spin Plasmid DNA Purification Kit“ za izolaciju plazmidne DNA (iNtRON Biotechnology)

2.1.5. Enzimi

- restrikcijska endonukleaza FastDigest *EcoRI* sa pripadajućim puferom za restrikcijsku analizu (Fermentas)

2.1.6. 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

2.1.7. Plazmidni vektor

Za kloniranje produkata PCR-a korišten je plazmidni vektor pGEM-T iz kompleta „p-GEM-T Easy Vector System I“ koji omogućuje AT-kloniranje. *Taq* polimeraza ugrađuje na 3' krajevima produkata PCR-a dodatan dATP, koji se u reakciji ligacije sparuje s komplementarnim timidinom na krajevima linearnog T-vektora.

Vektor pGEM-T sadrži gen za otpornost na antibiotik ampicilin (*amp^r*) što omogućuje selekciju transformiranih bakterija. Mjesto za kloniranje fragmenta se nalazi unutar gena *lacZ* koji kodira enzim β -galaktozidazu pa je putem α -komplementacije omogućena plavo-bijela selekcija transformanata.

2.1.8. Bakterijski soj

Za umnažanje plazmida korištene su kompetentne bakterijske stanice vrste *Escherichia coli* soja DH5 α ($F^- \phi 80 lacZ \Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(r_k^-, m_k^+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 \lambda^-$) (Invitrogen).

2.1.9. 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)
- stolna tresilica Vibramax (Heidolph)
- termoblok (Bioblock Scientific)
- termostatski inkubator (Sutjeska)

2.2. METODE

2.2.1. Izolacija genomske DNA

Genomska DNA izolirana je iz tkiva mišića zatvarača školjkaša upotrebom kompleta „DNeasy Blood and Tissue Kit“ prema uputama proizvođača. DNA je isprana s membrane s 100 µl elucijskog pufera. Količina i kakvoća genomske DNA u eluatu procijenjene su usporedbom s λ -DNA poznate koncentracije nakon elektroforeze u 1% agaroznom gelu. Dodatno su količina i kakvoća DNA određene spektrofotometrijskim mjerenjem optičkih gustoća OD₂₆₀ i OD₂₈₀.

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

Odsjeci analiziranih biljega DNA za utvrđivanje vrsta roda *Ruditapes* umnoženi su metodom lančane reakcije polimerazom (PCR).

2.2.2.1. Početnice

Korištene su početnice za umnažanje odsječaka četiri različita biljega DNA: 16S rDNA, 5S rDNA, regije ITS1 i ITS2. Nukleotidni sljedovi početnica navedeni su u tablici 2. Navedene oligonukleotidne početnice sintetizirane su u korisničkom servisu Invitrogen (SAD). Pomoću gradijentnog PCR-a određene su optimalne temperature sparivanja pojedinog para početnica s kalupom DNA.

Tablica 2. Parovi početnica korišteni pri umnažanju biljega 16S rDNA, 5S rDNA, ITS1 i ITS2 metodom PCR

DNA biljeg	nukleotidni slijed početnica		duljina odsječka*	izvor
16S rDNA	16S-ar	5' - CGCCTGTTTATCAAAAACAT - 3'	522 pb (RDE)	Palumbi i sur. 2002
	16S-br	5' - CCGGTCTGAACTCAGATCACGT - 3'	553 pb (RPH)	
5S rDNA	5SD	5' - CAACGTGATATGGTCGTAGAC - 3'	593 pb (RDE)	Hurtado i sur. 2011
	5SR	5' - AACACCGGTTCTCGTCCGATC - 3'	526 pb (RPH)	
ITS1 regija	ITS2	5' - GCTGCGTTCTTCATCGATGC - 3'	797 pb (RDE)	Hurtado i sur. 2011
	ITS5	5' - GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG - 3'	698 pb (RPH)	
ITS2 regija	ITS3	5' - GCATCGATGAAGAACGCAGC - 3'	482 pb (RDE)	Hurtado i sur. 2011
	ITS4	5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3'	565 pb (RPH)	

*očekivane duljine umnoženih odsječaka navedene su za vrste *R. decussatus* (RDE) i *R. philippinarum* (RPH) prema podacima iz Hurtado i sur. 2011

2.2.2.2. Reakcijske smjese PCR-a i uvjeti reakcija

Umnažanja biljega DNA metodom PCR-a provedena su u ukupnom volumenu reakcijskih smjesa od 10 µl i 30 µl. Smjesa od 10 µl je sadržavala: 1x GoTaq Flexi pufer, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM smjese dNTP, 1 µM specifičnih početnica, 0.5 U GoTaq polimeraze i 20 ng genomske DNA. U reakcijskoj smjesi od 30 µl komponente zadržavaju isti omjer.

Programi ciklusa umnažanja pojedinih biljega navedeni su u tablicama 3 i 4.

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

PCR korak	temperatura	vrijeme	broj
početna denaturacija	94°C	3 min	1
denaturacija	94°C	20 s	35
sparivanje	55°C	20 s	35
produljenje	72°C	20 s	35
završno produljenje	72°C	7 min	1

Tablica 4. Program ciklusa umnažanja odsječaka 5S rDNA, ITS1 i ITS2 metodom PCR

PCR korak	temperatura	vrijeme	broj
početna denaturacija	94°C	3 min	1
denaturacija	94°C	30 s	30
sparivanje	50°C	30 s	30
produljenje	72°C	30 s	30
završno produljenje	72°C	7 min	1

2.2.3. Elektroforetsko razdvajanje odsječaka DNA u agaroznom gelu

Odsjecci DNA nakon reakcije PCR razdvojeni su elektroforezom u 1 %-tnom agaroznom gelu. Gel je pripremljen otapanjem agaroze u puferu 1x TAE uz dodatak etidijevog bromida (0.5 µg/ml) za vizualizaciju DNA. Elektroforeza se odvijala u istom puferu pri sobnoj temperaturi. Duljina fragmenata procijenjena je prema elektroforetskom biljegu „O'GeneRuler DNA Ladder Mix“, dok se za procjenu količine DNA koristila λ-DNA poznate koncentracije.

Nakon elektroforetskog razdvajanja gelovi su fotografirani pomoću uređaja G:BOX, koji omogućava i računalnu pohranu fotografije gela.

2.2.4. Izolacija odsječaka DNA iz agaroznog gela

Dijelovi gela sa odabranim odsječcima DNA su izrezani na transiluminatoru i izvagani, a zatim je DNA izolirana korištenjem kompleta „QIAquick Gel Extraction Kit“.

2.2.5. Ligacija fragmenata DNA i plazmidnog vektora

Reakcije ligacije izoliranih odsječaka DNA i vektora pGEM-T provedene su pomoću enzima T4 DNA ligaza u 2x Rapid ligacijskom puferu na 4°C preko noći. Omjer fragmenata DNA i vektora u reakciji iznosio je 3:1.

2.2.6. Transformacija kompetentnih bakterijskih stanica

Kompetentne bakterijske stanice vrste *E. coli* transformirane su vektorom pGEM-T metodom temperaturnog šoka. U 50 µl otopine kompetentnih stanica na ledu dodano je 3 µl ligacijske smjese i inkubirano 30 minuta. Stanice su podvrgnute temperaturnom šoku u trajanju od 20 sekundi inkubacijom otopine stanica i ligacijske smjese u vodenoj kupelji na temperaturi od 42°C te ponovnim vraćanjem na led 2 minute. Stanice su regenerirane 1 sat u 950 µl tekuće podloge LB uz neprekidnu trešnju na temperaturi od 37°C, nakon čega su nacijepljene na selektivne krute podloge LB s dodatkom ampicilina (100 µg/ml), 40 µl induktora IPTG (100 mM) te 40 µl supstrata X-gal (20 mg/ml).

2.2.7. PCR na bakterijskim kolonijama

Korištenje plazmidnog vektora pGEM-T omogućava plavo-bijelu selekciju kolonija. U svrhu određivanja veličina ugrađenih odsječaka provodio se PCR na bakterijskim kolonijama (eng. *colony PCR*). Sterilnim nastavkom se dotakne bakterijska kolonija te se uroni u mikroeprevetu s 10 µl mq H₂O i dobro propipetira. Uzorak se denaturira u uređaju za PCR pri 95°C 10 minuta, a zatim se ohladi na ledu i kratko centrifugira. Reakcija PCR-a provodi se u volumenu od 10 µl reakcijske smjese koja sadrži 5 µl 2xGoTaq Green Master Mix, 1 µl bakterijske denaturirane kulture, 0.4 µM ITS5 i ITS2 početnica te mQ-H₂O. Program umnažanja započinjao je početnom denaturacijom na 94°C 2 minute, a zatim je slijedilo 30 ciklusa koji su se sastojali od denaturacije 20 sekundi na 94°C, sparivanja početnica 20 sekundi na 55°C i produljivanja lanaca 30 sekundi na 72°C. Završno produljivanje lanaca bilo je 5 minuta na 72°C. Produkti reakcije PCR-a na bakterijskim kolonijama analizirani su u 1% agaroznom gelu. Kolonije koje su pokazale postojanje odsječka DNA željene duljine uzgojene su u 4 ml tekuće selektivne podloge LB s dodatkom ampicilina (100 µg/ml) preko noći na temperaturi od 37°C uz neprekidnu trešnju od 225 rpm.

2.2.8. Izolacija plazmidne DNA

Bakterije s ugrađenim željenim odsječkom su uzgojene preko noći na tekućoj selektivnoj podlozi LB te oborene centrifugiranjem. Plazmidna DNA je zatim izolirana upotrebom kompleta „DNA-spin Plasmid DNA Purification Kit“ prema uputama proizvođača, a na kraju eluirana s 50 µl elucijskog pufera. Koncentracija izolirane plazmidne DNA provjerena je elektroforezom u agaroznom gelu.

2.2.9. Razgradnja plazmidne DNA restrikcijskim endonukleazama

Plazmidna DNA razgrađena je restrikcijskom endonukleazom FastDigest *EcoRI* u FastDigest puferu u cilju izrezivanja kloniranih odsječaka radi daljnje analize. Reakcije su provedene prema uputama proizvođača uz korištenje 1 U enzima po µg plazmidne DNA.

2.2.10. Određivanje nukleotidnih sljedova PCR produkata

Prije određivanja nukleotidnih sljedova, produkti PCR-a pročišćeni su pomoću kompleta „QIAquick PCR Purification Kit“ prema uputama proizvođača.

Nukleotidni sljedovi produkata PCR-a kao i kloniranih odsječaka DNA određeni su u servisu za sekvenciranje Macrogen (Amsterdam, Nizozemska). Svi odsjeci DNA sekvencirani su u oba smjera. Ovisno o vrsti produkta PCR-a, u reakcijama sekvenciranja korištene su početnice za 16S rDNA (16S-ar i 16S-br), 5S rDNA (5SD i 5SR), kao i za regiju ITS2 (ITS3 i ITS4). U određivanju primarne strukture fragmenata kloniranih u plazmidni vektor pGEM-T upotrijebljene su komercijalne početnice SP6 i T7.

2.2.11. Bioinformatička analiza nukleotidnih sljedova

Program BioEdit v.7.2.5 (Hall 1999) korišten je za uređivanje te osnovne manipulacije nukleotidnih sljedova, dobivenih kapilarnim sekvenciranjem u korisničkom centru Macrogen. Točnost očitanih nukleotida uspoređena je sparivanjem sljedova komplementarnih lanaca te pripadajućih kromatograma. Sljedovima su određeni krajevi te odstranjena vezna mjesta za početnice, kako ne bi utjecala na daljnju analizu.

Nukleotidni sljedovi uspoređeni su s podacima pohranjenim u genskoj bazi NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). U tu svrhu upotrijebljen je *on-line* alat BLAST (eng. *Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul i sur. 1990) za pretraživanje po sličnosti prema algoritmu *megablast*, koja osigurava pretraživanje vrlo sličnih nukleotidnih sljedova.

Filogenetske analize rađene su upotrebom više različitih programa. Za višestruko sravnjivanje nukleotidnih sljedova korišten je program ClustalX v.2.1. (Larkin i sur. 2007). Unutarvrzne i međuvrsne nekorrigirane udvojene genetičke udaljenosti (eng. *uncorrected pairwise distance, p-distance*) između nukleotidnih sljedova izračunate su upotrebom programa MEGA6 v. 06 (Tamura i sur. 2013). Program MEGA6 također je korišten za filogenetske analize sprovedene metodama: *Maximum Likelihood* (ML), *Neighbor Joining* (NJ) i *Maximum Parsimony* (MP). Za pojedine setove podataka pomoću programa jModelTest (Posada 2008) odabrani su najpovoljniji modeli nukleotidne supstitucije za analizu ML prema parametru

Bayesian information criterion (BIC). U analizi ML korištena je heuristička metoda odabira stabla *Nearest-Neighbor-Interchange* (NNI). U analizi NJ korištene su nekorrigirane udvojene udaljenosti (*p-distance*), dok je u analizi MP za pretraživanje stabala korištena metoda *Close-Neighbor-Interchange* (CNI). Statistička podrška za topologiju filogenetskih stabala određena je na temelju 1000 replikacija (*bootstrap* ponavljanja).

U svrhu analize različitih haplotipova sekvenca 16S rDNA vrste *R. decussatus* također su izrađene haplotipske mreže pomoću programa TCS 1.21 (Clement i sur. 2000) upotrebom metode statističke parsimonije s pragom povezivanja od 90 do 99%.

U filogenetsku analizu *Ruditapes* haplotipova također su uključeni podaci za odsječke 16S rDNA vrsta roda *Ruditapes*, deponirani u bazi podataka NCBI GenBank pod sljedećim pristupnim brojevima: KF736199-KF736211, DQ356383, AJ548764, HQ634141, AF038999 i DQ184754. Odsječci 16S rDNA vrsta *Corbicula fluminea* (AF038999) and *Glaucomone rugosa* (DQ184754), iz reda Veneroida, korištene su kao vanjske grupe, sljedeći strategiju recentnih filogenetski studija školjkaša iz porodice Veneridae (Chen i sur. 2011, Chiesa i sur. 2014).

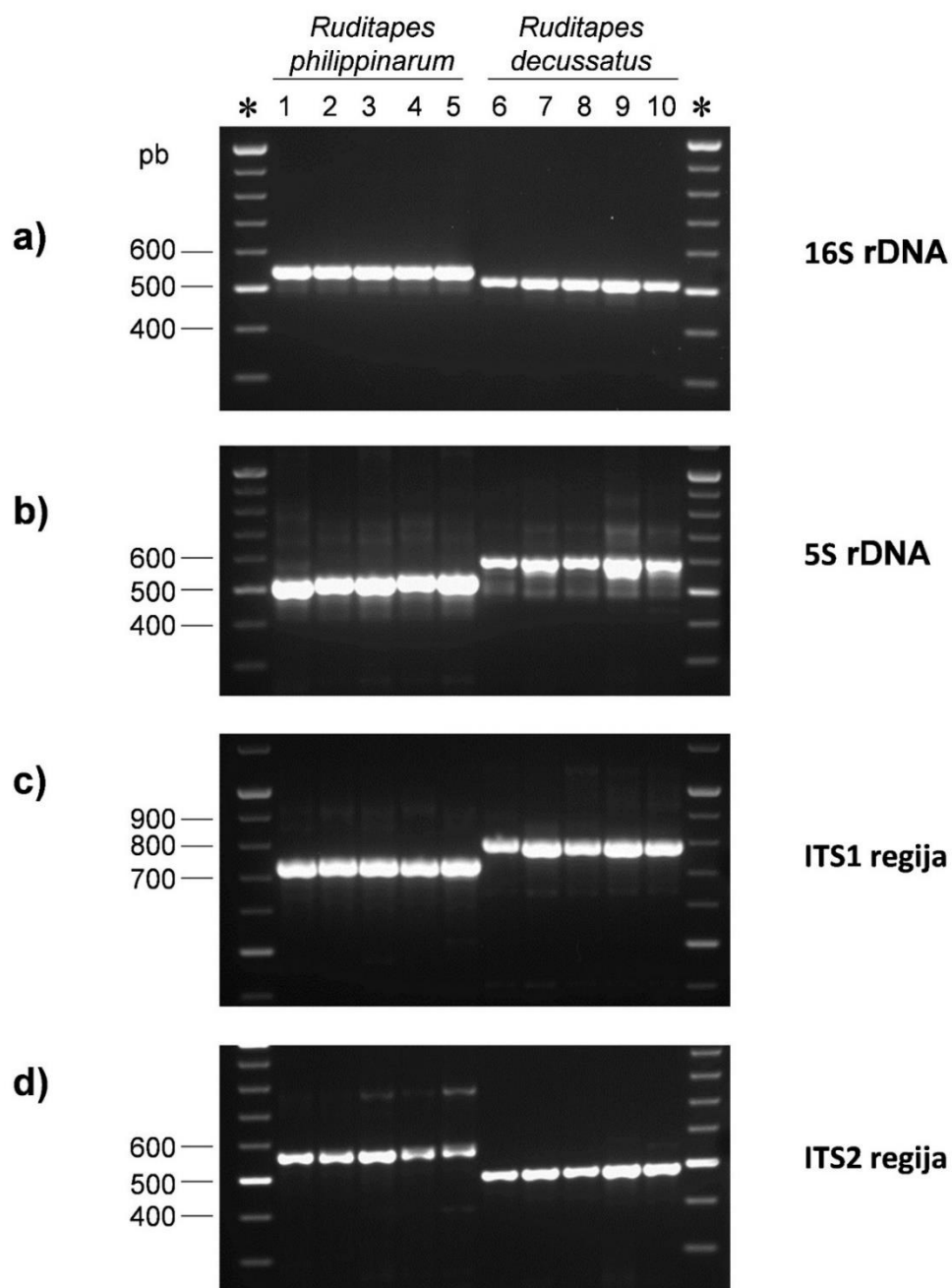
3. REZULTATI

3.1. Analiza molekularnih biljega u jadranskim populacijama školjkaša *Ruditapes* spp. metodom PCR

U okviru diplomskog rada izolirana je DNA iz 46 jedinki školjkaša *Ruditapes* spp. sakupljenih na 7 različitih lokaliteta duž obala Istre te Sjeverne i Srednje Dalmacije (slika 4a). Metodom PCR iz izoliranih genomskih DNA umnoženi su odsjecci mitohondrijalnog biljega 16S rDNA te jezgrinih biljega 5S rDNA, ITS1 i ITS2.

Nakon elektroforetskog razdvajanja umnoženih odsječaka DNA u agaroznom gelu, uočeno je da uzorci pokazuju jednu od dviju različitih duljina odsječaka za svaki od biljega (slika 5). Prema literaturnim podacima (Hurtado i sur. 2011), očekivana duljina umnoženih odsječaka za vrstu *R. philippinarum* trebala bi iznositi 553 pb za 16S rDNA, 526 pb za 5S rDNA, 698 pb za ITS1 te 565 pb za ITS2, dok se za vrstu *R. decussatus* očekuju duljine 522 pb za 16S rDNA, 593 pb za 5S rDNA, 797 pb za ITS1 te 482 pb za ITS2. Na slici 5 prikazano je elektroforetsko razdvajanje umnoženih odsječaka četiriju biljega za jedinke sakupljene na području Zelene Lagune, a sumarni rezultati za sve analizirane jedinke jadranskih populacija prikazani su u tablici 5. Na temelju elektroforetskog razdvajanja umnoženih odsječaka četiriju biljega PCR-om, zaključeno je da od ukupno 46 analiziranih jedinki iz Jadranskog mora, njih 41 pripada vrsti *R. decussatus*, dok svega pet jedinki odgovara vrsti *R. philippinarum* (tablica 5, slika 5). Važno je istaknuti da su rezultati za mitohondrijski biljeg 16S rDNA bili u potpunosti podržani rezultatima za preostala tri biljega porijeklom iz nuklearne DNA.

Analizom jadranskih populacija školjkaša *Ruditapes* spp. prisutnost vrste *R. philippinarum* utvrđena je isključivo na lokalitetu Zelene Lagune u blizini grada Poreča.



Slika 5. Elektroforetsko razdvajanje PCR-om umnoženih odsječaka DNA molekularnih biljega 16S rDNA (a), 5S rDNA (b), ITS1 (c) i ITS2 (d). Na slici su prikazani rezultati za uzorke sakupljene na području Zelene Lagune: RU1-2 (1), RU1-4 (2), RU1-6 (3), RU1-8 (4), RU1-10 (5), RU1-18 (6), RU1-19 (7), RU1-N1 (8), RU1-N2 (9) i RU1-D18 (10). Znakom * na slici gela označen je položaj elektroforetskog biljega.

Tablica 5. Identifikacija vrsta na temelju elektroforetskog razdvajanja PCR-om umnoženih molekularnih biljega. Duljina odsječaka DNA, koja odgovara vrsti *R. decussatus*, označena je skraćenicom DE, dok oznaka PH označava odsječke karakteristične za vrstu *R. philippinarum*. Znakom + označeni su odsječci kojima je određen također i nukleotidni slijed.

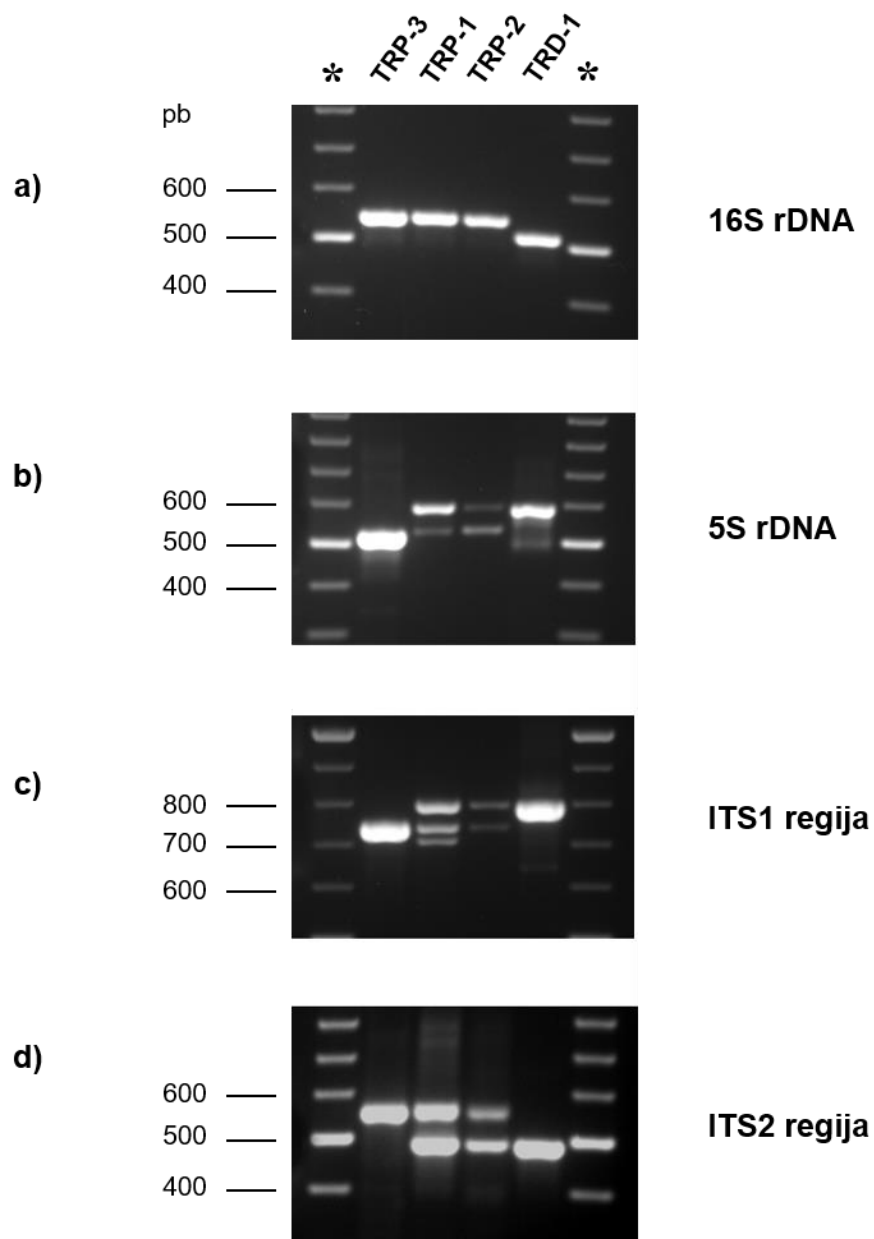
lokacija	uzorak	molekularni biljeg			
		16S rDNA	5S rDNA	ITS1	ITS2
Tarska vala	RU0-1	DE +	DE	DE	DE
	RU0-2	DE +	DE	DE	DE
	RU0-5	DE +	DE	DE	DE
	RU0-7	DE +	DE	DE	DE
	RU0-13	DE +	DE	DE	DE
Zelena Laguna	RU1-2	PH +	PH	PH	PH
	RU1-4	PH +	PH	PH	PH
	RU1-6	PH +	PH +	PH +	PH +
	RU1-8	PH +	PH +	PH +	PH +
	RU1-10	PH +	PH	PH	PH
	RU1-18	DE +	DE	DE	DE
	RU1-19	DE +	DE	DE	DE
	RU1-N1	DE +	DE	DE	DE
	RU1-N2	DE +	DE	DE	DE
	RU1-D18	DE +	DE	DE	DE
Medulin	RU2-1	DE +	DE	DE	DE
	RU2-3	DE +	DE	DE	DE
	RU2-6	DE +	DE	DE	DE
	RU2-8	DE +	DE	DE	DE
	RU2-10	DE	DE	DE	DE
	RU2-14	DE	DE	DE	DE
	RU2-15	DE	DE	DE	DE
	RU2-16	DE	DE	DE	DE
	RU2-26	DE	DE	DE	DE
Trogir	RU2-27	DE +	DE	DE	DE
	RU3-1	DE +	DE	DE	DE
	RU3-2	DE +	DE	DE	DE
	RU3-3	DE +	DE	DE	DE
	RU3-4	DE +	DE	DE	DE
	RU3-5	DE +	DE	DE	DE
	RU3-6	DE	DE	DE	DE
	RU3-7	DE	DE	DE	DE
	RU3-8	DE	DE	DE	DE
Paški zaljev	RU3-9	DE	DE	DE	DE
	RU3-10	DE	DE	DE	DE
	RUP-1	DE +	DE	DE	DE
	RUP-2	DE +	DE	DE	DE
	RUP-3	DE +	DE	DE	DE
Kaštelanski zaljev	RUP-4	DE +	DE	DE	DE
	RUP-5	DE +	DE	DE	DE
Kaštel Kambelovac	RUP-6	DE +	DE	DE	DE
	RUP-7	DE +	DE	DE	DE
	RUP-8	DE +	DE	DE	DE
	RUP-9	DE +	DE	DE	DE
Izmirski zaljev (Turska)	RUP-10	DE +	DE	DE	DE
	RUP-11	DE +	DE	DE	DE
	TRD-1	DE +	DE	DE	DE
	TRD-2	DE +	DE	DE	DE
	TRD-3	DE +	DE	DE	DE
Mramorno more (Turska)	TRD-4	DE +	DE	DE	DE
	TRD-5	DE +	DE	DE	DE
	TRP-1	PH +	PH/DE +	PH/DE +	PH/DE +
	TRP-2	PH +	PH/DE +	PH/DE +	PH/DE +
	TRP-3	PH +	PH +	PH +	PH +
	TRP-4	PH +	PH	PH	PH
	TRP-5	PH +	PH	PH	PH

3.2. Analiza molekularnih biljega u turskim populacijama školjkaša *Ruditapes* spp. metodom PCR

Budući da dosad vrste roda *Ruditapes* u hrvatskom dijelu Jadrana nisu analizirane molekularnim metodama, u svrhu pozitivne kontrole u rad je također uvrštena analiza deset jedinki roda *Ruditapes* sakupljenih na području Turske (slika 4b). Na temelju morfoloških karakteristika, pet jedinki sakupljenih na lokaciji Izmirskog zaljeva (nazvanih uzorcima TRD) determinirano je kao vrsta *R. decussatus*, a pet jedinki sakupljenih na obali Mramornog mora (uzorci TRP) okarakterizirano je kao vrsta *R. philippinarum*.

Uistinu, analiza PCR-a mitohondrijskog biljega 16S rDNA za uzorke TRD pokazala je umnažanje odsječka duljine karakteristične za vrstu *R. decussatus* (~520 pb), dok su u uzorcima TRP umnoženi ~550 pb dugi odsjecci karakteristični za vrstu *R. philippinarum* (tablica 5, slika 6a). Daljnja analiza nuklearnih biljega 5S rDNA, ITS1 i ITS2 potvrdila je da elektroforetski profili uzoraka TRD odgovaraju vrsti *R. decussatus* kao i da uzorci TRP-3, TRP-4 i TRP-5 umnažaju fragmente karakteristične za *R. philippinarum* (tablica 5, slika 6b-d). Međutim, u uzorcima TRP-1 i TRP-2 upotrebom početnica PCR-a za 5S rDNA, ITS1 te ITS2 umnoženi su odsjecci karakteristični za obje vrste (slika 6b-d, tablica 5). Istovremeno postojanje različitih odsječaka nuklearnih biljega sugerira da jedinke TRP-1 i TRP-2 predstavljaju križance između vrsta *R. decussatus* i *R. philippinarum*.

Značajno je također primijetiti da su u uzorku TRP-1 upotrebom početnica za ITS1 umnožena čak tri različita odsječka (slika 6c) što ukazuje na povećanu varijabilnost ove regije u jedinki TRP-1.



Slika 6. Elektroforetsko razdvajanje PCR-om umnoženih odsječaka DNA molekularnih biljega 16S rDNA (a), 5S rDNA (b), ITS1 (c) i ITS2 (d) iz jedinki turskih populacija. Nazivi uzoraka označeni su na slici iznad elektroforetskih pruga, dok je znakom * označen položaj elektroforetskog biljega.

3.3. Određivanje i usporedba nukleotidnih sljedova 16S rDNA, 5S rDNA, ITS1 i ITS2 vrsta *R. decussatus* i *R. philippinarum*

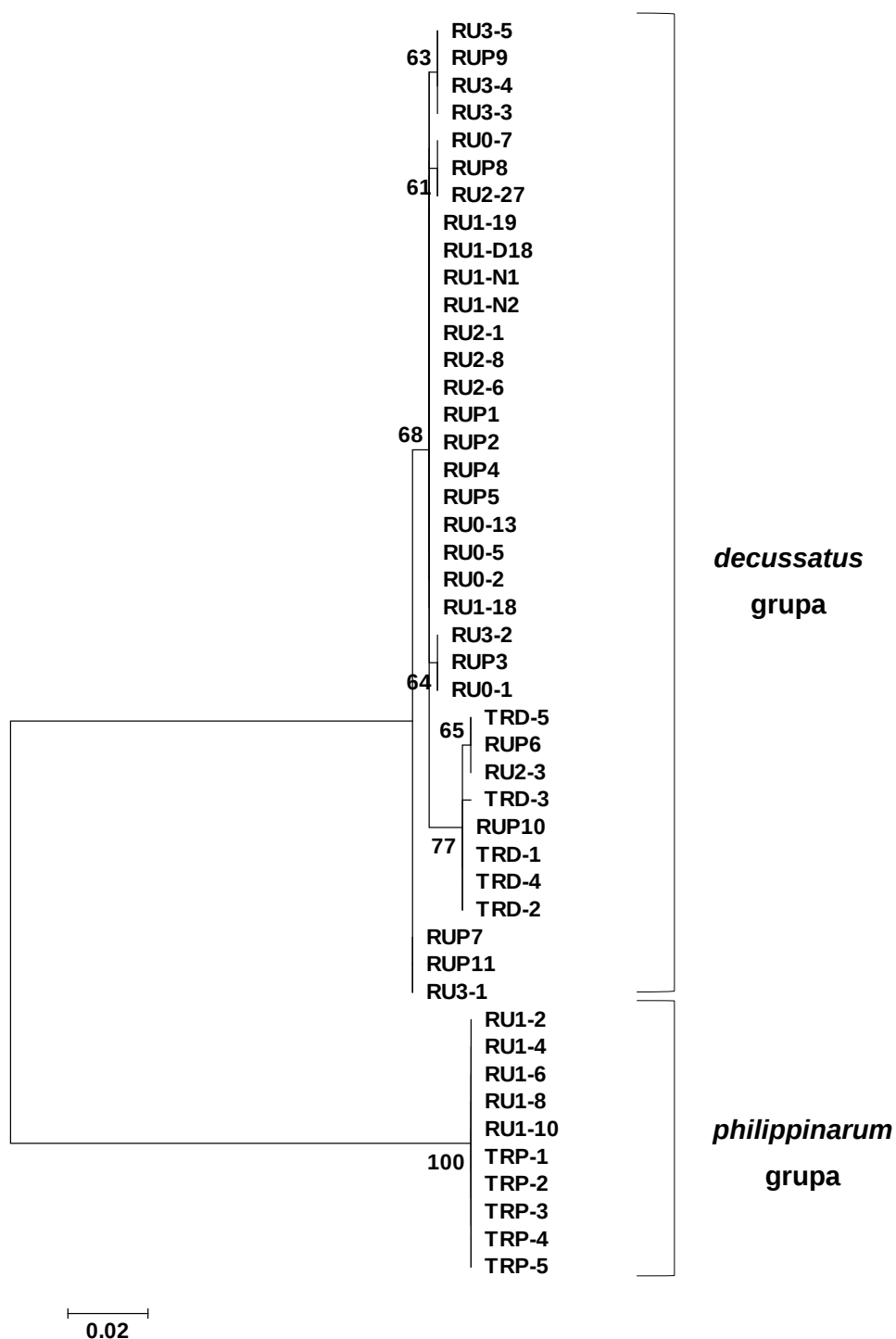
3.3.1. Analiza nukleotidnih sljedova 16S rDNA

Od ukupno 56 jedinki roda *Ruditapes* analiziranih metodom PCR, njih 46 (tablica 5) odabrano je za detaljnu analizu nukleotidnog slijeda biljega 16S rDNA, kako bi se dobio uvid u odnose unutar i između populacija školjkaša sakupljenih na različitim lokalitetima. Budući da su PCR umnažanjem dobiveni specifični jedinstveni produkti, izravno nakon pročišćavanja reakcijske smjese PCR-a na koloni, odsječci 16S rDNA proslijeđeni su na određivanje nukleotidnog slijeda (sekvenciranje).

Po određivanju nukleotidnog slijeda, 36 odsječaka pokazalo je duljinu od 522 pb što odgovara duljini fragmenta vrste *R. decussatus*, a njih deset duljinu od 553 pb karakterističnu za vrstu *R. philippinarum*. Duljine odsječaka određene sekvenciranjem u potpunosti odgovaraju duljinama fragmenata procijenjenim elektroforetskim razdvajanjem. U zapisima nukleotidnih sljedova uklonjene su sekvence početnica (20 pb + 22 pb) te su u daljnjim bioinformatičkim analizama biljega 16S rDNA korišteni odsječci duljina 480 pb odnosno 511 pb.

Na temelju sravnjenja 46 nukleotidnih sljedova (prilog 1, slika P1) izrađena su filogenetska stabla metodama *Maximum Likelihood* (ML), *Neighbor Joining* (NJ) i *Maximum Parsimony* (MP). Sva tri stabla podržala su identičnu topologiju (na slici 7 prikazano je stablo ML), iz koje je vidljivo razvrstavanje odsječaka 16S rDNA u dvije jasno razdvojene grane. Odvajanje dviju grupa podržano je 100%-tnom statističkom vjerojatnošću, a u potpunosti prati razvrstavanje sekvenca prema vrsno-specifičnoj pripadnosti, određenoj na temelju elektroforetskih analiza PCR-a (poglavlje 3.1. i 3.2.). Grupa koju čini 36 odsječaka duljine 480 pb nazvana je grupom *decussatus*, dok je grupa preostalih 10 odsječaka duljine 511 pb proglašena grupom *philippinarum* (slika 7).

U svrhu jednostavnije analize za svaku od grupa izvedena je konsenzus sekvenca (16S PH za jedinke *R. philippinarum*, 16S DE za jedinke *R. decussatus*), a njihova usporedba prikazana je na slici 8. Konsenzusni nukleotidni sljedovi međusobno pokazuju 24,5% nukleotidnih razlika, temeljenih na 91 nukleotidnoj supstituciji (72,3% ukupnih promjena) te 34 insercijska/delecijska događaja (27,7% ukupnih promjena).



Slika 7. Filogenetski odnosi odsječaka 16S rDNA jedinki vrsta *R. decussatus* i *R. philippinarum*, dobiveni metodom *Maximum Likelihood* prema modelu Hasegawa-Kishino-Yano. Brojevi u čvorištu grana predstavljaju postotak stabala koja su podržala prikazanu topologiju u nasumičnoj statističkoj analizi u 1000 navrata (prikazane su samo *bootstrap* podrške koje prelaze 50%).

```

16S PH  GGCTTTTGTAGTATTTAAATAATAAAAAGTCTGGCCTGCCAGTGAG-TATATTAAATGG  59
16S DE  C.....AA.C.....--.....GA.....G.....G.....C..  57

16S PH  CTGCAACGAGAGTTGTACTAAGGTAGCGGATAATTTGTCTCTTAATTAGAGAATGGTAT  119
16S DE  .....T.....GA.....  117

16S PH  GAAGGGTTAGACGTGGGATTATTGTCTCTAAAAAATACAGTTAAGTTTCCTTTTAAATGA  179
16S DE  ...A...CT..T..CAA..T..GC.....G.....G..A..CG.....  177

16S PH  AAAGGTTTAAATTTAT-TAAAAGACGAGAAGACCCTGTCGAGCTTAATTAAATAAAAAAC  238
16S DE  .....G..AA..GA.....A.T.....C..GG..TTT...T  237

16S PH  TAGATATGGTTAAATGAAAAGTGTTAATAGTTTAATTGTTGGCTGAGTTTAAATTGAAG  298
16S DE  .TT..G..-----..G...A..A-----...AA..C..A...  267

16S PH  TTTAGTTGGGGAGAGCTGAGTTTAAGGTAATAAACTTAAGAAATACTAAAGATCCTCTTT  358
16S DE  .G..G.....A....AGA.....AA..C..GTC..TA..T..GG.-G.....C..C  326

16S PH  GAGAGA-AGTTAGCAAAAGCTACCGCAGGGATAACAGCGTAATTCTTTTAAAGAGATCTT  417
16S DE  .G....T..A..G..T.....T.....CT..C..G.....  386

16S PH  ATTGAGGGAAGAGTTTGCACCTCGATGTTGGATTAGAAAACTTTTGGTGTAGCAGCT  477
16S DE  .....AG.....C.....C.....  446

16S PH  AGAAGTTGTAAGACTGTTCTCTTTAATTTTCT  511
16S DE  .AG...A..G.....C....A.....  480

```

Slika 8. Usporedba konsenzusnih nukleotidnih sljedova odsječaka 16S rDNA vrsta *R. philippinarum* (16S PH) i *R. decussatus* (16S DE). 16S PH konsenzus prikazan je punim nukleotidnim sljedom, dok su u 16S DE konsenzusu podudarnosti sa sekvencom 16S PH označene točkama, nukleotidne promjene odgovarajućim slovom, a delecije crticama.

Nadalje, konsenzusni nukleotidni sljedovi uspoređeni su s podacima za DNA pohranjenim u genskoj bazi NCBI GenBank. Pretraživanje baze podataka uz upotrebu algoritma *megablast*, koji osigurava pretraživanje vrlo sličnih sljedova, pokazalo je da konsenzusni sljed 16S DE kao najsirodnije sekvence uz 99-100% sličnosti u bazi pronalazi odsječke 16S rDNA vrste *Ruditapes* (= *Tapes* = *Venerupis*) *decussatus* (prilog 2, slika P2a), dočim se konsenzusni sljed 16S PH 100%-tnom identičnošću povezuje sa odsječcima 16S rDNA vrste *Ruditapes* (= *Tapes* = *Venerupis*) *philippinarum* (prilog 2, slika P2b). Ovime je u konačnici potvrđeno da pet školjkaša sakupljenih na lokaciji Zelene Lagune pripada vrsti *R. philippinarum*, dok svi ostali analizirani primjerci sakupljeni na jadranskoj obali pripadaju vrsti *R. decussatus*.

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 *decussatus* i *philippinarum*. Prosječna udvojena udaljenost za odsječke 16S rDNA između grupa *decussatus* i *philippinarum* iznosi 0,068 (u rasponu od 0 do 0,189). Zanimljivo

je da dvije grupe pokazuju znatno različite vrijednosti za prosječne udvojene vrijednosti promatrane unutar grupa. Naime, za *philippinarum* grupu prosječna vrijednost PD iznosi 0 budući da svih deset jedinki dijele identičnu sekvencu (prilog 1). Zanimljivo je da u grupi *philippinarum* uzorci TRP-1 i TRP-2, koji na temelju analize nuklearnih biljega pripadaju hibridnim jedinkama (poglavlje 3.2.), u analiziranom odsječku 16S rDNA ne pokazuju nukleotidne promjene u odnosu na jedinke izvorne vrste *R. philippinarum* (prilog 1). Za razliku od uzoraka *R. philippinarum*, jedinke vrste *R. decussatus* međusobno se razlikuju u sekvenci 16S rDNA te prosječna vrijednost PD za grupu *decussatus* iznosi 0,005, u rasponu vrijednosti za pojedinačne parove sljedova od 0 do 0,013. U tablici 6 prikazane su udvojene udaljenosti između jedinki *R. decussatus* unutar grupa razvrstanih prema lokacijama sakupljanja. Iz tablice 6 vidljivo je da najveću varijabilnost u analiziranom odsječku 16S rDNA međusobno pokazuju jedinke sakupljene na području Kaštela (Kaštelanskog zaljeva i Kaštel Kambelovca), dok jedinke sakupljene u Zelenoj Laguni dijele identičnu sekvencu odsječka 16S rDNA (PD vrijednost iznosi 0).

Tablica 6. Prosječne udvojene udaljenosti (eng. *pairwise distance*, PD) za odsječke 16S rDNA između jedinki *R. decussatus* unutar grupa razvrstanih prema lokacijama sakupljanja.

lokacija	PD vrijednost	broj analiziranih uzoraka
Tarska vala	0,0017	5
Zelena Laguna	0,0000	5
Medulin	0,0050	5
Trogir	0,0037	5
Paški zaljev	0,0008	5
Kaštelanski zaljev	0,0146	2
Kaštel Kambelovac	0,0083	4
Izmirski zaljev	0,0017	5

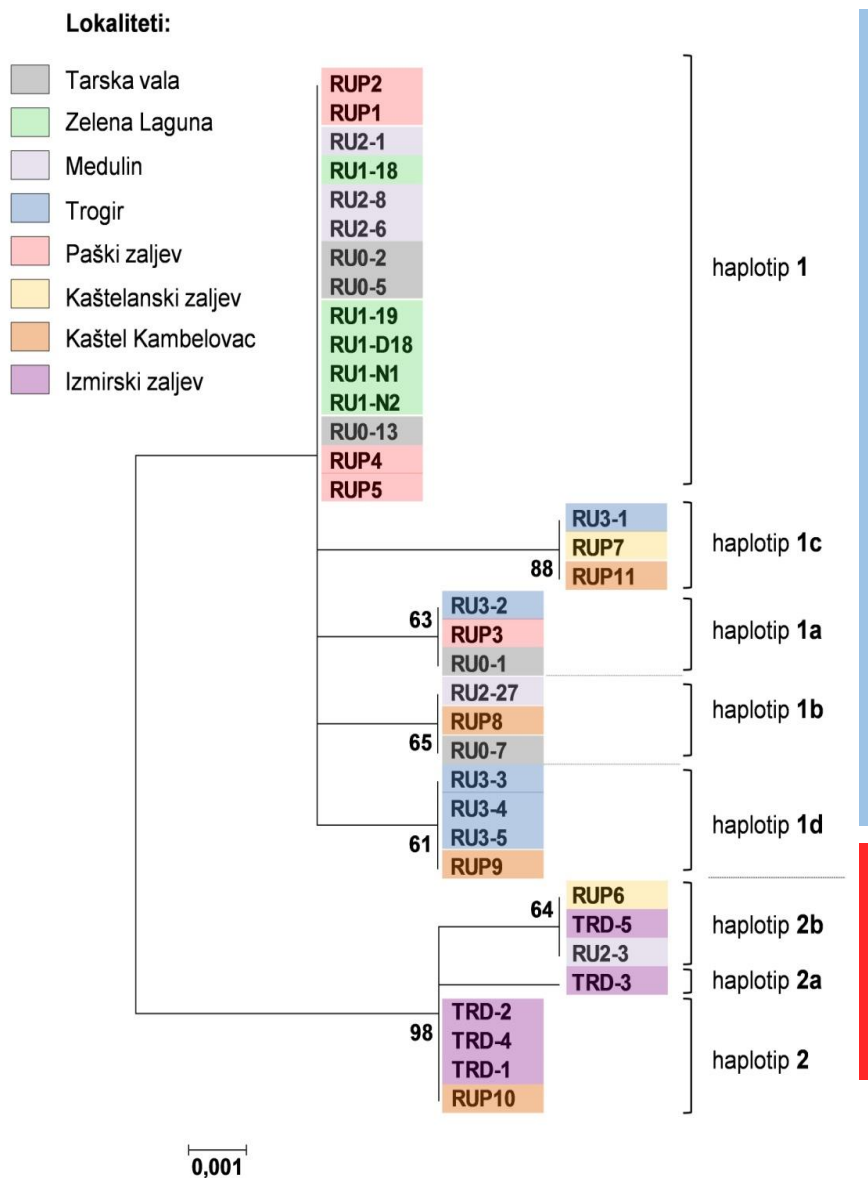
Analiza prosječnih vrijednosti PD između različitih populacija (tablica 7) pokazala je najveću udaljenost između populacija Trogira i Izmiri (Turska). Najmanju međusobnu vrijednost PD od 0,001 pokazale su populacije Tarske vale i Zelene Lagune, dvaju lokaliteta koja su ujedno i zemljopisno najmanje međusobno udaljeni. Međutim, budući da istu vrijednost PD od 0,001 međusobno također pokazuju zemljopisno znatno udaljenije populacije Tarske vale i Paškog zaljeva, ne može se zaključiti da genetičke udaljenosti biljega 16S rDNA koreliraju sa zemljopisnom udaljenošću populacija.

Tablica 7. Prosječne udvojene udaljenosti (eng. *pairwise distance*, PD) za odsječke 16S rDNA između različitih populacija vrste *R. decussatus*, sakupljenih na 8 različitih lokaliteta.

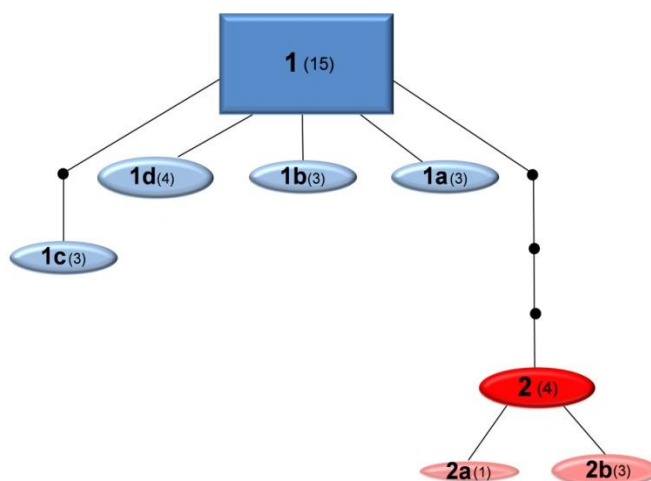
	Tarska vala	Zelena Laguna	Medulin	Trogir	Paški zaljev	Kaštelanski zaljev	Kaštel Kambelovac
Zelena Laguna	0,001						
Medulin	0,003	0,002					
Trogir	0,003	0,002	0,005				
Paški zaljev	0,001	0,000	0,003	0,003			
Kaštelanski zaljev	0,008	0,007	0,008	0,009	0,008		
Kaštel Kambelovac	0,005	0,004	0,006	0,006	0,005	0,008	
Izmirski zaljev	0,010	0,009	0,008	0,012	0,010	0,008	0,009

Kako bi se što zornije prikazali odnosi između odsječaka 16S rDNA jedinki različitih populacija vrste *R. decussatus*, izrađena su filogenetska stabla temeljena na metodama ML, NJ i MP. Sva tri pristupa rezultirala su prikazom stabala koja su se u potpunosti podudarala u svojoj osnovnoj topologiji, a zbog jednostavnosti prikaza u rezultatima je prikazano samo stablo ML (slika 9a). Filogenetsko stablo pokazalo je da se odsječci 16S rDNA vrste *R. decussatus* razvrstavaju u dvije glavne grupe s visokom vrijednošću *bootstrap* podrške od 98%, dok se potom svaka od grupa grana u manji broj podgrupa uz niže *bootstrap* podrške (slika 9a). Pritom je vidljivo da nijedna podgrupa nije sačinjena isključivo od jedinki porijeklom s iste lokacije (slika 9a). Važno je međutim istaknuti da je brojnija grupa, koja sadrži ukupno 28 taksona, sastavljena u cijelosti od jadranskih jedinki, dok se turske jedinice uz nekolicinu jadranskih uzoraka izdvajaju u zasebnu grupu (slika 9a), sugerirajući postojanje dvaju osnovnih haplotipova. Detaljna haplotipska mreža odsječaka 16S rDNA (slika 9b) pokazuje da dominantan haplotip *R. decussatus*, nazvan haplotip 1, uključuje 42% ukupno analiziranih jedinki, koje redom potječu iz područja Istre i Sjeverne Dalmacije. Iz haplotipa 1 izvedena su četiri pothaplotipa, zastupljena s manjim brojem taksona, a također porijeklom s jadranskih lokacija. Turske jedinice uz nekolicinu jadranskih uzoraka s područja Kaštela (2 jedinice) i Medulina (1 jedinka) čine odvedenije haplotipove, svrstane u haplotipsku grupu 2 te iz nje izvedene pothaplotipove 2a i 2b (slika 9a i 9b). Na osnovi ovih analiza moguće je zaključiti da, unatoč postojanju različitih haplotipova promatranog odsječaka 16S rDNA, ne postoji izravna korelacija između pojedinih haplotipova i zemljopisne distribucije pripadajućih jedinki vrste *R. decussatus*.

a)



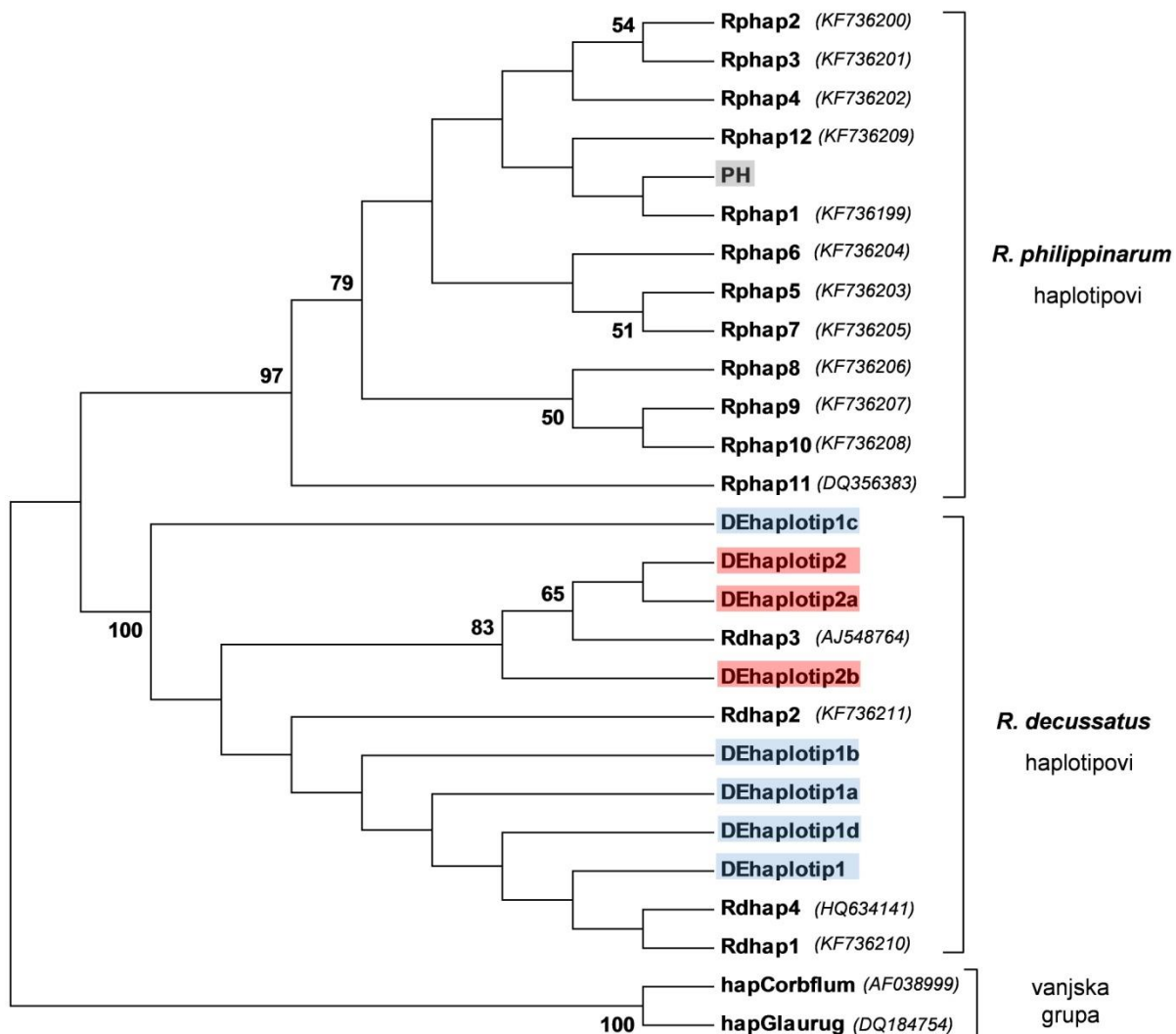
b)



Slika 9. a) Filogenetski odnosi odsječaka 16S rDNA jedinki vrste *R. decussatus* 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 *bootstrap* podrške koje prelaze 50%). Uz stablo su označeni haplotipovi kojima pojedini taksoni pripadaju. **b)** Haplotipska mreža odsječaka 16S rDNA. 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%.

Haplotipovi 16S rDNA vrsta *R. decussatus* i *R. philippinarum*, utvrđeni ovim radom, uspoređeni su s 12 haplotipova vrste *R. philippinarum* i 4 haplotipa vrste *R. decussatus*, koje su definirali Chiesa i sur. (2014), proučavajući europske populacije ovih dviju vrsta. Filogenetski odnosi uspoređenih odsječaka 16S rDNA prikazani su na slici 10 te jasno dokazuju razdvajanje haplotipova u dvije vrsno-specifične grupe. Haplotip utvrđen u jedinkama vrste *R. philippinarum* iz Zelene Lagune (na slici 10 označen kao PH) pripada haplotipu Rphap1 (GenBank pristupni broj KF736199), koji prema analizi autora Chiesa i sur. (2014) predstavlja najrasprostranjeniji europski haplotip vrste *R. philippinarum*, prisutan uz obale Italije, Španjolske i Portugala. Unutar grupe haplotipova koji pripadaju jedinkama vrste *R. decussatus*, i u ovoj analizi vidljivo je izdvajanje podgrupe koja objedinjuje haplotipove 2/2a/2b, a zanimljivo je da im se pridružuje i haplotip Rdhap3 (GenBank broj AJ548764) utvrđen u talijanskom dijelu Jadranskog mora.

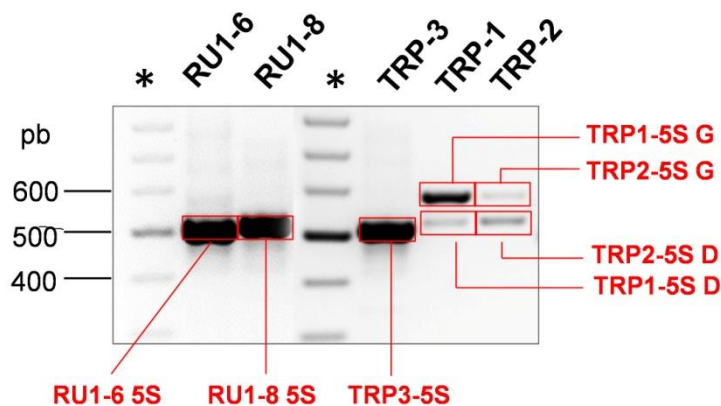


Slika 10. Filogenetski odnosi odsječaka 16S rDNA haplotipova vrsta *R. philippinarum* i *R. decussatus*. Haplotipovi identificirani u ovom radu (PH i DEhaplotip1/1a/1b/1c/1d/2/2a/2b) uspoređeni su s haplotipovima iz rada Chiesa i sur. (2014), a njihovi GenBank pristupni brojevi naznačeni su u zagradama iza naziva taksona. Filogenetsko stablo dobiveno je metodom *Maximum Likelihood* prema Hasegawa-Kishino-Yano modelu uz gamma distribuciju (HKY+G). Brojevi u čvorištu grana predstavljaju postotak stabala koja su podržala prikazanu topologiju u nasumičnoj statističkoj analizi u 1000 navrata (prikazane su samo *bootstrap* podrške koje prelaze 50%).

3.3.2. Analiza nukleotidnih sljedova 5S rDNA

S obzirom da je ovim radom po prvi put utvrđena prisutnost školjkaša *R. philippinarum* u hrvatskom dijelu Jadrana, uz mitohondrijski biljeg 16S rDNA željelo se također provjeriti nukleotidnu sekvencu jezgrinih biljega 5S rDNA. Uzorci RU1-6 i RU1-8 uvršteni su u analizu kao predstavnici jadranskih jedinki vrste *R. philippinarum*, a kao pozitivna kontrola u ispitivanje je uključena turska jedinka TRP-3. U analizu su također uvršteni i turski uzorci TRP-1 i TRP-2, za koje se na temelju elektroforetskog razdvajanja jezgrinih biljega (slika 6b-d) pretpostavilo da predstavljaju križance odnosno hibridne jedinke između vrsta *R. decussatus* i *R. philippinarum*.

Nakon umnažanja PCR-om i elektroforetskog razdvajanja, amplificirani fragmenti su pročišćeni iz agaroznog gela te im je sekvenciranjem određen nukleotidni slijed. Iz uzoraka RU1-6, RU1-8 i TRP-3 izolirani su jedinstveni fragmenti procijenjene duljine 530 bp, dok su u slučaju uzoraka TRP-1 i TRP-2 izolirana po dva fragmenta: takozvani gornji (označen sufiksom „G“) približne duljine oko 590 bp, te kraći, donji (označen kao „D“) približne duljine oko 530 bp (slika 11).



Slika 11. Prikaz elektroforetskog razdvajanja odsječaka 5S rDNA umnoženih u jedinkama roda *Ruditapes* spp. Nazivi uzoraka označeni su na slici iznad elektroforetskih pruga, dok je znakom * označen položaj elektroforetskog biljega. Crvenim pravokutnicima označeni su izolirani i sekvencirani fragmenti, čiji je naziv na slici istaknut crvenim slovima.

Sravnjenje 7 sekvenciranih odsječaka 5S rDNA (slika 12) istaknulo je tri grupe fragmenata, jednostavno razlučivih duljinom. Najkraći od njih, duljine 522 pb, pripadaju jedinkama RU1-6, RU1-8 i TRP-3, međusobno su 100% identični (slika 12), a u NCBI GenBank bazi podataka najrodnijom (97% sličnosti) pronalaze sekvencu odsječaka 5S rDNA okarakteriziranog u vrsti

R. philippinarum (prilog 3, slika P3a). Drugu skupinu čine TRP1-5S D i TRP2-5S D, kraći fragmenti hibridnih jedinki, duljine 530 bp, također međusobno identični (slika 12), a koji također najsrodnijom (uz 96% sličnosti) u genskoj bazi pronalaze sekvencu odsječka 5S rDNA vrste *R. philippinarum* (prilog 3, slika P3b). Prema tome evidentno je da obje grupe predstavljaju sekvence karakteristične za vrstu *R. philippinarum*. Međutim, zanimljivo je da se ove homologne sekvence razlikuju u 8 pb dugoj inserciji (slika 12), koja bi mogla predstavljati dijagnostičku razliku između odsječka 5S rDNA porijeklom iz hibridnih jedinki u odnosu na odsječke 5S rDNA porijeklom iz „klasičnih“ jedinki vrste *R. philippinarum*. Treća grupa sekvenci odnosi se na TRP1-5S G i TRP2-5S G, gornje fragmente hibridnih jedinki, duge 593 pb. Premda identični duljinom, ovi su sljedovi međusobno različiti 4 %, a važno je istaknuti da se razlike temelje na 24 nukleotidne supstitucije prisutne isključivo u području neprepisujuće regije (eng. *non-transcribed spacer*, NTS) (slika 12). Usporedba ovih sljedova s podacima u genskoj bazi NCBI GenBank pokazala je da ove sekvence duljinom i nukleotidnim slijedom (99% sličnosti) odgovaraju odsječcima 5S rDNA vrste *R. decussatus* (prilog 3, slika P3c).

Treba naglasiti da je ovom molekularnom analizom također pokazano da se proučavani biljeg 5S rDNA između vrsta *R. decussatus* i *R. philippinarum* prvenstveno razlikuje u dijelu sekvence koja čini regiju NTS, dok je regija samog gena 5S rRNA prilično sačuvana i između dviju vrsta razlikuje se tek u dvije C $\leftrightarrow$ T tranzicije (slika 12). Time je dodatno potvrđena opravdanost da se pri proučavanju biljega 5S rDNA, uz upotrebu početnica za gen 5S rRNA, u analizu uključi regija koja ga okružuje jer upravo ona svojom varijabilnošću u sastavu i duljini nukleotidnog slijeda omogućava jednostavno razlikovanje vrsta.

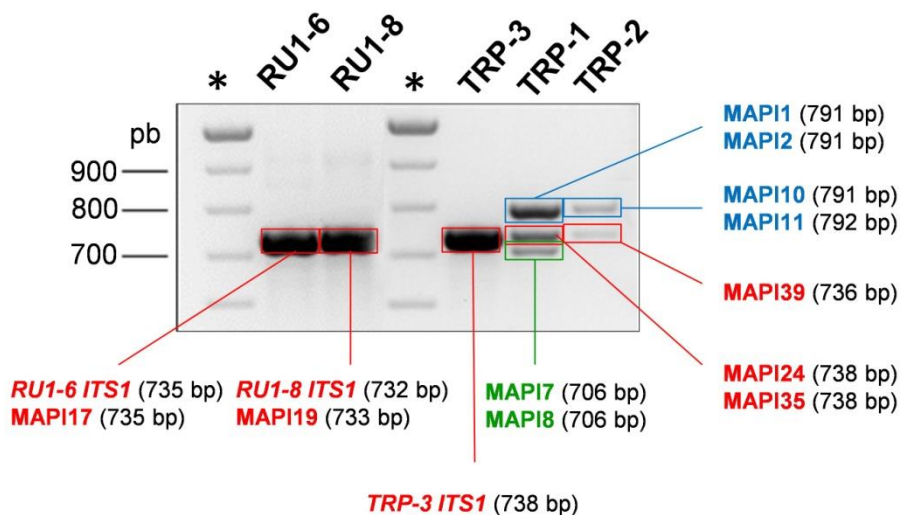
Zaključno, molekularna analiza odsječaka 5S rDNA potvrdila je da jadranske jedinke RU1-6 i RU1-8 pripadaju vrsti *R. philippinarum*, kao i da turske jedinke TRP-1 i TRP-2 uistinu predstavljaju križance vrsta *R. philippinarum* i *R. decussatus*, koji u svom genomu nose odsječke 5S rDNA karakteristične za obje vrste.

	10	20	30	40	50	60	70	80	
RU1-6 5S	aacac	cggtt	ctctg	tcgga	accca	agttta	agca	acgtcg	agcccggtcag
RU1-8 5S									80
TRP3-5S									80
TRP1-5S D									80
TRP2-5S D									80
TRP1-5S G									80
TRP2-5S G									80
	90	100	110	120	130	140	150	160	
RU1-6 5S	ccgggtg	cagtaga	cattttg	catattt	tatttcc	act-----	gaa-----	gaatgcg	tttgctcg
RU1-8 5S									137
TRP3-5S									137
TRP1-5S D									137
TRP2-5S D									137
TRP1-5S G									159
TRP2-5S G									159
	170	180	190	200	210	220	230	240	
RU1-6 5S	ttccctttt	ggcagc	acggcct	cta-gtt	tacggat	ttcgctt	attt---ttt	attcaca	aatatg
RU1-8 5S									213
TRP3-5S									213
TRP1-5S D									213
TRP2-5S D									213
TRP1-5S G									239
TRP2-5S G									239
	250	260	270	280	290	300	310	320	
RU1-6 5S	at---	tgagcc	tgcaag	ct---tt	ac---	attt	gtct-acg	cta---ca	ataa---cg
RU1-8 5S									272
TRP3-5S									272
TRP1-5S D									272
TRP2-5S D									272
TRP1-5S G									319
TRP2-5S G									319
	330	340	350	360	370	380	390	400	
RU1-6 5S	cgcatcag	ccgta	actag	gcaaac	gcggt	gtattt	tacgt	cat-taca	a---cg
RU1-8 5S									345
TRP3-5S									345
TRP1-5S D									345
TRP2-5S D									345
TRP1-5S G									399
TRP2-5S G									399
	410	420	430	440	450	460	470	480	
RU1-6 5S	cgctgtg	tctct---tg	acgtg	acgtc	actct	at-tgt	caat-tac	gttggt	atttggc
RU1-8 5S									415
TRP3-5S									415
TRP1-5S D									423
TRP2-5S D									423
TRP1-5S G									475
TRP2-5S G									475
	490	500	510	520	530	540	550	560	
RU1-6 5S	gtatgc	acgtac	gccag	tagag	cggcg	tattg	ccgaa	ataaat	gtacgc
RU1-8 5S									490
TRP3-5S									490
TRP1-5S D									498
TRP2-5S D									498
TRP1-5S G									554
TRP2-5S G									554
	570	580	590						
RU1-6 5S	-----	atgct	actgat	gctct	acg	accat	atcac	ggttg	522
RU1-8 5S									522
TRP3-5S									522
TRP1-5S D									530
TRP2-5S D									530
TRP1-5S G									593
TRP2-5S G									593

Slika 12. Nukleotidni sljedovi odsječaka 5S rDNA umnoženih iz uzoraka RU1-6, RU1-8, TRP-1 te hibridnih jedinki TRP-2 i TRP-3. Sivo je osjenčan nukleotidni slijed gena 5S rRNA, dok ostatak pripada nepripisujućem odsječku (eng. *non-transcribed spacer*, NTS). Položaj početnica PCR-a označen je malim slovima u kurzivu unutar strelica. Crveno osjenčani dijelovi označavaju umetnuti odsječak karakterističan za hibridne jedinke.

3.3.3. Analiza nukleotidnih sljedova ITS1

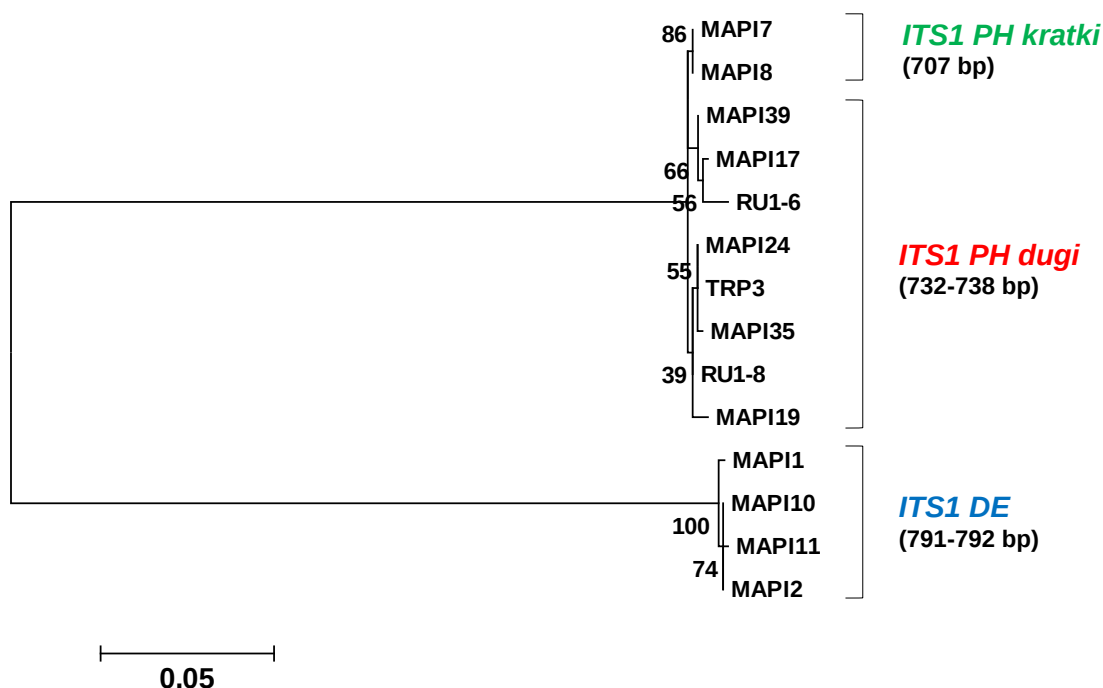
U molekularnoj analizi biljega ITS1, kao i u slučaju analize odsječaka 5S rDNA, obrađeni su uzorci dviju jadranskih jedinki RU1-6 i RU1-8, kao i tri turske jedinke TRP-1, TRP-2 i TRP-3. Nakon umnažanja PCR-om i elektroforetskog razdvajanja, iz agaroznog gela izolirano je ukupno 8 fragmenata, označenih na slici 13.



Slika 13. Prikaz elektroforetskog razdvajanja odsječaka ITS1 umnoženih u jedinkama roda *Ruditapes* spp. Nazivi uzoraka označeni su na slici iznad elektroforetskih pruga, znakom * označen je položaj elektroforetskog biljega, a pravokutnicima izolirani i klonirani fragmenti. Imena skupno sekvenciranih fragmenata napisana su kurzivom, dok su prefiksom MAPI označeni klonirani i sekvencirani odsječci porijeklom iz označenih fragmenata. Boja naziva sekvenciranih fragmenata odgovara grupama sekvenca označenim na filogenetskom stablu slike 14. Duljina sekvenciranih fragmenata navedena je u zagradi iza naziva sekvence.

Jedinstveni fragmenti iz uzoraka RU1-6, RU1-8 i TRP-3 izravno su sekvencirani. Međutim, u slučaju uzoraka TRP-1 i TRP-2 zbog neposredne blizine donjih bendova (kod uzorka TRP-1), odnosno malog prinosa umnožene DNA (u uzorku TRP-2) izolirani fragmenti su prvo klonirani te potom sekvencirani. Klonirani su također i fragmenti jadranskih jedinki RU1-6 i RU1-8 kako bi se utvrdilo koliko nukleotidni sljedovi pojedinih klonova eventualno odstupaju od nukleotidnog slijeda određenog skupnim sekvenciranjem fragmenata.

Ukupno je određeno 14 sljedova ITS1, čije je sravnjenje prikazano u prilogu 4 (slika P4). U izvedenom filogenetskom stablu (slika 14) tri su skupine podržane *bootstrap* vrijednostima većim od 85%.



Slika 14. Filogenetski odnosi odsječaka ITS1 jedinki roda *Ruditapes*, dobiveni *Maximum Likelihood* metodom prema Tamura-3-parametarskom modelu. Brojevi u čvorištu grana predstavljaju postotak stabala koja su podržala prikazanu topologiju u nasumičnoj statističkoj analizi u 1000 navrata. Uz stablo su označene tri skupine u koje se odsjecci svrstavaju uz *bootstrap* vrijednosti veće od 85%, a iza naziva skupina u zagradama su navedene duljine sljedova koji ih čine.

Prvu grupu čine dva klon, MAPI7 i MAPI8 (slika 14), duljine 707 pb te identičnog nukleotidnog slijeda (prilog 4, slika P4). Klonovi su porijeklom iz najkraćeg fragmenta ITS1 turskog uzorka TRP-1 (na slici 13 označenog zelenom bojom). U bazi podataka NCBI GenBank uz 99% sličnosti najrodniji su im odsjecci regije ITS1 vrste *R. philippinarum* (prilog 5, slika P5a), te je ova skupina, kao i predstavnička joj konsenzusna sekvenca (slika 15), nazvana *ITS1 PH kratki* (slika 14).

Drugu grupu odsječaka ITS1 čine fragmenti izolirani iz svih pet analiziranih uzoraka, prosječne duljine 735 pb (na slici 13 označeni crvenom bojom). Preciznije, osam sekvenciranih odsječaka ove grupe, varira u svojoj duljini od 732 do 738 bp (slike 13 i 14), dok se u nukleotidnim sljedovima prosječno razlikuju 0,04%. Važno je istaknuti da je u analizi sekvenca ove grupe, usporedbom odsječaka RU1-6 ITS1 i MAPI17 (međusobne sličnosti 99,2%), odnosno odsječaka RU1-8 ITS1 i MAPI19 (međusobne sličnosti 99,6%), utvrđeno da nema značajnije razlike između grupno sekvenciranih fragmenata i pripadajućih kloniranih odsječaka.

		10	20	30	40	50	60	70	80	
ITS1 PH dugi										
ITS1 PH kratki		GGAAGTAAAGTCGTAACAAGGTATCCGTAGGTGAACCTGCGGATGGATCATTAC								66
DE										66
										80
										
ITS1 PH dugi		90	100	110	120	130	140	150	160	
ITS1 PH kratki		AGACTGCCGGCAGATCCCGCCCTGGCCAGTCTCTAACTAATCTTGAA								137
DE										137
		T.TGCATT.ATC...GAGAT.A..A.A.AAAAAA...AACGCACAA..GTT..TTTTT.A....A.AG.ACACGGG...								160
										
ITS1 PH dugi		170	180	190	200	210	220	230	240	
ITS1 PH kratki		GCGTGCCTAATAAAAAAC--GTCGACCCAGCAGCA--CCCGGGT-CTAC--GGGCTGCCCCGGCGCGGAT								200
DE										199
		.T.....C.TCCA.CTC...GA.C.G.AGGCCGT...T.CA..G.AGAACG..A.G..G.....A.A..								240
										
ITS1 PH dugi		250	260	270	280	290	300	310	320	
ITS1 PH kratki		--TGGCCACCGCTG--CCGGAAGTGGG--CACCAGTGGGG--CTGCTGCTGGAAAAAGTCG								256
DE										254
		GTC..GG..G..CCGGT.TC.T.C..A.TGGTGTTA..T...CCT...CGAGACGCACAGTCT...G..G.GCGA...								320
										
ITS1 PH dugi		330	340	350	360	370	380	390	400	
ITS1 PH kratki		--GGAGCCGTCCGCCAGAGGTGATTCCACCCAGGACAGTGGCTCT--CGCAGCGCCGTGGGGTGCCG-GCGGTGAGG								330
DE										328
		AT.C...G.CG.CA.GT.C...GC-.T.G..G....GC.CC..TCGAA...G.AAG.ACAC..C.A..T.T.CCTA.TA								399
										
ITS1 PH dugi		410	420	430	440	450	460	470	480	
ITS1 PH kratki		ACCCTCGAATC-----GCTCCCTTTGGCCGGGAGCGAGGAACGGTCCCGGAC--CTAGTTCCGTTGCCGAT-GCT								398
DE										396
		.A.A...TG.TTATGGGGT...GG..G.T..TCTCG...T.CC.C.A..G.AC.GG..G.GG.T..GCGT.C.A...								479
										
ITS1 PH dugi		490	500	510	520	530	540	550	560	
ITS1 PH kratki		GCTCGGAA--CGACGCCGGCCGCAAGGCGATCTTCCCCCTGCCGGGAAAAGCGCCCTCTTCCCGTCTCTT--CG								471
DE										469
		A.A...GGGCTCT..TC.GA..G.....G.....TC.....G.G..T.TTCT.T..TCA..								559
										
ITS1 PH dugi		570	580	590	600	610	620	630	640	
ITS1 PH kratki		GAGACGGGATTGCGCCCTCCTCAAAGCGTACACCA--ACGTTTTGCGGGCGTCGCGGAGGAAAACAACGGGGGAGAGA								549
DE										536
		A...GA..GC.....TTG..G.A..C.....GTG.T.....AGAG.A...C...G.GG-----								625
										
ITS1 PH dugi		650	660	670	680	690	700	710	720	
ITS1 PH kratki		GAGGAGACTCTTCCCTTCCCTAGTGGTTAGTACTCCGCGCTTGAACGCGT--GACTCTGTATCCGGGCTCTCTCGGGAGA								627
DE										595
		-----A.....								682
		-----CGAGA..CTC-.C...ACT...C...T.AA..C.....								
										
ITS1 PH dugi		730	740	750	760	770	780	790	800	
ITS1 PH kratki		CAGAGCGCAGGACTTCCGCCCTGTGTGCGGGGCGGTGCACACCTGTTTCAGAAATCTGAGA								707
DE										675
		.G.GT.....T.....A.....								760
										
ITS1 PH dugi		810	820	830						
ITS1 PH kratki		CTCGGCTCGTGCATCGATGAAGAACGCAGC								738
DE										706
										791

Slika 15. Usporedba konsenzusnih nukleotidnih sljedova odsječaka ITS1 vrsta roda *Ruditapes*. Prva navedena sekvenca prikazana je punim nukleotidnim sljedom; u preostalim sekvencama slovima su označene promjene u odnosu na prvu zapisanu sekvencu, točke predstavljaju podudarnost, a crtice označavaju delecije unutar pojedinih sekvencu. Regija gena 18S rRNA osjenčana je sivo, regija gena 5.8S rRNA obojana je zeleno, a segment između njih čini regiju ITS1.

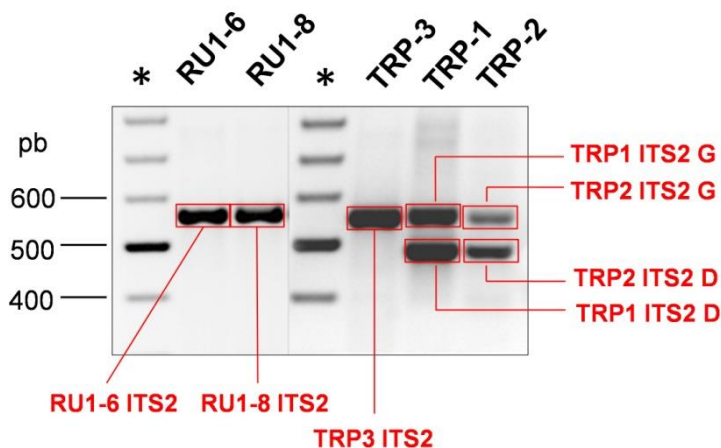
Konsenzus sekvenca odsječaka ove grupe u bazi NCBI GenBank uz 99% sličnosti nukleotidnog slijeda odgovara regijama ITS1 vrste *R. philippinarum* (prilog 5, slika P5b) te je stoga ova grupa, kao i pripadajuća joj konsenzus sekvenca (slika 15), nazvana *ITS1 PH dugi* (slika 14). Budući da sljedovi *ITS1 PH kratki* i *ITS1 PH dugi* pokazuju podjednaku sličnost s sljedovima ITS1 vrste *R. philippinarum* pohranjenim u NCBI GenBank bazi, može se pretpostaviti da predstavljaju dvije alternativne verzije regija ITS1 u genomu vrste *R. philippinarum*. U uzorcima analiziranim u ovom radu slijed *ITS1 PH dugi* jest zastupljenija varijanta, no za stvaranje generalnog zaključka trebalo bi provesti detaljniju analizu na znatno većem broju ispitanih uzoraka. Inače, sljedovi *ITS1 PH kratki* i *ITS1 PH dugi* međusobno se razlikuju u 4,7% nukleotidne sekvence, čemu ponajprije doprinosi 30 pb dug indel (prilog 6, slika P6).

Treću i k tome najbolje odvojenu grupu odsječaka ITS1, nazvanu *ITS1 DE*, a podržanu s 100%-tnom *bootstrap* vrijednošću (slika 14), čine četiri sekvence najdužih fragmenata hibridnih turskih uzoraka TRP-1 i TRP-2 (plavo označeni odsječci na slici 13). Sljedovi su dugi 791 pb (klonovi MAPI1/2/10) odnosno 792 pb (klon MAPI11), a međusobno pokazuju čak 99,8% sličnosti. Izvedena konsenzus sekvenca *ITS1 DE* (slika 15) u pretraživanju genske baze NCBI GenBank najveću sličnost (99%) pronalazi u sekvencama ITS1 porijeklom iz vrste *R. decussatus* (prilog 5, slika P5c). Time je potvrđeno da turske jedinice TRP-1 i TRP-2, prema morfološkoj identifikaciji i analizi odsječaka 16S rDNA okarakterizirane kao vrsta *R. philippinarum*, u svom genomu posjeduju također regije ITS1 karakteristične za vrstu *R. decussatus*.

Iz usporedbe konsenzusnih nukleotidnih sljedova *ITS1 PH dugi*, *ITS1 PH kratki* i *ITS1 DE* (slika 15) vidljivo je da u analizi odsječaka ITS1 razlika između pojedinih vrsta proizlazi iz dijela sekvence koja zahvaća isključivo regiju ITS1, dok su odsječci gena za 18S rRNA i 5.8S rRNA, koji je omeđuju, u potpunosti sačuvani. Nukleotidne razlike u regiji ITS1 od 39.1% (između sljedova *ITS1 PH kratki* i *ITS1 DE*) odnosno 40.7% (između sljedova *ITS1 PH dugi* i *ITS1 DE*) čine regiju ITS1 pouzdanim molekularnim biljegom u identifikaciji školjkaša roda *Ruditapes*.

3.3.4. Analiza nukleotidnih sljedova ITS2

U analizi biljega ITS2 također su proučene jadranske jedinke RU1-6 i RU1-8 te turske jedinke TRP-1, TRP-2 i TRP-3. Nakon umnažanja PCR-om i elektroforetskog razdvajanja, iz agaroznog gela izolirano je ukupno 7 fragmenata, označenih na slici 16. Fragmenti su skupno sekvencirani, a sravnjenje njihovih nukleotidnih sljedova prikazano je u prilogu 7 (slika P7).



Slika 16. Prikaz elektroforetskog razdvajanja odsječaka ITS2 umnoženih u jedinkama roda *Ruditapes* spp. Nazivi uzoraka označeni su na slici iznad elektroforetskih pruga, dok je znakom * označen položaj elektroforetskog biljega. Crvenim pravokutnicima označeni su izolirani i sekvencirani fragmenti, čiji je naziv na slici istaknut crvenim slovima.

Nukleotidni sljedovi odsječaka ITS2 jedinki RU1-6, RU1-8, TRP-3 te dužih, „gornjih“ odsječaka uzoraka TRP-1 i TRP-2, pojedinačnih duljina od 556 pb do 562 pb (prilog 7, slika P7), međusobno prosječno slični 97,7%, pripadaju istoj grupi. Iz ove grupe izvedena konsenzus sekvenca, nazvana ITS2 PH (slika 17), u bazi NCBI GenBank sparuje se uz 99%-tnu sličnost s regijama ITS2 vrste *R. philippinarum* (prilog 8, slika P8a).

Drugu grupu, nazvanu ITS2 DE, čine kraći, „donji“ fragmenti hibridnih jedinki TRP-1 i TRP-2 (slika 16; prilog 7, slika P7). Fragmenti duljine 488 pb međusobno su identični, a od podataka pohranjenih u bazi NCBI GenBank pronalaze najsrodnijima odsječke ITS2 vrste *R. decussatus* pokazujući 99% sličnosti u sekvenci (prilog 8, slika P8b).

Na temelju usporedbe konsenzusnih sljedova ITS2 PH i ITS2 DE (slika 17) utvrđeno je da između sljedova ITS2 vrsta *R. philippinarum* i *R. decussatus* postoji 35.8% razlika. Kao i u slučaju biljega ITS1, razlike se nalaze u dijelu sekvence koja pripada regiji ITS2, dok su dijelovi

omeđujućih 5.8S i 28S rRNA gena potpuno sačuvani između dviju vrsta (slika 17; prilog 7, slika P7).

Analizom biljega ITS2, uz prethodne analize biljega 5S rDNA i ITS1, potvrđeno je da turske jedinke TRP-1 i TRP-2 uistinu predstavljaju križance između kongeneričnih vrsta *R. decussatus* i *R. philippinarum*, ujedinjujući u svom genomu kromosomske garniture porijeklom iz dviju vrsta.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
ITS2 PH	GCATCGATGAAGAACGCAGCTGCGTGAATTAATGTGAATTGCAGGACACACTGAACATCGACACCTTGAACGCACATTGCGGCTCT									90
ITS2 DE										90
	100	110	120	130	140	150	160	170	180	
ITS2 PH	GGCTCACTGCCAGAGCCACGCCCTGTCCGAGGGTCGGGGAACAAGTCATCGGCTCTCACTATTCGTGAGGG-----GCGAGTTGGCGC									172
ITS2 DE	A.A...CAAAG.GA...C.A..T.CATATTGCTT...C.....T									180
	190	200	210	220	230	240	250	260	270	
ITS2 PH	GTCGCGCGGGCTTTCGTCCCGCTCGTCCGCGTAGATTCCAGCCTCTCTGCGCGTCAACAGTCGCTGGAAGTGGCGCGGAGACAGG									262
ITS2 DE	T.....CA-.A..A.....A...C.T.....-----GG.G.C..ACC..G.....G.....									261
	280	290	300	310	320	330	340	350	360	
ITS2 PH	GCTCGAACGGGCCCGCAGTCCCGCTCCGCGTCTCTTACCGGAGGGCGGCTTCCGTGCGGCGTCGTCGCGGCAAAAGCGAGAGAG									352
ITS2 DE	TT.-T...TG..G.....-----CT...CT.G...									311
	370	380	390	400	410	420	430	440	450	
ITS2 PH	AGCGGCGAAGGACGGGTCTAGCCAGCCCGGCCCGAGCCGAAACCGGAGACGCGGGGAGACAGGCCGACTGACGACGACGACTCCAGCGA									442
ITS2 DE	G.....CCTCTG.C..CT.CCGTTA...A...T-----TGT.GT...GA.G.....-----GC.G..GT..-----A.-									382
	460	470	480	490	500	510	520	530	540	
ITS2 PH	TGGGGTCCGAGTCCGATGACGCCGCTCAACCCCGCACCACCTCCAAAAAATTCA									532
ITS2 DE	-----...AG..AG..AG..TT..ACTG-TG.T...GTG..AG..GCTC.-CCT.....									464
	550	560								
ITS2 PH	TTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA									556
ITS2 DE										488

Slika 17. Usporedba konsenzusnih nukleotidnih sljedova ITS2 PH i ITS2 DE. Konsenzus ITS2 PH prikazan je punim nukleotidnim sljedom, dok su u sljedu ITS2 DE slovima označene promjene u odnosu na ITS2 PH; točke predstavljaju podudarnost, a crtice označavaju delecije. Regija gena 5.8S rRNA osjenčana je sivo, regija gena 28S rRNA obojana je zeleno, a segment između njih čini regiju ITS2.

4. RASPRAVA

Kućica *R. decussatus* je autohtona vrsta u Jadranskom moru, a zbog izrazito kvalitetnog mesa spada u grupu gospodarski važnih i vrlo traženih školjkaša u Hrvatskoj. Dosad su u literaturi zabilježeni podaci o starosti, uzgoju i indeksu kondicije ove vrste u hrvatskom dijelu Jadrana (Jurić i sur. 2012). U ovom su radu po prvi put analizirane hrvatske populacije vrste *R. decussatus* upotrebom molekularnih biljega DNA. Analizom mitohondrijskog biljega 16S rDNA u 7 prirodnih populacija s područja zapadne obale Istre te Sjeverne i Srednje Dalmacije, utvrđeno je 7 različitih haplotipova 16S rDNA, koji međutim ne ukazuju na izravnu korelaciju između pojedinih haplotipova i lokaliteta. Povećani broj različitih haplotipova unutar istog lokaliteta objašnjiv je dugovremenskom prisutnošću vrste *R. decussatus* na ovim prostorima. Rezultat analize jadranskih populacija sukladan je opažanju da genetička varijabilnost prvenstveno proizlazi iz razlika unutar populacija, kao što je to utvrđeno analizom mitohondrijskih haplotipskih frekvencija unutar mediteranskih populacija vrste *R. decussatus* (Gharbi i sur. 2010).

U sklopu analize jadranskih populacija *Ruditapes* spp., na lokalitetu Zelene Lagune u blizini grada Poreča utvrđena je prisutnost alohtone vrste *R. philippinarum*, što ujedno predstavlja i prvo zabilježeno pojavljivanje ove vrste u hrvatskim vodama. Vrsta *R. philippinarum* unesena je u talijanske vode područja Venecijanske lagune u svrhu akvakulturne proizvodnje kako bi se kompenzirao slabiji prirast autohtone vrste *R. decussatus* (Pranovi i sur. 2006). Nakon početnog unosa, invazivna se vrsta dobrom prilagodljivošću i brzim rastom uspješno proširila okolnim uvalama talijanske obale kolonizirajući staništa autohtone vrste (Zentilin 1990, Carrieri i sur. 1992, Breber 2002). Invazivni školjkaš *R. philippinarum* postupno se proširio i Tršćanskim zaljevom te je 2012. godine zabilježen također i u Piranskom zaljevu (Lipej i sur. 2012). Budući da se lokalitet Zelene Lagune nalazi svega 100-tinjak kilometara zračnom linijom udaljen od lokaliteta izvornog unosa vrste *R. philippinarum* u sjeverni Jadran, logičnim se nameće zaključak da izvorište hrvatske populacije ovog invazivnog školjkaša čine upravo talijanske populacije. U slučaju širenja vrste *R. philippinarum* u hrvatski dio Jadrana malo je vjerojatno da je unos tekao prirodnim putem. Naime, prirodno širenje vrste *R. philippinarum* odvija se kretanjem ličinki, nošenih vjetrom i morskim strujama (Ponurovski 2008). Međutim, na rasprostranjivanje školjkaških ličinki duž hrvatske obale prvenstveno utječe istočna morska struja (Dulčić i Grbec 2000), koja ima smjer kretanja obrnut smjeru

potencijalnog prirodnog unosa ličinki *R. philippinarum* u hrvatski dio Jadrana. Također, dugi potezi stjenovite zapadnoistarske obale s velikom vjerojatnošću ometaju prirodno širenje ličinki, djelujući poput zemljopisnih brana. Od prirodnog širenja, puno je vjerojatniji scenarij ljudskog namjernog posredovanja pri unosu vrste *R. philippinarum* sa svrhom nadomjeska nedovoljne produkcije autohtone vrste *R. decussatus* i zadovoljavanja gastronomske potražnje, posebice tijekom turističke sezone. Navedene vrste čest su predmet marketinških prevara na gastronomskom tržištu pa se tako, primjerice, u Italiji obje vrste prodaju pod komercijalnim nazivom „Vongola verace“, unatoč činjenici da je tržišna cijena vrste *R. decussatus* trostruko veća od cijene vrste *R. philippinarum* (Costa i sur. 2010). Premda se ne može sa sigurnošću tvrditi koji je bio vektor unosa vrste *R. philippinarum* u područje hrvatskih voda, činjenica da haplotip 16S rDNA zelenolagunske populacije odgovara haplotipovima zabilježenim u Venecijanskoj i Marano laguni (Passamonti i sur. 2003, Chiesa i sur. 2014), govori u prilog ideji da izvoriste predstavlja sjevernotalijanska populacija. Treba, međutim, naglasiti da zelenolagunska populacija pripada najrasprostranjenijem europskom *R. philippinarum* haplotipu, koji je raširen i izvan Mediteranskog mora (Hurtado i sur. 2011, Chiesa i sur. 2014). U svakom slučaju, uniformnost zelenolagunske populacije, u kojoj sve analizirane jedinke dijele identičnu sekvencu 16S rDNA, sugerira recentan unos ove vrste. Uniformnost i niska genetička varijabilnost uočena je i kod ostalih morskih invazivnih vrsta u prvoj fazi njihovog prodora u novo područje, kao što je zabilježeno u slučajevima invazivnog školjkaša *Mytilus galloprovincialis* (Zardi i sur. 2007) te invazivne rakovice *Carcinus maenas* (Darling i sur. 2008).

Prodiranje alohtone vrste *R. philippinarum* u hrvatske vode moglo bi potencijalno utjecati na bioraznolikost spomenutog područja kroz dva aspekta. Prvi se odnosi na činjenicu da među beskralješnjacima školjkaši pripadaju kategoriji najinvazivnijih vrsta, čije uspješno širenje može biti pogubno za autohtone vrste (Sousa i sur. 2009). Vrsta *R. philippinarum* ubraja se među 100-tinjak najopasnijih invazivnih organizama u Mediteranskom moru (Streftaris i Zenetos 2006), a njezin negativan utjecaj na populacije autohtonog školjkaša *R. decussatus* već je uočen u talijanskim vodama (Pranovi i sur. 2006). Iz navedenog moguće je pretpostaviti da bi nekontrolirano širenje alohtone vrste *R. philippinarum* moglo uzrokovati djelomično potiskivanje vrste *R. decussatus* s naših prostora. Nadalje, posebnu pažnju izaziva činjenica da su vrste roda *Ruditapes* sklone hibridizirati s kongeneričnim vrstama. Križanci između alohtonih jedinki *R. philippinarum* i autohtonih jedinki *R. decussatus* pronađeni su u španjolskim vodama (Hurtado i sur. 2011, Habtemariam i sur. 2015), dok su u Japanu

dokumentirani križanci između native vrste *R. philippinarum* i unesenih *Ruditapes* spp. jedinki (Kitada i sur. 2013). Hibridizacija između kongeneričnih vrsta zabilježena je i kod drugih školjaka, kao što su to primjerice vrste roda *Mytilus* (Bierne i sur. 2003), *Mercenaria* (Bert i Arnold 1995), *Pinctada* (Masaoka i Kobayashi 2005), *Crassostrea* (Huvet i sur. 2004) te *Meretrix* (Yamakawa i Imai 2012). Prirodna hibridizacija između blisko srodnih vrsta igra važnu ulogu u evoluciji. Međutim, hibridizacija direktno ili indirektno uzrokovana ljudskim djelovanjem, poput unosa nove vrste na neko područje, može uzrokovati izumiranje vrsta, podvrsta i lokalnih populacija njihovom zamjenom ili genetičkim miješanjem (Allendorf i sur. 2001). Analizirajući molekularne biljege hrvatskih jedinki *Ruditapes* spp., u ovom radu nisu otkrivene jedinke koje bi predstavljale križance. Budući da je generacijsko vrijeme vrste *R. philippinarum* jedna godina, nepostojanje hibrida u hrvatskim vodama u ovom trenutku također sugerira relativno nedavan unos školjaka *R. philippinarum*, koji vjerojatno još nije stigao razviti križano potomstvo s autohtonom vrstom *R. decussatus*.

Tijekom proučavanja jadranskih populacija vrsta *Ruditapes* spp., u ovom su radu analizirane kao kontrolne grupe jedinke vrsta *Ruditapes* spp. porijeklom s dva različita turska lokaliteta. Unatoč tome što su jedinke na temelju morfoloških karakteristika determinirane kao nedvosmislene pripadnice jedne od dviju navedenih vrsta, analiza molekularnih biljega pokazala je da su dvije jedinke, morfološki okarakterizirane kao vrsta *R. philippinarum*, križanci između vrsta *R. decussatus* i *R. philippinarum*. Analiza 16S rDNA ukazuje da su ovi hibridi, nastali križanjem ženki vrste *R. philippinarum* s mužjacima vrste *R. decussatus*. Dosadašnje literaturno zabilježene molekularne analize križanaca vrsta roda *Ruditapes* evidentirale su jedinke nastale križanjem mužjaka alohtone vrste s autohtonim ženkama (Hurtado i sur. 2011, Habtemariam i sur. 2015, Kitada i sur. 2013) te je predložena hipoteza da su mužjaci invazivnih vrsta uspješniji u parenju s nativnim ženkama (Kitada i sur. 2013). Turski hibridni uzorci, analizirani u ovom radu, predstavljaju prvu zabilježbu hibrida između vrsta roda *Ruditapes* porijeklom od ženki invazivne vrste te su dokaz da alohtone ženke mogu biti podjednako uspješne u generiranju hibridnog potomstva.

Budući da hibridizacija i introgresija mogu imati znatan utjecaj na očuvanje bioraznolikosti (Allendorf i sur. 2001), pri pojavi hibridizacije, a posebice one uzrokovane antropogenim posredovanjem, ključna je brza detekcija križanaca kako bi se promptno poduzele adekvatne mjere za zaštitu nativnih vrsta. Habtemariam i sur. (2015) kao jednu od preventivnih mjera zaštite predlažu razvijanje dijagnostičkih testova, temeljenih na kombinaciji taksonomskih i genetičkih analiza, kojima bi se pouzdano i efikasno mogli detektirati križanci. Hurtado i sur.

(2011) razvili su strategiju kombinirane analize mitohondrijskih i nuklearnih biljega DNA, koja omogućava brzo, ekonomično i pouzdano razlučivanje vrste *R. decussatus* od vrste *R. philippinarum*, kao i identifikaciju njihovih hibrida. Uspješnom primjenom ove strategije, u analizi jadranskih populacija *Ruditapes* spp. uspjeli smo detektirati invazivne jedinke vrste *R. philippinarum*, kao i razotkriti hibridne jedinke u populaciji *Ruditapes* spp. Mramornog mora. Studija provedena u ovom radu potvrđuje neophodnost analize više različitih biljega DNA te naglašava važnost analize nuklearnih markera, budući da mitohondrijski biljezi, nasljeđujući se po majčinskoj liniji, ne mogu razotkriti križane jedinke.

Uz to što ovaj rad predstavlja prvu studiju vrsta roda *Ruditapes* u hrvatskom dijelu Jadrana upotrebom molekularnih biljega DNA, on je ujedno i prva literaturna evidencija invazivne vrste *R. philippinarum* u tom području. Ovakav rezultat poziva na oprez i otvara pitanje potencijalnog postojanja alohtonog školjkaša *R. philippinarum* i na drugim hrvatskim lokalitetima, koji nisu bili obuhvaćeni ovim istraživanjem. Kako bi se dobila točnija predodžba o širini rasprostranjenosti ovog školjkaša te spriječilo njegovo potencijalno širenje, bit će potrebno provesti daljnja istraživanja većeg broja uzoraka s većeg broja lokacija duž hrvatske obale. Strategija molekularne analize, korištena u ovom radu, pokazala se uspješnom te bi je trebalo primjenjivati u daljnjem praćenju rasprostranjenosti i potencijalnog širenja vrste *R. philippinarum* u Jadranu. Rezultati dobiveni u ovom radu upotrebljivi su kao inicijalna studija te u kombinaciji s rezultatima budućih, ekstenzivnijih studija mogu pripomoći u planiranju monitoringa kao i u razvijanju strategije djelovanja u pravcu zaštite autohtonog školjkaša *R. decussatus*.

5. ZAKLJUČAK

Istraživanje molekularnih biljega DNA u 56 jedinki školjkaša roda *Ruditapes*, analiziranih u sklopu ovog rada, rezultira sljedećim zaključcima:

1. Na lokalitetu Zelena Laguna u blizini grada Poreča identificirana je alohtona vrsta *R. philippinarum*, što ujedno predstavlja i prvu evidenciju ovog invazivnog školjkaša u hrvatskom dijelu Jadrana. Uniformnost haplotipa 16S rDNA između analiziranih jedinki ukazuje na nedavan unos ove vrste u hrvatske vode.
2. Analizom prirodnih populacija vrste *R. decussatus*, prikupljenih na 7 lokaliteta zapadne obale Istre te Sjeverne i Srednje Dalmacije, utvrđeno je 7 različitih haplotipova 16S rDNA, koji međutim ne ukazuju na izravnu korelaciju između pojedinih haplotipova i lokaliteta. Prisutnost različitih haplotipova i povećana genetička varijabilnost unutar pojedinih populacija objašnjive su dugovremenskom prisutnošću vrste *R. decussatus* na ovim prostorima.
3. Analizom jadranskih uzoraka nisu otkriveni križanci između vrsta *R. decussatus* i *R. philippinarum*.
4. U kontrolnoj grupi uzoraka porijeklom s lokaliteta Mramornog mora u Turskoj, analizom jednog mitohondrijskog i tri nuklearna biljega DNA otkrivene su hibridne jedinice vrsta *R. decussatus* i *R. philippinarum*. Detekcija križanaca potvrdila je opravdanost i efikasnost upotrebe više različitih biljega DNA u identifikaciji vrsta roda *Ruditapes* i njihovih hibrida.

6. LITERATURA

- Allendorf F.W., Leary R.F., Spruell P., Wenburg J.K. 2001. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends Ecol. Evol.* **16**, 613–622.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.
- Bert T.M., Arnold W.S. 1995. An empirical test of predictions of two competing models for the maintenance and fate of hybrid zones: both models are supported in a hardclam hybrid zone. *Evolution* **49**, 276–289.
- Bierne N., Borsa P., Daguin C., Jollivet D., Viard F., Bonhomme F., David P. 2003. Introgression patterns in the mosaic hybrid zone between *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*. *Mol. Ecol.* **12**, 447–461.
- Breber P. 2002. Introduction and acclimatisation of the Pacific carpet clam, *Tapes philippinarum*, to Italian waters. U: Leppäkoski E., Gollasch S., Olenin S. (ur.) *Invasive aquatic species of Europe: distributions, impacts and management*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, str. 120-126.
- Canapa A., Marota I., Rollo F., Olmo E. 1996. Phylogenetic analysis of Veneridae (Bivalvia): comparison of molecular and paleontological data. *J. Mol. Evol.* **43**, 517-522.
- Carrieri A., Paesanti F., Rossi R. 1992. Risultati dell'introduzione della vongola filippina *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) nella sacca di Goro (delta del Po). *Oebalia* **9**, 675–680.
- Cesari P., Pellizzato M. 1985. Molluschi pervenuti in Laguna di Venezia per apporti volontari o casuali. Acclimazione di *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughely, 1933) e di *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850). *Boll. Malacol.* **21**, 237-274.
- Chen J., Li Q., Kong L., Zheng X. 2011. Molecular phylogeny of venus clams (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) with emphasis on the systematic position of taxa along the coast of mainland China. *Zool. Scr.* **40**, 260-271.

- Chiesa S., Lucentini L., Freitas R., Nonnis Marzano F., Minello F., Ferrari C., Filonzi L., Figueira E., Breda S., Baccarani G., Argese E. 2014. Genetic diversity of introduced Manila clam *Ruditapes philippinarum* populations inferred by 16S rDNA. *Biochem. Syst. Ecol.* **57**, 52-59.
- Chiesa S., Nonnis Marzano F., Minervini G., De Lucrezia D., Baccarani G., Bordignon G., Poli I., Ravagnan G., Argese E. 2011. The invasive Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) in Northern Adriatic Sea: population genetics assessed by an integrated molecular approach. *Fish. Res.* **110**, 259-267.
- Clement M., Posada D., Candall K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* **9**, 1657-1660.
- Costa C., Menesatti P., Aguzzi J., D'Andrea S., Antonucci F., Rimatori V., Pallottino F., Mattoccia M. 2010. External shape differences between sympatric populations of commercial clams *Tapes decussatus* and *T. philippinarum*. *Food Bioprocess. Tech.* **3**, 43-48.
- Darling J.A., Bagley M.J., Roman J., Tepolot C.K., Geller J.B. 2008. Genetic patterns across multiple introductions of the globally invasive crab genus *Carcinus*. *Mol. Ecol.* **17**, 4992–5007.
- Dulčić J., Grbec B. 2000. Climate change and Adriatic ichthyofauna. *Fish. Oceanogr.* **9**, 187–191.
- FAO 2013. Fisheries and Aquaculture Department.
http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Ruditapes_philippinarum/en
- Feng Y., Li Q., Kong L., Zheng X. 2011. DNA barcoding and phylogenetic analysis of Pectinidae (Mollusca: Bivalvia) based on mitochondrial COI and 16S rRNA genes. *Mol. Biol. Rep.* **38**, 291-299.
- Fernandez A., García T., Gonzalez I., Asensio L., Rodriguez M.A., Hernández P.E., Martin R. 2002. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of a 16S rRNA gene fragment for authentication of four clam species. *J. Food. Protect.* **65**, 692-695.

- Gharbi A., Chatti N., Said K., Van Wormhoudt A. 2010. Genetic variation and population structure of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* along the Tunisian coast inferred from mtDNA and ITS1 sequence analysis. *Biologia* **65**, 688—696.
- Gosling E. 2003. Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture. Fishing News Books, Oxford.
- Habtemariam B.T., Arias A., García-Vázquez E., Borrell Y.J. 2015. Impacts of supplementation aquaculture on the genetic diversity of wild *Ruditapes decussatus* from northern Spain. *Aquacult. Env. Interac.* **6**, 241–254.
- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**, 95-98.
- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., deWaard J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B* **270**, 313–322.
- Hurtado N.S., Perez-Garcia C., Moran 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.
- Huvet A., Fabioux C., McCombie H., Lapegue S., Boudry P. 2004. Natural hybridization between genetically differentiated populations of *Crassostrea gigas* and *C. angulata* highlighted by sequence variation in flanking regions of a microsatellite locus. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **272**, 141–152.
- Jensen A.C., Humphreys J., Caldow R.W.G., Grisley C., Dyrynda P.E.J. 2004. Naturalization of the Manila clam (*Tapes philippinarum*), an alien species, and establishment of a clam fishery within Poole Harbour, Dorset. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* **84**, 1069–1073.
- Jurić I., Bušelić I., Ezgeta-Balić D., Vrgoč N., Peharda M. 2012. Age, growth and condition index of *Venerupis decussata* (Linnaeus, 1758) in the Eastern Adriatic Sea. *Turk. J. Fish. Aquat. Sc.* **12**, 613-618.
- Kitada S., Fujiake C., Asakura Y., Yuki H., Nakajima K., Vargas K.M., Kawashima S., Hamasaki K., Kishino H. 2013. Molecular and morphological evidence of hybridization

- between native *Ruditapes philippinarum* and the introduced *Ruditapes* form in Japan. *Cons. Genet.* **14**, 717-733.
- 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., Higgins D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947-2948.
- Linacre A. 2006. Application of Mitochondrial DNA Technologies in Wildlife Investigation - Species Identification. *Forensic Sci. Rev.* **18**, 1-8.
- Lipej L., Mavrič B., Orlando-Bonaca M., Malej A. 2012. State of the Art of the Marine Non-Indigenous Flora and Fauna in Slovenia. *Mediterr. Mar. Sci.* **13**, 243-249.
- Masaoka T., Kobayashi T. 2005. Natural hybridization between *Pinctada fucata* and *Pinctada maculata* inferred from internal transcribed spacer regions of nuclear ribosomal genes. *Fish. Sci.* **71**, 829–836.
- Matoničkin I., Habdija I., Primc-Habdija B. 1998. *Beskralježnjaci: biologija nižih avvertebrata*. Školska knjiga, Zagreb.
- Palumbi S.R., Martin A., Romano S., McMillan W.O., Stices L., Grabowski G. 2002. *The Simple Fool's Guide to PCR*. University of Hawaii, Honolulu, Hawaii.
- Passamonti M., Boore J.L., Scali V. 2003. Molecular evolution and recombination in gender-associated mitochondrial DNAs of the Manila clam *Tapes philippinarum*. *Genetics* **164**, 603-611.
- Peharda M., Ezgeta-Balić D., Vrgoč N., Isajlović I., Bogner D. 2010. Description of bivalve community structure in the Croatian part of the Adriatic Sea - hydraulic dredge survey. *Acta Adriat.* **51**, 141-158.
- Ponurovski S.K. 2008. Population structure and growth of the Japanese littleneck clam *Ruditapes philippinarum* in Amursky Bay, Sea of Japan. *Russ. J. Mar. Biol.* **34**, 329–332.
- Poppe G.T., Goto Y. 1991. *European seashells. Vol 1 (Polyplacophora, Caudofoveata, Solenogastrea, Gastropoda)*. Verlag Christa Hemmen, Wiesbaden.
- Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.* **25**, 1253-1256.

- Pranovi F., Franceschini G., Casale M., Zucchetta M., Giovanardi O., Torricelli P. 2006. An ecological imbalance induced by a non-native species: the Manila clam in the Venice Lagoon. *Biol. Invasions* **8**, 595–609.
- Sousa R., Gutierrez J.L., Aldrige D.C. 2009. Non-indigenous invasive bivalves as ecosystem engineers. *Biol. Invasions* **11**, 2367-2385.
- Streftaris N., Zenetos A. 2006. Alien Marine Species in the Mediterranean – the 100 ‘Worst Invasives’ and their Impact. *Mediterr. Mar. Sci.* **7**, 87-118.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 2725-2729.
- Yamakawa A.Y., Imai H. 2012. Hybridization between *Meretrix lusoria* and the alien congeneric species *M. petechialis* in Japan as demonstrated using DNA markers. *Aquat. Invasions* **7**, 327–336.
- Zardi G.I., McQuaid C.D., Teskem P.R., Barker N.P. 2007. Unexpected genetic structure of mussel populations in South Africa: indigenous *Perna perna* and invasive *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **337**, 135–144.
- Zentilin A. 1990. Venericoltura in laguna di Marano. U: Agostini D., Alessandra G. (ur.) *Tapes phillipinarum: Biología e Sperimentazione*, Ente di Sviluppo Agricolo Veneto. Trieste, Centre Scientifico Didattico, str. 201-205.
- Zhang D., Hewitt G.M. 1996. Nuclear integrations: challengers for mitochondrial DNA markers. *Tree* **11**, 247-251.

7. PRILOZI

PRILOG 1.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
16Scon	CGCTTTT	GAAAACTTAAATAA	---AAAGTCGAGCCTG	CCCGGTGAGGTATATT	AAACGGCTGCAACGAGAGTTGTACTAAGGTAGCGCGATAATTGTC	97				
RU3-2		----								97
RUP3		----								97
RU0-1		----								97
RU3-3		----								97
RU3-4		----								97
RU3-5		----								97
RUP9		----								97
RU0-7		----								97
RUP8		----								97
RU2-27		----								97
RU0-2		----								97
RU0-5		----								97
RU0-13		----								97
RUP5		----								97
RUP4		----								97
RUP2		----								97
RUP1		----								97
RU2-6		----								97
RU2-8		----								97
RU2-1		----								97
RU1-N2		----								97
RU1-N1		----								97
RU1-D18		----								97
RU1-19		----								97
RU1-18		----								97
RUP7		----								97
RUP11		----								97
RU3-1		----								97
RU2-3		----								97
TRD-5		----								97
RUP6		----								97
RUP10		----								97
TRD-1		----								97
TRD-4		----								97
TRD-2		----								97
TRD-3		----								97
RU1-2	G.....	GT.T.....	TAA.....	TG.....	A.....	-.....	T.....			99
RU1-4	G.....	GT.T.....	TAA.....	TG.....	A.....	-.....	T.....			99
RU1-6	G.....	GT.T.....	TAA.....	TG.....	A.....	-.....	T.....			99
RU1-8	G.....	GT.T.....	TAA.....	TG.....	A.....	-.....	T.....			99
RU1-10	G.....	GT.T.....	TAA.....	TG.....	A.....	-.....	T.....			99
TRP-1	G.....	GT.T.....	TAA.....	TG.....	A.....	-.....	T.....			99
TRP-2	G.....	GT.T.....	TAA.....	TG.....	A.....	-.....	T.....			99
TRP-3	G.....	GT.T.....	TAA.....	TG.....	A.....	-.....	T.....			99
TRP-4	G.....	GT.T.....	TAA.....	TG.....	A.....	-.....	T.....			99
TRP-5	G.....	GT.T.....	TAA.....	TG.....	A.....	-.....	T.....			99

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
16Scon	TTTAAATTGAAGAATGGTATGAAAGGCTCTGTCGCAAGTTGCTTGCTCTGAAAAAGAAAGCGAAGTTTCCTTTTAAATGAAAAGGTTTAAGTAAAGATAA	197								
RU3-2										197
RU3										197
RU0-1										197
RU3-3										197
RU3-4										197
RU3-5										197
RUP9										197
RU0-7										197
RUP8										197
RU2-27										197
RU0-2										197
RU0-5										197
RU0-13										197
RUP5										197
RUP4										197
RUP2										197
RUP1										197
RU2-6										197
RU2-8										197
RU2-1										197
RU1-N2										197
RU1-N1										197
RU1-D18										197
RU1-19										197
RU1-18										197
RUP7										197
RUP11										197
RU3-1										197
RU2-3										197
TRD-5										197
RUP6										197

```

RUP10 ..... 197
TRD-1 ..... 197
TRD-4 ..... 197
TRD-2 ..... 197
TRD-3 ..... 197
RUI-2 .C.....AG.....G...TA.A..TGG.A.TA.....A.....T.C..TT.....A.TT.T-... 198
RUI-4 .C.....AG.....G...TA.A..TGG.A.TA.....A.....T.C..TT.....A.TT.T-... 198
RUI-6 .C.....AG.....G...TA.A..TGG.A.TA.....A.....T.C..TT.....A.TT.T-... 198
RUI-8 .C.....AG.....G...TA.A..TGG.A.TA.....A.....T.C..TT.....A.TT.T-... 198
RUI-10 .C.....AG.....G...TA.A..TGG.A.TA.....A.....T.C..TT.....A.TT.T-... 198
TRP-1 .C.....AG.....G...TA.A..TGG.A.TA.....A.....T.C..TT.....A.TT.T-... 198
TRP-2 .C.....AG.....G...TA.A..TGG.A.TA.....A.....T.C..TT.....A.TT.T-... 198
TRP-3 .C.....AG.....G...TA.A..TGG.A.TA.....A.....T.C..TT.....A.TT.T-... 198
TRP-4 .C.....AG.....G...TA.A..TGG.A.TA.....A.....T.C..TT.....A.TT.T-... 198
TRP-5 .C.....AG.....G...TA.A..TGG.A.TA.....A.....T.C..TT.....A.TT.T-... 198

```

```

                210      220      230      240      250      260      270      280      290      300
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
16Scon AAGACGAGAGACCCCTATTGAGCTTAATCAGGTTTTAAATTTTATGTG-----TGATTATTA-----TTTAAACTAAAG 267
RUI-2 .....T----- 267
RUP3 .....T----- 267
RUI-1 .....T----- 267
RUI-3 .....T----- 267
RUI-4 .....T----- 267
RUI-5 .....T----- 267
RUP9 .....T----- 267
RUI-7 .....T----- 267
RUP8 .....T----- 267
RUI-27 .....T----- 267
RUI-2 .....T----- 267
RUI-5 .....T----- 267
RUI-13 .....T----- 267
RUP5 .....T----- 267
RUP4 .....T----- 267
RUP2 .....T----- 267
RUP1 .....T----- 267
RUI-6 .....T----- 267
RUI-8 .....T----- 267
RUI-1 .....T----- 267
RUI-N2 .....T----- 267
RUI-N1 .....T----- 267
RUI-D18 .....T----- 267
RUI-19 .....T----- 267
RUI-18 .....T----- 267
RUP7 .....C-----T----- 267
RUP11 .....C-----T----- 267
RUI-1 .....C-----T----- 267
RUI-3 .....C-----G----- 267
RUI-5 .....C-----G----- 267
RUP6 .....C-----G----- 267
RUP10 .....C-----G----- 267
TRD-1 .....C-----G----- 267
TRD-4 .....C-----G----- 267
TRD-2 .....C-----G----- 267
TRD-3 .....C-----G----- 267
RUI-2 .....G.C.....T.AA.AAA...C.AG..A..GTTAAATGAAAAGTGTTAATAGTT.A..G..GGCTGAG...TT..T.G... 298
RUI-4 .....G.C.....T.AA.AAA...C.AG..A..GTTAAATGAAAAGTGTTAATAGTT.A..G..GGCTGAG...TT..T.G... 298
RUI-6 .....G.C.....T.AA.AAA...C.AG..A..GTTAAATGAAAAGTGTTAATAGTT.A..G..GGCTGAG...TT..T.G... 298
RUI-8 .....G.C.....T.AA.AAA...C.AG..A..GTTAAATGAAAAGTGTTAATAGTT.A..G..GGCTGAG...TT..T.G... 298
RUI-10 .....G.C.....T.AA.AAA...C.AG..A..GTTAAATGAAAAGTGTTAATAGTT.A..G..GGCTGAG...TT..T.G... 298
TRP-1 .....G.C.....T.AA.AAA...C.AG..A..GTTAAATGAAAAGTGTTAATAGTT.A..G..GGCTGAG...TT..T.G... 298
TRP-2 .....G.C.....T.AA.AAA...C.AG..A..GTTAAATGAAAAGTGTTAATAGTT.A..G..GGCTGAG...TT..T.G... 298
TRP-3 .....G.C.....T.AA.AAA...C.AG..A..GTTAAATGAAAAGTGTTAATAGTT.A..G..GGCTGAG...TT..T.G... 298
TRP-4 .....G.C.....T.AA.AAA...C.AG..A..GTTAAATGAAAAGTGTTAATAGTT.A..G..GGCTGAG...TT..T.G... 298
TRP-5 .....G.C.....T.AA.AAA...C.AG..A..GTTAAATGAAAAGTGTTAATAGTT.A..G..GGCTGAG...TT..T.G... 298

```

```

                310      320      330      340      350      360      370      380      390      400
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
16Scon TGTGGTTGGGGAAAGCTAGATTTAAGAAAAACAAGTCTATAATAGGC-GAAGATCCCTCTCGGGAGATAATTGGTAAAGCTACCGTAGGGATAACAGCGT 366
RUI-2 .....T----- 366
RUP3 .....T----- 366
RUI-1 .....T----- 366
RUI-3 .....T----- 366
RUI-4 .....T----- 366
RUI-5 .....T----- 366
RUP9 .....T----- 366
RUI-7 .....T-----G----- 366
RUP8 .....T-----G----- 366
RUI-27 .....T-----G----- 366
RUI-2 .....T----- 366
RUI-5 .....T----- 366
RUI-13 .....T----- 366
RUP5 .....T----- 366
RUP4 .....T----- 366
RUP2 .....T----- 366
RUP1 .....T----- 366
RUI-6 .....T----- 366
RUI-8 .....T----- 366
RUI-1 .....T----- 366
RUI-N2 .....T----- 366
RUI-N1 .....T----- 366
RUI-D18 .....T----- 366
RUI-19 .....T----- 366
RUI-18 .....T----- 366
RUP7 .....T----- 366
RUP11 .....T----- 366

```

RU3-1	-	366
RU2-3	T.....G.....	366
TRD-5	T.....G.....	366
RUP6	T.....G.....	366
RUP10	G.....	366
TRD-1	G.....	366
TRD-4	G.....	366
TRD-2	G.....	366
TRD-3	G.....C.....	366
RU1-2	.T.A.....G.....GAG.....GT..T..ACT..AG.A.TA.TA.....T.T.A.....-G..A.C.....C.....	397
RU1-4	.T.A.....G.....GAG.....GT..T..ACT..AG.A.TA.TA.....T.T.A.....-G..A.C.....C.....	397
RU1-6	.T.A.....G.....GAG.....GT..T..ACT..AG.A.TA.TA.....T.T.A.....-G..A.C.....C.....	397
RU1-8	.T.A.....G.....GAG.....GT..T..ACT..AG.A.TA.TA.....T.T.A.....-G..A.C.....C.....	397
RU1-10	.T.A.....G.....GAG.....GT..T..ACT..AG.A.TA.TA.....T.T.A.....-G..A.C.....C.....	397
TRP-1	.T.A.....G.....GAG.....GT..T..ACT..AG.A.TA.TA.....T.T.A.....-G..A.C.....C.....	397
TRP-2	.T.A.....G.....GAG.....GT..T..ACT..AG.A.TA.TA.....T.T.A.....-G..A.C.....C.....	397
TRP-3	.T.A.....G.....GAG.....GT..T..ACT..AG.A.TA.TA.....T.T.A.....-G..A.C.....C.....	397
TRP-4	.T.A.....G.....GAG.....GT..T..ACT..AG.A.TA.TA.....T.T.A.....-G..A.C.....C.....	397
TRP-5	.T.A.....G.....GAG.....GT..T..ACT..AG.A.TA.TA.....T.T.A.....-G..A.C.....C.....	397

	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	
16Scon											
RU3-2	AATCTTTCTTGAGAGATCTTATTGAGGGAAAGGTTTGCACCTCGATGTTGGATTAGAAAACTTCTTGGTGCAGCAGCTAAGAGTAGTGAGACTGTTTCG										466
RUP3											466
RU0-1											466
RU3-3	C.....										466
RU3-4	C.....										466
RU3-5	C.....										466
RUP9	C.....										466
RU0-7											466
RUP8											466
RU2-27											466
RU0-2											466
RU0-5											466
RU0-13											466
RUP5											466
RUP4											466
RUP2											466
RUP1											466
RU2-6											466
RU2-8											466
RU2-1											466
RU1-N2											466
RU1-N1											466
RU1-D18											466
RU1-19											466
RU1-18											466
RUP7											466
RUP11											466
RU3-1											466
RU2-3	C.....										466
TRD-5	C.....										466
RUP6	C.....										466
RUP10	C.....										466
TRD-1	C.....										466
TRD-4	C.....										466
TRD-2	C.....										466
TRD-3	C.....										466
RU1-2	..TC..T..A.....	..GA.....	..T.....	..T.....	..GA..T..A.....						497
RU1-4	..TC..T..A.....	..GA.....	..T.....	..T.....	..GA..T..A.....						497
RU1-6	..TC..T..A.....	..GA.....	..T.....	..T.....	..GA..T..A.....						497
RU1-8	..TC..T..A.....	..GA.....	..T.....	..T.....	..GA..T..A.....						497
RU1-10	..TC..T..A.....	..GA.....	..T.....	..T.....	..GA..T..A.....						497
TRP-1	..TC..T..A.....	..GA.....	..T.....	..T.....	..GA..T..A.....						497
TRP-2	..TC..T..A.....	..GA.....	..T.....	..T.....	..GA..T..A.....						497
TRP-3	..TC..T..A.....	..GA.....	..T.....	..T.....	..GA..T..A.....						497
TRP-4	..TC..T..A.....	..GA.....	..T.....	..T.....	..GA..T..A.....						497
TRP-5	..TC..T..A.....	..GA.....	..T.....	..T.....	..GA..T..A.....						497

	510	
16Scon		
RU3-2	TCTCTTAAATTCT	480
RUP3		480
RU0-1		480
RU3-3		480
RU3-4		480
RU3-5		480
RUP9		480
RU0-7		480
RUP8		480
RU2-27		480
RU0-2		480
RU0-5		480
RU0-13		480
RUP5		480
RUP4		480
RUP2		480
RUP1		480
RU2-6		480
RU2-8		480
RU2-1		480
RU1-N2		480
RU1-N1		480
RU1-D18		480

RU1-19		480
RU1-18		480
RUP7		480
RUP11		480
RU3-1		480
RU2-3		480
TRD-5		480
RUP6		480
RUP10		480
TRD-1		480
TRD-4		480
TRD-2		480
TRD-3		480
RU1-2	...T...T....	511
RU1-4	...T...T....	511
RU1-6	...T...T....	511
RU1-8	...T...T....	511
RU1-10	...T...T....	511
TRP-1	...T...T....	511
TRP-2	...T...T....	511
TRP-3	...T...T....	511
TRP-4	...T...T....	511
TRP-5	...T...T....	511

Slika P1. Nukleotidni sljedovi odsječaka 16S rDNA umnoženih u genomskim DNA jedinki roda *Ruditapes*. Svrnjivanjem i usporedbom odsječaka izvedena je konsenzus sekvenca nazvana 16Scon, prikazana punim nukleotidnim slijedom. Slovim su označene promjene unutar pojedinih uzoraka u odnosu na konsenzus sekvencu, točke predstavljaju podudarnost s konsenzus sekvencom, a crtice označavaju delecije unutar pojedinih odsječaka. Nazivi taksona odgovaraju uzorcima navedenim u tablici 5.

PRILOG 2.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Ruditapes decussatus 16S ribosomal RNA gene, partial sequence: mitochondrial	887	887	100%	0.0	100%	HQ634141.1
☐	Tapes decussatus 16S ribosomal RNA gene, partial sequence: mitochondrial gene for mitochondrial product	881	881	100%	0.0	99%	AF215866.1
☐	Venerupis (Ruditapes) decussatus voucher FMNH 306189 large subunit ribosomal RNA (rnl) gene, partial sequence: mitochondrial	880	880	99%	0.0	99%	DQ184728.1
☐	Tapes decussatus partial mitochondrial 16S rRNA gene	865	865	100%	0.0	99%	AJ548764.1
☐	Ruditapes decussatus 16S ribosomal RNA gene, partial sequence: mitochondrial	857	857	100%	0.0	99%	JF808190.1
☐	Ruditapes decussatus partial 16S rRNA gene	850	850	96%	0.0	99%	AJ417846.1
☐	Ruditapes decussatus isolate Rdhap1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence: mitochondrial	732	732	85%	0.0	99%	KF736210.1
☐	Ruditapes decussatus isolate Rdhap2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence: mitochondrial	726	726	85%	0.0	99%	KF736211.1
☐	Tapes decussatus partial mitochondrial 16S rRNA gene	676	676	78%	0.0	99%	AJ294949.1

Slika P2a. Rezultati pretraživanja baze podataka NCBI GenBank pomoću konsenzus nukleotidnog slijeda 16S DE. Prikazane su sekvence najveće sličnosti uz očekivanu statističku vrijednost (eng. *Expect value*, skraćeno *E-value*) 0.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Ruditapes philippinarum 16S ribosomal RNA gene, partial sequence: mitochondrial	944	944	100%	0.0	100%	HQ634142.1
☐	Venerupis (Ruditapes) philippinarum isolate Ftph9 female 16S ribosomal RNA (rnl) gene, partial sequence: mitochondrial gene for mitochondrial product	944	944	100%	0.0	100%	AF484291.1
☐	Venerupis (Ruditapes) philippinarum isolate Ftph7 female 16S ribosomal RNA (rnl) gene, partial sequence: mitochondrial gene for mitochondrial product	944	944	100%	0.0	100%	AF484289.1
☐	Tapes philippinarum isolate TphVEN-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence: mitochondrial gene for mitochondrial product	944	944	100%	0.0	100%	AF199468.1
☐	Tapes philippinarum isolate TphVEN-11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence: mitochondrial gene for mitochondrial product	944	944	100%	0.0	100%	AF199467.1
☐	Venerupis (Ruditapes) philippinarum isolate Ftph13 female 16S ribosomal RNA (rnl) gene, partial sequence: mitochondrial gene for mitochondrial product	939	939	100%	0.0	99%	AF484295.1
☐	Venerupis (Ruditapes) philippinarum isolate Ftph10 female 16S ribosomal RNA (rnl) gene, partial sequence: mitochondrial gene for mitochondrial product	939	939	100%	0.0	99%	AF484292.1
☐	Venerupis philippinarum mitochondrial DNA, complete genome, female type	939	939	100%	0.0	99%	AB065375.1
☐	Tapes philippinarum partial mitochondrial 16S rRNA gene	937	937	99%	0.0	100%	AJ548765.1
☐	Venerupis (Ruditapes) philippinarum 16S ribosomal RNA gene, partial sequence: mitochondrial	933	933	100%	0.0	99%	DQ356383.1
☐	Venerupis (Ruditapes) philippinarum isolate Ftph8 female 16S ribosomal RNA (rnl) gene, partial sequence: mitochondrial gene for mitochondrial product	933	933	100%	0.0	99%	AF484290.1
☐	Ruditapes philippinarum isolate TaRph 16S ribosomal RNA gene, partial sequence: mitochondrial	928	928	100%	0.0	99%	JN969951.1
☐	Venerupis (Ruditapes) philippinarum isolate Ftph6 female 16S ribosomal RNA (rnl) gene, partial sequence: mitochondrial gene for mitochondrial product	928	928	100%	0.0	99%	AF484288.1
☐	Ruditapes philippinarum partial 16S rRNA gene	915	915	98%	0.0	99%	AJ417847.1
☐	Venerupis (Ruditapes) philippinarum mitochondrial partial 16S rRNA gene, from Italy	907	907	99%	0.0	99%	AM085107.1
☐	Ruditapes philippinarum isolate Rphap1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence: mitochondrial	809	809	85%	0.0	100%	KF736199.1
☐	Ruditapes philippinarum isolate Rphap12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence: mitochondrial	804	804	85%	0.0	99%	KF736209.1
☐	Ruditapes philippinarum isolate Rphap8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence: mitochondrial	804	804	85%	0.0	99%	KF736208.1
☐	Ruditapes philippinarum isolate Rphap6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence: mitochondrial	804	804	85%	0.0	99%	KF736204.1
☐	Ruditapes philippinarum isolate Rphap5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence: mitochondrial	804	804	85%	0.0	99%	KF736203.1

Slika P2b. Rezultati pretraživanja baze podataka NCBI GenBank pomoću konsenzus nukleotidnog slijeda 16S PH. Prikazano je prvih 20 sekvenca najveće sličnosti uz očekivanu statističku vrijednost (eng. *E-value*) 0.

PRILOG 3.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☒ Ruditapes philippinarum 5S ribosomal RNA gene region	856	856	95%	0.0	97%	HQ634138.1
☐ Ruditapes decussatus 5S ribosomal RNA gene region	171	171	20%	1e-38	95%	HQ634137.1
☐ Ensis directus 5S rRNA gene and IGS, clone ame10.1-2_C	169	169	19%	3e-38	97%	AM904933.1
☐ Ensis directus 5S rRNA gene and IGS, clone ame12.1-2_C	169	169	19%	3e-38	97%	AM904931.1

Slika P3a. Rezultati pretraživanja baze podataka NCBI GenBank pomoću nukleotidnog slijeda RU1-6/RU1-8/TRP3 5S rDNA. Istaknuta je sekvenca najveće sličnosti uz očekivanu statističku vrijednost (eng. *E-value*) 0.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☒ Ruditapes philippinarum 5S ribosomal RNA gene region	835	835	96%	0.0	96%	HQ634138.1
☐ Ruditapes decussatus 5S ribosomal RNA gene region	171	171	20%	1e-38	95%	HQ634137.1
☐ Ensis directus 5S rRNA gene and IGS, clone ame10.1-2_C	169	169	18%	4e-38	97%	AM904933.1
☐ Ensis directus 5S rRNA gene and IGS, clone ame12.1-2_C	169	169	18%	4e-38	97%	AM904931.1

Slika P3b. Rezultati pretraživanja baze podataka NCBI GenBank pomoću nukleotidnog slijeda TRP1/TRP2 D 5S rDNA. Istaknuta je sekvenca najveće sličnosti uz očekivanu statističku vrijednost (eng. *E-value*) 0.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☒ Ruditapes decussatus 5S ribosomal RNA gene region	1027	1027	96%	0.0	99%	HQ634137.1
☐ Ensis directus 5S rRNA gene, isolate EDhol14_400_clone7	187	187	19%	1e-43	96%	AM906182.1
☐ Mytilus trossulus 5S rRNA gene and NTS, Canadian individual clone beta3	185	185	23%	4e-43	91%	FN561830.1
☐ Mytilus trossulus 5S rRNA gene and NTS, Canadian individual clone beta2	185	185	23%	4e-43	91%	FN561829.1
☐ Venerupis rhomboideus 5S rRNA gene, clone TRH3	183	183	17%	1e-42	98%	AJ583107.1

Slika P3c. Rezultati pretraživanja baze podataka NCBI GenBank pomoću nukleotidnog slijeda TRP1 G 5S rDNA. Istaknuta je sekvenca najveće sličnosti uz očekivanu statističku vrijednost (eng. *E-value*) 0.

PRILOG 4.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
MAPI24	ggaagtaaaagt	cgtaacaagg	ATCCGTAGGTGAACCTGCGGATGGATCATTA	CCATGAAATGATAGACTGCCGGCAGATCCCGCCCTGGCCAGT	---	96					
TRP3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	96
MAPI35	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	96
RU1-8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	93
MAPI7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	96
MAPI8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	96
MAPI17	---	---	---	---	---	---	---	---	T	---	96
RU1-6	---	---	---	---	---	---	---	---	T	---	96
MAPI39	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	96
MAPI19	---	---	---	---	---	---	G	---	---	---	94
MAPI10	---	---	---	---	---	A.AAC.CACGC.C	..A.GA.AGAGGTGT	..AT	..AT.GA.GAGA	99	
MAPI11	---	---	---	---	---	A.AAC.CACGC.C	..A.GA.AGAGGTGT	..AT	..AT.GA.GAGA	99	
MAPI1	---	---	---	---	---	A.AAC.CACGC.C	..A.GA.AGAGGTGT	..AT	..AT.GA.GAGA	99	
MAPI2	---	---	---	---	---	A.AAC.CACGC.C	..A.GA.AGAGGTGT	..AT	..AT.GA.GAGA	99	
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	
MAPI24	CTCTAAACTAATCTTGAACGCACCA	---	---	---	CGCACGCCCAGTC	---	GACGCGTGCCTAATAAAAA	---	CGTCGACCCAGCAGCA	---	169
TRP3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	169
MAPI35	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	169
RU1-8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	165
MAPI7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	168
MAPI8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	168
MAPI17	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	168
RU1-6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	168
MAPI39	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	168
MAPI19	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	166
MAPI10	TCATGAC	..AA..AAAAA	..A.AAGTTGCTTTTT	A..A.AG.ACACGGG	..T..	..C.TCCA.CTC	..GA.C.G.AGG	198			
MAPI11	TCATGAC	..AA..AAAAA	..A.AAGTTGCTTTTT	A..A.AG.ACACGGG	..T..	..C.TCCA.CTC	..GA.C.G.AGG	199			
MAPI1	TCA.GAC	..AA..AAAAA	..A.AAGTTGCTTTTT	A..A.AG.ACACGGG	..T..	..C.TCCA.CTC	..GA.C.G.AGG	198			
MAPI2	TCATGAC	..AA..AAAAA	..A.AAGTTGCTTTTT	A..A.AG.ACACGGG	..T..	..C.TCCA.CTC	..GA.C.G.AGG	198			
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	
MAPI24	CCCGGGT-CTAC	---	---	---	---	---	---	---	---	---	236
TRP3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	236
MAPI35	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	236
RU1-8	---	---	---	---	---	---	---	---	T	---	232
MAPI7	---	---	---	---	---	---	---	---	T	---	235
MAPI8	---	---	---	---	---	---	---	---	T	---	235
MAPI17	---	---	---	---	---	---	---	---	T	---	235
RU1-6	---	---	---	---	---	---	---	---	T	---	235
MAPI39	---	---	---	---	---	---	---	---	T	---	235
MAPI19	---	---	---	---	---	---	---	---	T	---	233
MAPI10	CCGT	..T.CA..G.AGAACG	..A.G..G	..A.A.GTC	..GG..G	..CCGGT.TC.T.C	..A.TGGTGTTA	..T..	CCT	..CGAGACGCAC	298
MAPI11	CCGT	..T.CA..G.AGAACG	..A.G..G	..A.A.GTC	..GG..G	..CCGGT.TC.T.C	..A.TGGTGTTA	..T..	CCT	..CGAGACGCAC	299
MAPI1	CCGT	..T.CA..G.AGAACG	..A.G..G	..A.A.GTC	..GG..G	..CCGGT.TC.T.C	..A.TGGTGTTA	..T..	CCT	..CGAGACGCAC	298
MAPI2	CCGT	..T.CA..G.AGAACG	..A.G..G	..A.A.GTC	..GG..G	..CCGGT.TC.T.C	..A.TGGTGTTA	..T..	CCT	..CGAGACGCAC	298
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	
MAPI24	GCTGCTGCTGGA	AAAAGTCG	---	---	---	---	---	---	---	---	328
TRP3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	328
MAPI35	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	328
RU1-8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	322
MAPI7	CT	---	---	---	---	---	---	---	---	---	326
MAPI8	CT	---	---	---	---	---	---	---	---	---	326
MAPI17	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	324
RU1-6	---	---	---	A	---	---	---	---	---	---	324
MAPI39	G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	326
MAPI19	---	---	---	---	---	---	---	---	C	---	323
MAPI10	AC.TCT	..G..G.GCGA	..AT.C..G.CG.CA.GT.C	..GC-T.G..G	..GC.CC.TCGAA	..G.AAG.ACAC	..C.A..T.T.CCTA	397			
MAPI11	AC.TCT	..G..G.GCGA	..AT.C..G.CG.CA.GT.C	..GC-T.G..G	..GC.CC.TCGAA	..G.AAG.ACAC	..C.A..T.T.CCTA	398			
MAPI1	AC.TCT	..G..G.GCGA	..AT.C..G.CG.CA.GT.C	..GC-T.G..G	..GC.CC.TCGAA	..G.AAG.ACAC	..C.A..T.T.CCTA	397			
MAPI2	AC.TCT	..G..G.GCGA	..AT.C..G.CG.CA.GT.C	..GC-T.G..G	..GC.CC.TCGAA	..G.AAG.ACAC	..C.A..T.T.CCTA	397			
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	
MAPI24	GGACCCCTCGAATC	---	---	---	---	---	---	---	---	---	412
TRP3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	412
MAPI35	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	412
RU1-8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	406
MAPI7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	410
MAPI8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	410
MAPI17	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	408
RU1-6	---	---	---	---	---	---	T	---	T	---	408
MAPI39	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	410
MAPI19	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	407
MAPI10	TA.A.A	..TG.TTATGGGGT	..GG..G.T	..TCTCG	..T.CC.C.A	..G.AC.GG	..G.GG.T	..GCGT.C.A	..A.A	..GGGCTCT	TC 497
MAPI11	TA.A.A	..TG.TTATGGGGT	..GG..G.T	..TCTCG	..T.CC.C.A	..G.AC.GG	..G.GG.T	..GCGT.C.A	..A.A	..GGGCTCT	TC 498
MAPI1	TA.A.A	..TG.TTATGGGGT	..GG..G.T	..TCTCG	..T.CC.C.A	..G.AC.GG	..G.GG.T	..GCGT.C.A	..A.A	..GGGCTCT	TC 497
MAPI2	TA.A.A	..TG.TTATGGGGT	..GG..G.T	..TCTCG	..T.CC.C.A	..G.AC.GG	..G.GG.T	..GCGT.C.A	..A.A	..GGGCTCT	TC 497
	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600	
MAPI24	CCGGCCGCAAGGCGATCTTCCCCCTGCCGGGAAAGCGCCCTCTTCCCGTCTCTT	---	---	---	---	---	---	---	---	---	507
TRP3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	507
MAPI35	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	507
RU1-8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	501
MAPI7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	505
MAPI8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	505
MAPI17	---	---	---	---	---	---	---	---	A	---	503
RU1-6	---	---	---	T	---	---	A	---	---	---	503
MAPI39	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	505
MAPI19	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	505

PRILOG 5.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Venerupis philippinarum isolate SCS07 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complete sequence	1232	1232	97%	0.0	99%	GU358293.1
☐	Venerupis (Ruditapes) philippinarum strain ZH 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complete sequence	1229	1229	97%	0.0	99%	AY498757.1
☐	Venerupis philippinarum isolate SCS01 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complete sequence	1227	1227	97%	0.0	99%	GU358289.1
☐	Venerupis (Ruditapes) philippinarum 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	1227	1227	96%	0.0	99%	EF035088.1
☐	Venerupis philippinarum isolate SCS31 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complete sequence	1225	1225	97%	0.0	99%	GU358313.1

Slika P5a. Rezultati pretraživanja baze podataka NCBI GenBank pomoću konsenzusnog nukleotidnog slijeda *ITS1 PH kratki*. Prikazane su sekvence najveće sličnosti uz očekivanu statističku vrijednost (eng. *E-value*) 0.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Ruditapes philippinarum isolate SS4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	1310	1310	98%	0.0	99%	JN807376.1
☐	Ruditapes philippinarum isolate SS3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	1310	1310	98%	0.0	99%	JN807375.1
☐	Venerupis philippinarum isolate SCS28 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complete sequence	1279	1279	97%	0.0	99%	GU358311.1
☐	Venerupis (Ruditapes) philippinarum haplotype FL1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	1279	1279	95%	0.0	99%	DQ399404.1
☐	Ruditapes philippinarum isolate SG1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	1277	1277	98%	0.0	98%	JN807377.1

Slika P5b. Rezultati pretraživanja baze podataka NCBI GenBank pomoću konsenzusnog nukleotidnog slijeda *ITS1 PH dugi*. Prikazane su sekvence najveće sličnosti uz očekivanu statističku vrijednost (eng. *E-value*) 0.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Ruditapes decussatus haplotype 6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complete sequence	1310	1310	93%	0.0	99%	HQ179962.1
☐	Ruditapes decussatus haplotype 9 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complete sequence	1306	1306	93%	0.0	99%	HQ179965.1
☐	Ruditapes decussatus haplotype 7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complete sequence	1306	1306	93%	0.0	99%	HQ179963.1
☐	Ruditapes decussatus 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	1306	1306	100%	0.0	96%	HQ634139.1
☐	Ruditapes decussatus haplotype 8 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complete sequence	1303	1303	93%	0.0	99%	HQ179964.1

Slika P5c. Rezultati pretraživanja baze podataka NCBI GenBank pomoću konsenzusnog nukleotidnog slijeda *ITS1 DE*. Prikazane su sekvence najveće sličnosti uz očekivanu statističku vrijednost (eng. *E-value*) 0.

PRILOG 6.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
<i>ITS1 PH dugi</i>											
<i>ITS1 PH kratki</i>	GGAAGTAAAGTCGTAAACAAGGTATCCGTAGGTGAACCTGCGGATGGATCATTACCATGAAATGATAGACTGCCGGCAGATCCCGCCCTGGCCAGTCTCT										100
											100
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	
<i>ITS1 PH dugi</i>	AAACTAATCTTGAACGCACCACGCACGCCAGTCGACGCGTGCCTAATAAAAAACGTCGACCCAGCAGCACCCGGGTCTACGGGCTGCCCGCGCGCGGAT										200
<i>ITS1 PH kratki</i>											199
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	
<i>ITS1 PH dugi</i>	TGGCCACCGCTGCCGGACTGCGGCCACCACTGCGGGGCTGCTGCTGGAAAAAGTCGGGAGCCGTCCGCCAGAGGTGATTCCCACCCAGGACAGTGGCTCT										300
<i>ITS1 PH kratki</i>											298
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	
<i>ITS1 PH dugi</i>											
<i>ITS1 PH kratki</i>	CGCAGCGCCGTGGGGTGCCGGCGGTGCGAGGACCCCTCGAATCGCTCCCTTTGGCCGGGAGCGAGGAACGTTCCCGGACCTAGTTCGCTTGGCGATGCTGC										400
											398
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	
<i>ITS1 PH dugi</i>											
<i>ITS1 PH kratki</i>	TCGCGAACGACGCCGGCCGCAAGGCGATCTTCCCCCTGCCGGGAAAAGCGCCCTCTTCCCGTCTCTTCGGAGACGGGATTGCGCCCTCCTCAAAGCGT										500
											498
	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600	
<i>ITS1 PH dugi</i>											
<i>ITS1 PH kratki</i>	ACACCAACGTTTTTTGCGGGCGTCGCGGAGGAAAACAACGGGGGCAGAGAGGAGACTCTTCCTTCCCCTAGTGGTTAGTACTCCGCGCTTGAACGCGTG										600
											568
	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700	
<i>ITS1 PH dugi</i>											
<i>ITS1 PH kratki</i>	ACTCTGTATCCGGGCTCTCTCGGGAGACAGAGCGCAGGACTTCCGCCCGTGTTGCGCGGGCGGTCGACACCTGTTTCAGAAATCTGAGACAACCTCTATGCG										700
											668
	710	720	730								
<i>ITS1 PH dugi</i>											
<i>ITS1 PH kratki</i>	GTGGATCACTCGGCTCGTGCATCGATGAAGAACGCAGC										738
											706

Slika P6. Usporedba konsenzusnih nukleotidnih sljedova *ITS1 PH dugi* i *ITS PH kratki* vrsta roda *Ruditapes*.

PRILOG 7.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
RU1-6 ITS2	gcatcgatgaagaacgcagc									90
RU1-8 ITS2	AGCTGCGTGAATTAATGTGAATTGCAGGACACACTGAACATCGACACCTTGAACGCACATTGCGGCTCT									90
TRP1 ITS2 G										90
TRP2 ITS2 G										90
TRP3 ITS2										90
TRP1 ITS2 D										90
TRP2 ITS2 D										90
	100	110	120	130	140	150	160	170	180	
RU1-6 ITS2	GGCTCACTGCCAGAGCCACGCCTGTCCGAGGGTCGGCGAACAAGTCATCGGCTCTCACTGTTCACTACGGTGAGGG--GCGAGTTGGCGC									178
RU1-8 ITS2										172
TRP1 ITS2 G										172
TRP2 ITS2 G										172
TRP3 ITS2										172
TRP1 ITS2 D										180
TRP2 ITS2 D										180
	190	200	210	220	230	240	250	260	270	
RU1-6 ITS2	GTCGCGCGGGCTTTTCGTCCCGCTCGTCCGCCGTAGATTCCAGCCTCTCTCTGCCGGTCGAACCAGTCGCTGGAAGTGGCGCGGAGACAGG									268
RU1-8 ITS2										262
TRP1 ITS2 G										262
TRP2 ITS2 G										262
TRP3 ITS2										262
TRP1 ITS2 D										261
TRP2 ITS2 D										261
	280	290	300	310	320	330	340	350	360	
RU1-6 ITS2	GCTCGAACGGGCCCCGACGTCCCGCTCCGCGTCTCTCTCACCAGAGGGCGGCCCTTCCGTGCGGCGTCGTCGCCGGCAAAAGCGAGAGAG									358
RU1-8 ITS2										352
TRP1 ITS2 G										352
TRP2 ITS2 G										352
TRP3 ITS2										352
TRP1 ITS2 D										311
TRP2 ITS2 D										311
	370	380	390	400	410	420	430	440	450	
RU1-6 ITS2	AGCGGCCAAGGACGGGTCTAGCCAGCCCGGCCCGGAGCCGAAACCGGAGACGCGGGGAGACAGGCCGACTGACGACGACGACTCCAGCGA									448
RU1-8 ITS2										442
TRP1 ITS2 G										442
TRP2 ITS2 G										442
TRP3 ITS2										442
TRP1 ITS2 D										382
TRP2 ITS2 D										382
	460	470	480	490	500	510	520	530	540	
RU1-6 ITS2	TGGGGTCCGAGTCCGATGACGCCGC-CTCAACCCC-GCACCACCTCCAAAAATTCA									536
RU1-8 ITS2										530
TRP1 ITS2 G										531
TRP2 ITS2 G										530
TRP3 ITS2										531
TRP1 ITS2 D										462
TRP2 ITS2 D										462
	550	560								
RU1-6 ITS2	ATTTA		gcatatcaataagcggagga							562
RU1-8 ITS2										556
TRP1 ITS2 G										557
TRP2 ITS2 G										556
TRP3 ITS2										557
TRP1 ITS2 D										488
TRP2 ITS2 D										488

Slika P7. Nukleotidni slijedovi odsječaka ITS2 umnoženih iz uzoraka RU1-6, RU1-8, TRP1 te hibridnih jedinki TRP2 i TRP3. Prva navedena sekvenca prikazana je punim nukleotidnim slijedom; u preostalih sekvencama slovima su označene promjene u odnosu na prvu zapisanu sekvencu, točke predstavljaju podudarnost, a crtice označavaju delecije unutar pojedinih sekvenca. Regija gena 5.8S rRNA osjenčana je sivo, regija gena 28S rRNA obojana je zeleno, a segment između njih čini regiju ITS2. Položaj početnica PCR-a označen je malim slovima u kurzivu unutar strelica.

PRILOG 8.

Sequences producing significant alignments:						
Select: All None Selected: 0						
Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results						
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Ruditapes philippinarum isolate SG1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA q	981	981	99%	0.0	99%	JN807377.1
Venerupis (Ruditapes) philippinarum 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA q	979	979	99%	0.0	99%	EF035087.1
Ruditapes philippinarum isolate SG4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA q	968	968	99%	0.0	98%	JN807379.1
Ruditapes philippinarum isolate SS4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA q	966	966	99%	0.0	98%	JN807376.1
Ruditapes philippinarum isolate SS3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA q	966	966	99%	0.0	98%	JN807375.1
Ruditapes philippinarum isolate SG3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA q	959	959	99%	0.0	98%	JN807378.1
Venerupis (Ruditapes) philippinarum strain QWD 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribos	959	959	99%	0.0	98%	AY498755.1
Venerupis (Ruditapes) philippinarum haplotype FL1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S rib	957	957	99%	0.0	98%	DQ399404.1
Venerupis (Ruditapes) philippinarum strain RC 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S riboson	953	953	99%	0.0	98%	AY498754.1
Ruditapes philippinarum isolate SS1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA q	952	952	99%	0.0	98%	JN807374.1
Venerupis (Ruditapes) philippinarum 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA q	952	952	99%	0.0	98%	EF035088.1
Venerupis (Ruditapes) philippinarum strain GD 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S riboson	952	952	99%	0.0	98%	AY498751.1
Ruditapes philippinarum genomic DNA containing 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, isolate Rph2	948	948	99%	0.0	98%	HE965785.1
Ruditapes philippinarum genomic DNA containing 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, isolate Rph1	948	948	99%	0.0	98%	HE965784.1

Slika P8a. Rezultati pretraživanja baze podataka NCBI GenBank pomoću konsenzusnog nukleotidnog slijeda ITS2 PH. Prikazane su sekvence najveće sličnosti uz očekivanu statističku vrijednost (eng. *E-value*) 0.

Sequences producing significant alignments:						
Select: All None Selected: 0						
Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results						
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Ruditapes decussatus genomic DNA containing 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, isolate Rde2a	869	869	99%	0.0	99%	HE965780.1
Ruditapes decussatus genomic DNA containing 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, isolate Rde1	869	869	99%	0.0	99%	HE965779.1
Ruditapes decussatus genomic DNA containing 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, isolate Rde7	863	863	99%	0.0	99%	HE965783.1
Ruditapes decussatus genomic DNA containing 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, isolate Rde5	863	863	99%	0.0	99%	HE965782.1
Ruditapes decussatus genomic DNA containing 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, isolate Rde2b	863	863	99%	0.0	99%	HE965781.1
Ruditapes decussatus 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosoi	811	811	99%	0.0	97%	HQ634139.1

Slika P8b. Rezultati pretraživanja baze podataka NCBI GenBank pomoću konsenzusnog nukleotidnog slijeda ITS2 PH. Prikazane su sekvence najveće sličnosti uz očekivanu statističku vrijednost (eng. *E-value*) 0.

ŽIVOTOPIS

OSOBNİ PODACI

Ime: **Mario**
Prezime: **Pirija**
Datum rođenja: 14.02.1990.
Mjesto rođenja: Split, Hrvatska

KONTAKTNI PODACI

Adresa: Ivana Pavla II. 11
21212 Kaštel Sućurac
Telefon: 091 558 2731
E-mail: mariopirija@hotmail.com

OBRAZOVANJE:

2008-2012 *Preddiplomski studij:* Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Preddiplomski sveučilišni studij molekularne biologije
2004-2008 *Srednja škola:* V. gimnazija Vladimir Nazor, Split
2007. i 2008. *Ljetna škola:* Summer school of science, Višnjan
.

VJEŠTINE I KOMPETENCIJE:

Strani jezici: Engleski (izvrsno)
Talijanski (dobro)
Ronilačka dozvola: R1 kategorija
Računalne vještine: Odlično poznavanje MS Office aplikacija (Word, Excel, PowerPoint)
Osnovno poznavanje programa BioEdit