Analiza kariotipa slatkovodnih rakova Austropotamobius pallipes (Lereboullt, 1858) i Austropotamobius torrentium (Schrank, 1803)

Porupski, Ines

Master's thesis / Diplomski rad

2014

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:217:149456

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Ines Porupski

Analiza kariotipa slatkovodnih rakova *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858) i *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803)

Diplomski rad

Zagreb, 2014.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod voditeljstvom izv. prof. dr. sc. Ivane Maguire i neposrednim voditeljstvom dr. sc. Jelene Mlinarec Novosel, radi stjecanja zvanja magistar eksperimentalne biologije.

ZAHVALA

Najviše se zahvaljujem neposrednoj voditeljici dr. sc. Jeleni Mlinarec Novosel na stručnom vodstvu, iznimnom strpljenju i velikom razumijevanju koje mi je pružila tijekom izrade praktičnog i pismenog dijela ovog diplomskog rada.

Od srca zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Ivani Maguire na stručnim savjetima, velikom razumijevanju i neizmjernoj pomoći pri izradi ovog diplomskog rada.

Veliko hvala Margeriti na nesebičnoj pomoći i savjetima tijekom pisanja diplomskog rada, a ponajviše na predivnom prijateljstvu.

Nemam dovoljno riječi kojima bih mogla zahvaliti mojoj obitelji i Goranu na strpljenju, pruženoj potpori i ljubavi te na velikoj pomoći kako bi mi olakšali studij.

Posebno velika hvala Nives i Asji na nesebičnoj pomoći, ali najviše na nevjerojatnoj podršci i prijateljstvu.

Također, zahvaljujem se svim prijateljima i kolegama s kojima sam provodila studentske dane, koji su bili od neizmjerne pomoći i podrške te učinili studiranje lakšim i nezaboravnim.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Analiza kariotipa slatkovodnih rakova *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858) i *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803)

Ines Porupski

Rooseveltov trg 6, Zagreb

Provedeno je kariološko-citogenetičko istraživanje na europskim autohtonim vrstama rakova *Austropotamobius pallipes* i *A. torrentium* iz porodice Astacidae. Vrsta *A. pallipes* ima diploidan broj kromosoma 2n=168, a vrsta *A. torrentium* ima 2n=164. Formula kariotipa za vrstu *A. pallipes* je 148m+18sm+2a, a za vrstu *A. torrentium* je 148m+16sm. Pomoću metode pruganja flurorescencijskom bojom 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) zabilježeno je da većina kromosoma vrste *A. pallipes* i *A. torrentium* sadrži heterokromatinske blokove smještene centromerno i pericentromerno. Na nekim kromosomima vrste *A. torrentium* nisu primijećene centromerne pruge, a na nekim kromosomima obje vrste su primijećene interkalarne heterokromatinske pruge.

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici PMF-a, Marulićev trg 20/2, Zagreb

Rad sadrži: 42 stranice, 14 slika, 2 tablice, 54 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: rod *Austropotamobius*, Astacidae, kariotip, DAPI

Mentor: Dr. sc. Ivana Maguire, izv. prof.

Pomoćni mentor: Dr. sc. Jelena Mlinarec Novosel, zn. sur.

Ocjenjivači:

.

Zamjena:

Rad prihvaćen:.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Karyological analysis of freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858) and *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803)

Ines Porupski

Rooseveltov trg 6, Zagreb, Croatia

The aim of this study was karyological investigation of the European native crayfish species *Austropotamobius pallipes* and *A. torrentium.* The karyotype of *A. pallipes* consists of 2n=168 chromosomes, while the karyotipe of *A. torrentium* consists of 2n=164. The karyotype formulas are 148m+18sm+2a and 148m+16sm for *A. pallipes* and *A. torrentium*, respectively. Fluorochrome staining with 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) has revealed that the majority of chromosomes of both *A. pallipes* and *A. torrentium* are characterised by large heterochromatic blocks located in the centromeric and pericentromeric positions. Some of *A. torrentium* chromosomes didn't show centromeric bands, while some of the chromosomes of both species revealed presence of intercalary positioned heterochromatc bands.

Thesis is deposited in the Central Biological Library

Thesis includes: 42 pages, 14 figures, 2 tables, 54 references, original in: Croatian

Key Words: genus *Austropotamobius, Astacidae,* karyotype, DAPI

Supervisor: Dr. Ivana Maguire, Assoc. Prof.

Assistent supervisor: Dr. Jelena Mlinarec Novosel, research fellow

Reviewers: Dr.

Substitution: Dr.

Thesis accepted: September, 2014.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
   1.1. Klasifikacija i taksonomski odnosi istraživanih vrsta 1
   1.2. Filogenetski odnosi istraživanih vrsta 1
   1.3. Rasprostranjenost i zoogeografija istraživanih vrsta 3
   1.4. Ugroženost i zaštita istraživanih vrsta 8
   1.5. Biologija istraživanih vrsta rakova 10
      1.5.1. Morfološke značajke 10
      1.5.2. Ekološke značajke 13
      1.5.3. Reprodukcijski ciklus 14
   1.6. Genetska varijacija istraživanih vrsta 14
   1.7. Značajke eukariotskih kromosoma 15
   1.8. Poliploidija 17
   1.9. B kromosomi 17
   1.10. Dosadašnja kariološka istraživanja o rakovima 18
2. CILJ ISTRAŽIVANJA 20
3. MATERIJALI I METODE 21
   3.1. Materijali 21
      3.1.1. Uzorci 21
      3.1.2. Kemikalije 21
      3.1.3. Tehnička pomagala 21
   3.2. Metode 22
      3.2.1. Izrada preparata i fiksiranje 22
      3.2.2. Bojenje 22
      3.2.3. Vizualna obrada preparata i analiza podataka 22
      3.2.4. Izrada kariograma 23
      3.2.5. Statistička obrada podataka 23
4. REZULTATI 24

4.1. Broj kromosoma i struktura kariotipa 24
4.2. Položaj heterokromatinskih pruga na kromosomima istraživanih vrsta 31
5. RASPRAVA 32
6. ZAKLJUČAK 34
7. LITERATURA 35
8. ŽIVOTOPIS 41

1. UVOD

1.1. Klasifikacija i taksonomski odnosi istraživanih vrsta

Potkoljenu Crustacea pripadaju deseteronožni rakovi, red Decapoda, u koji pripada infrared Astacidea Latreille, 1802 s dvije natporodice Astacoidea Latereille, 1802 (rasprostranjena na sjevernoj polutki) i Parastacoidea Huxley, 1879 (rasprostranjena na južnoj polutki). Do danas je unutar ove dvije natporodice opisano oko 650 vrsta (Crandall i Buhay, 2008; De Grave i sur., 2009). U natporodicu Astacoidea spada porodica Astacidae Latreille, 1802 u kojoj se nalaze i vrste istražene u okviru ovog diplomskog: *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858) te *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803).

U slatkovodnim ekosustavima Republike Hrvatske autohtono su rasprostranjeni rodovi *Astacus* (Fabricius, 1775) i *Austropotamobius* (Skorikov, 1907), te alohtoni rodovi *Pacifastacus* (Bott, 1950) i *Orconectes* (Cope, 1872).

1.2. Filogenetski odnosi istraživanih vrsta

Od svih organizama u Metazoa, potkoljeno Hexapoda se nalazi na prvom mjestu po ukupnom broju različitih vrsta, dok se potkoljeno Crustacea nalazi na četvrtom mjestu. No prema morfološkoj raznolikosti, Crustacea nadmašuje sve druge skupine (Martin i Davis, 2001). Zbog toga se analiza morfoloških značajki dugi niz godina tradicionalno koristila za definiciju vrsta te za određivanje njihovih evolucijskih i filogenetskih odnosa (Fetzner i Crandall, 2002; De Grave i sur., 2009). Mnogi rakovi imaju plastične i/ili konvergentne morfološke karakteristike koje su posljedica prilagodbi na okoliš u kojem žive, stoga klasifikacija pomoću morfologije nije uvijek pouzdana (Fetzner i Crandall, 2002). Füreder i Machino (2002) navode kako je u posljednjem stoljeću bilo puno grešaka u determiniranju slatkovodnih vrsta rakova. Razlozi grešaka u determiniranju su razni, no najviše pogrešno određenih vrsta rakova je bilo na temelju određivanja vrste prema tjelesnom obojenju.

Primjena molekularnih metoda je značajno promijenila znanstveni svijet, stoga su znanstvenici stvorili nove klasifikacije bazirane na morfološkim i molekularnim podacima (Fetzner i Crandall, 2002; De Grave i sur., 2009). Iako je kombinacija molekularnih i morfoloških istraživanja dala doprinos u razrješavanju evolucijskih i filogenetskih odnosa, danas ti odnosi još uvijek nisu u potpunosti jasni.

Prema dosadašnjim filogenetskim istraživanjima, većina znanstvenika predlaže da se infrared Astacidea smatra monofiletskom skupinom (Crandall i sur., 2000; Martin i Davis, 2001; Scholtz, 2002; Sinclair i sur., 2004; De Grave i sur., 2009). Natporodice Astacoidea i Parastacoidea također se smatraju monofiletskim skupinama i sestrinske su grupe morskoj natporodici Nephropoidea (Crandall, 2000; De Grave i sur., 2009).

Porodice Astacidae i Cambaridae se općenito smatraju monofiletskim skupinama (Martin i Davis, 2001; De Grave i sur., 2009), dok Scholtz (2002) i Sinclair i sur. (2004) smatraju da nema dovoljno podataka za potvrdu njihovog monofiletskog porijekla. Crandall (2000) i Scholtz (2002) predlažu da se ove dvije porodice smatraju parafiletskim skupinama zbog povezanosti roda *Cambaroides* s porodicom Astacidae.

Iako je taksonomija slatkovodnih rakova na višim razinama relativno jasna, na razini roda i vrste postoji nesuglasnost zbog velike morfološke i molekularne raznolikosti između vrsta. Otežavajuća je činjenica da postoji mali broj obavljenih filogenetskih istraživanja na razini roda (Crandall i Bauhay, 2008).

Porodica Astacidae sastoji se od tri roda: *Astacus*, *Austropotamobius* i *Pacifastacus*, koji su sestrinske skupine (Martin i Davis, 2001). Prema istraživanju Trontelj i sur. (2005) dokazano je da su vrste roda *Austropotamobius* monofiletičkog porijekla te da su sestrinske skupine.

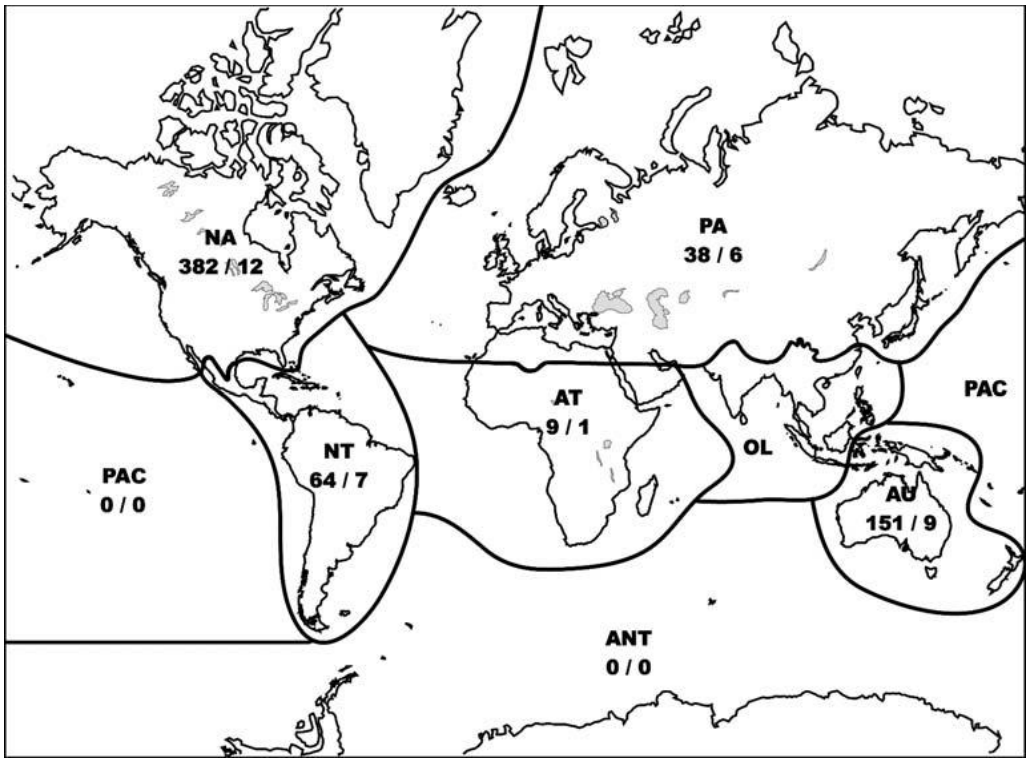
Taksonomija vrste *Austropotamobius pallipes* je desetljećima neriješena (Trontelj i sur., 2005; Śmietana i sur., 2006) zbog čega se preporučuje nazvati *A. pallipes* kompleksom vrsta (Holdich, 2002). Većina istraživanja na temelju molekularne filogenije, u kojima je korištena mitohondrijska DNA, su rađena na vrsti *A. pallipes* (Zaccara i sur., 2004, 2005; Fratini i sur., 2005, Trontelj i sur. 2005). Istraživanja su pokazala da *A. pallipes* kompleks vrsta ima visoku genetsku raznolikost unutar i između različitih populacija. Na temelju

molekularno-filogenetskih analiza, mnogi autori smatraju da postoje dvije dobro definirane vrste unutar ovog kompleksa, *A. pallipes* i *A. italicus*. *Austropotamobius italicus* još uvijek nije taksonomski službeno priznata kao vrsta i trenutno ju se smatra podvrstom, iako ju mnogi autori smatraju odvojenom vrstom (Zaccara i sur., 2004, 2005; Fratini i sur., 2005; Trontelj i sur., 2005; Catudella i sur., 2006).

Vrsta *Austropotamobius torrentium* je slabo proučavana na taksonomskoj i filogenetskoj razini, za razliku od vrste *A. pallipes* (Klobučar i sur., 2013). Provedene su analize na temelju mitohondrijske DNA iz čitave Europe (Trontelj i sur., 2005) u kojoj je otkriveno da vrsta *A. torrentium* ima visoku genetsku raznolikost, pri čemu je utvrđena haplotipska različitost vrste. Rezultati se podudaraju s nedavnim istraživanjem Klobučara i sur. (2013). U istraživanju je utvrđeno 7 značajno divergentnih filogrupa. Zbog toga postoji mogućnost postojanja kriptičnih vrsta unutar vrste *A. torrentium*. Kako filogenetski status vrsti *A. pallipes* i *A. torrentium* i dalje nije u potpunosti rasvijetljen, potrebna su daljnja istraživanja.

1.3. Rasprostranjenost i zoogeografija istraživanih vrsta

Slatkovodni rakovi infrareda Astacidea zabilježeni su na gotovo svim kontinentima. Mjesta koja ne naseljavaju su Antarktik, dio Azije te Afrika bez Madagaskara (Taylor, 2002; Crandall i Buhay, 2008). Njihovi centri raznolikosti, tj. njihova žarišta raznolikosti, se nalaze na jugoistoku SAD-a na sjevernoj polutki, te u jugoistočnoj Australiji na južnoj polutki (Slika 1) (Crandall i Bauhay, 2008).

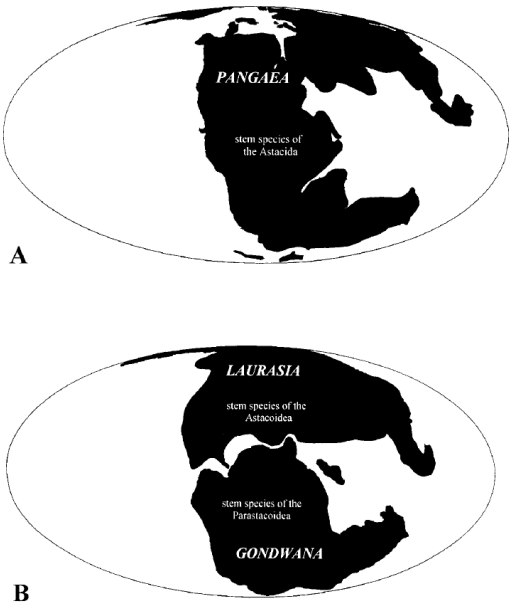


Slika 1. Raznolikost slatkovodnih rakova u svijetu (broj vrsta/broj rodova) (Crandall i Buhay, 2008).

Taksonomska podjela dvije natporodice infrareda Astacidea je u skladu sa zoogeografskom raspodjelom. Naime, natporodica Astacoidea je rasprostranjena na sjevernoj polutki, dok je natporodica Parastacoidea rasprostranjena na južnoj polutki (Crandall, 2000). Evolucijsku povijest slatkovodnih rakova infrareda Astacidea možemo objasniti sagledavanjem dokaza na temelju filogenetske analize i paleontoloških nalaza te uzimajući u obzir trenutnu rasprostranjenost slatkovodnih rakova. Naime, rakovi (Crustacea) su jedna od najstarijih skupina organizama, a njihovi najstariji fosilni nalazi su iz doba Kambrija (Martin i Davis, 2001). Prema paleontološkim dokazima, preci rakova reda Decapoda su prvotno obitavali u morskim staništima, a za posljednjeg zajedničkog pretka Astacidea pretpostavlja se da je isprva obitavao u morskom okolišu, da bi s vremenom prešao u slatkovodna staništa i u njima se proširio. Zbog adaptacije na novo stanište, tadašnji Crustacea su razvili raznolika ekološka obilježja slična današnjim

rakovima. Pretpostavlja se da je taj evolucijski proces imao za posljedicu nastanak velikog broja slatkovodnih vrsta naspram morskih (Scholtz, 2002).

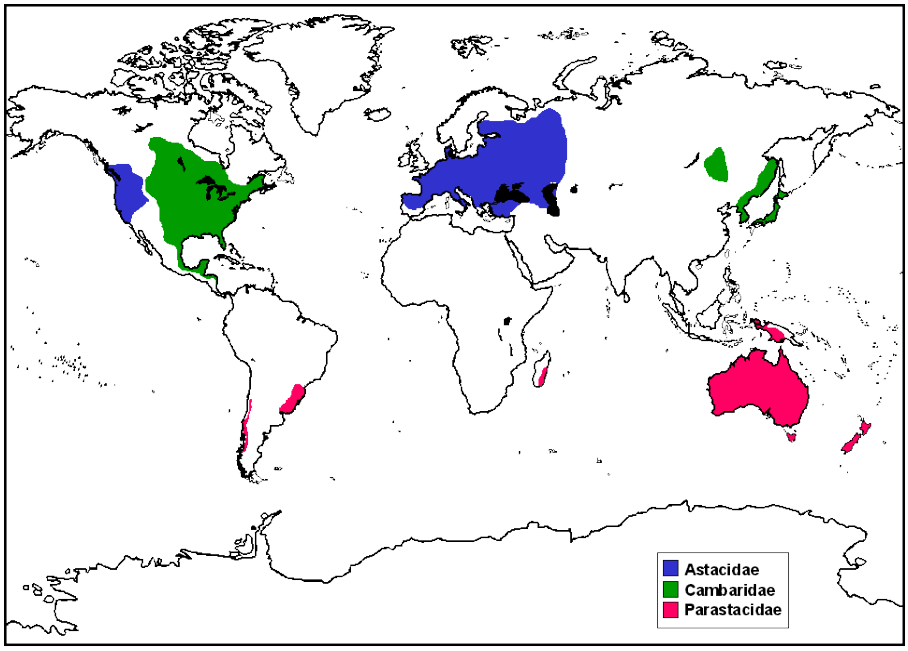
Prema paleontološkim dokazima, najstariji pronađeni fosili slatkovodnih rakova su iz doba Trijasa, u doba kada je postojao superkontinent Pangea. S obzirom na ekologiju modernih rakova, njihovo monofiletsko porijeklo te paleontološke dokaze, pretpostavlja se da je njihov najstariji zajednički predak postojao na superkontinentu Pangea u slatkim vodama (Scholtz, 2002). Kako je još u Trijasu postojao superkontinent Pangea, na prijelazu u Juru se dogodilo odvajanje superkontinenta na dva dijela, sjeverni kontinent Laurasiu te na južni kontinent Gondvanu. Tijekom tog procesa dolazi do geografskog odvajanja skupine i njihove odvojene evolucije, što se jasno može vidjeti u analizi filogenetskih odnosa. Na sjevernom kontinentu Laurasiji je evoluirala natporodica Astacoidea, dok je na južnom kontinentu Gondvani nastala natporodica Parastacoidea (Slika 2) (Crandall, 2000; Scholtz, 2002; Crandall i Buhay, 2008).



Slika 2. Paleogeografija i evolucija slatkovodnih rakova. **A)** Superkontinent Pangea u prijelazu s perioda Trijasa na Juru. **B)** U kasnoj Juri Pangea se podijelila na sjeverni kontinent Laurasia s natporodicom Astacoidea i južni Gondvana s natporodicom

Parastacoidea (Scholtz, 2002).

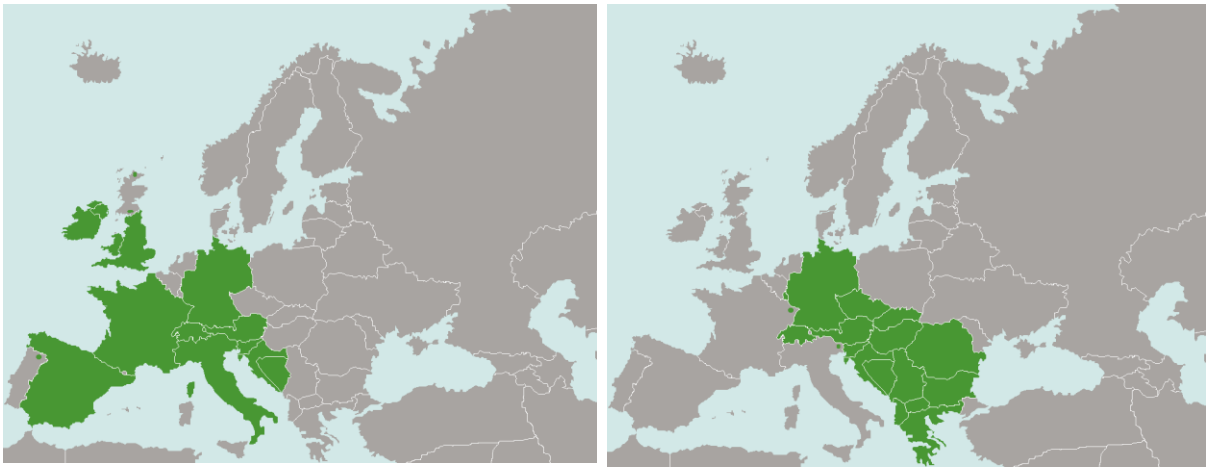
Postoje razne teorije za objašnjenje današnje geografske rasprostranjenosti, kao i za morfološke i ekološke razlike porodice Astacidae i Cambaridae (natporodica Astacoidea). Jedna od najvjerojatnijih je da su veliku ulogu u nastajanju porodica imali geografsko odvajanje Laurasije na moderne kontinente te kasnija ledena doba (Scholtz, 2002). Danas porodica Astacidae prirodno nastanjuje Europu, porodica Cambaridae Sjevernu Ameriku i istok Azije, a porodica Parastacidae (natporodica Parastacoidea) Južnu Ameriku i Australiju (Slika 3) (Crandall i sur., 2000; Taylor, 2002).



Slika 3. Geografska rasprostranjenost porodica slatkovodnih rakova u svijetu (Fetzner, 2010).

Sjeverni dio zemljine polutke, odnosno područje Europe zapadno od Urala, danas naseljava pet autohtonih vrsta rakova iz porodice Astacidae: *Astacus astacus, Astacus leptodactylus, Astacus pahypus, Austropotamobius pallipes* i *Austropotamobius torrentium*. Istraživana vrsta *Austropotamobius pallipes* je rasprostranjena u južnoj i zapadnoj Europi

uključujući Britanske otoke, a vrsta *Austropotamobius torrentium* je rasprostranjena u središnjoj i jugoistočnoj Europi (Slika 4) (Holdich, 2002; Taylor, 2002).



Slika 4. Geografska rasprostranjenost vrsta *Austropotamobius pallipes* (lijevo) i *Austropotamobius torrentium* (desno) (Holdich, 2002).

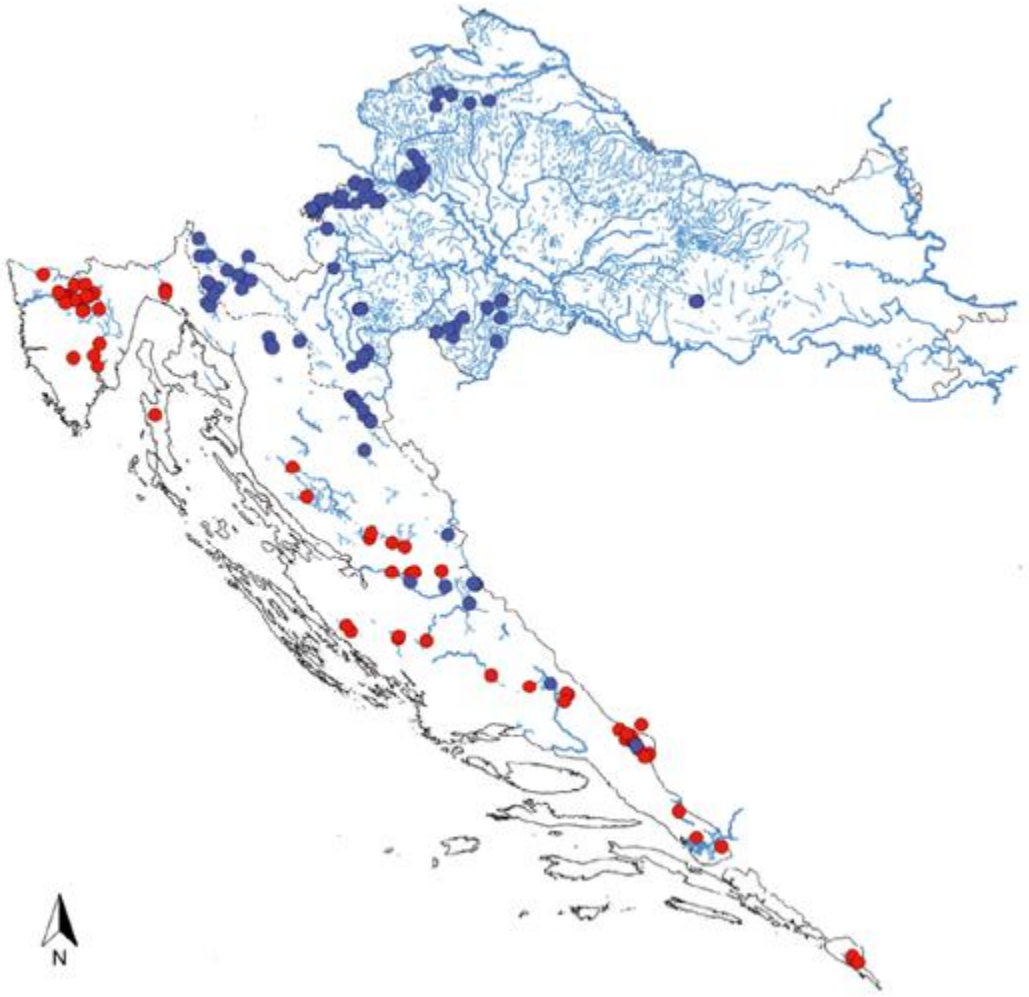
Osim autohtonih vrsta, u Europi su prisutne i alohtone vrste iz porodice Astacidae (*Pacifastacus leniusculus*) i Cambaridae (*Oroconects limosus* te *Procambarus clarkii*). U Europi je također zabilježena prisutnost australskih vrsta roda *Cherax*, iz porodice Parastacoidea (Holdich, 2002; Maguire i Gottstein-Matočec, 2004).

Kao što je spomenuto, zbog neriješenih filogenetskih odnosa i taksonomskih položaja, točan broj europskih vrsta unutar porodice Astacidae je još uvijek predmet rasprave među znanstvenicima, posebno za vrste *A. leptodactylus* (Śmietana i sur., 2006; Maguire i Dakić, 2011; Maguire i sur., 2014) i *A. pallipes* (Trontelj i sur. 2005).

U Republici Hrvatskoj, prema dosadašnjim istraživanjima, utvrđene su 4 autohtone europske vrste: *A. pallipes, A. torrentium, A. astacus* te *A. leptodactylus* (Maguire i Gottstein-Matočec, 2004; Maguire i sur., 2011). Od alohtonih vrsta utvrđene su *Pacifastacus leniusculus* i *Orconectes limosus* (Maguire i Gottstein-Matočec, 2004; Hudina i sur., 2009; Maguire i sur., 2011).

Prema Maguire i Gottstein-Matočac (2004) i Maguire i sur. (2011) zabilježeno je da je kompleks vrsta *A. pallipes* rasprostranjen na jugu i jugozapadu Hrvatske u rijekama

jadranskog sliva, a vrsta *A. torrentium* se može pronaći na višim nadmorskim visinama u kontinentalnom dijelu Hrvatske (Slika 5).



Slika 5. Geografska rasprostranjenost *Austropotamobius pallipes* kompleks vrsta (crvene točke) i vrste *Austropotamobius torrentium* (plave točke) u Republici Hrvatskoj (Maguire i sur., 2011).

1.4. Ugroženost i zaštita istraživanih vrsta

Nedavna istraživanja u Europi i Hrvatskoj zabilježila su značajan pad broja jedinki

autohtonih vrsta rakova roda *Astacus* i *Austropotamobius*. Najveći pad u broju vrsta je zabilježen kod vrste *Austropotamobius pallipes* (Maguire i sur., 2011). Postoji mnogo razloga koji uzrokuju smanjivanje broja jedinki i populacija rakova, a najčešći su klimatske promjene kao što su ekstremne suše te antropogeni utjecaji na stanište. Već dugi niz godina antropogeni utjecaj na prirodni okoliš je značajan. Širenjem poljoprivrede, industrijalizacijom ili izgradnjom građevinskih objekata uzrokuje se degradacija i fragmentacija prirodnog staništa. Poseban utjecaj na rakove ima regulacija vodenih tokova i izgradnja kanala. Osim smanjivanja staništa, urbanizacije i industrijalizacije, u okoliš se unose različite otpadne tvari opasne po ekosustave. Za smanjivanje broja populacija je zaslužan i prekomjeran nekontroliran izlov pojedinih vrsta (Taylor, 2002; Maguire i sur, 2011).

Ipak, najveću prijetnju autohtonim slatkovodnim rakovima predstavljaju invazivne strane vrste rakova. Krajem 19. stoljeća su unesene američke alohtone vrste u europska slatkovodna staništa radi uzgoja u akvakulturi (Taylor, 2002; Maguire i Gottstein-Matočec, 2004; Crandall i Buhay, 2008). Unesene su zbog svoje prilagodljivosti prema različitim staništima i velike fertilnosti, no ubrzo su se proširile i nije ih bilo moguće držati pod kontrolom. Uz to, zbog svoje agresivne kompetitivnosti za hranu i stanište, unesene vrste su učinile više štete nego koristi u europskim slatkovodnim staništima (Maguire i Gottstein-Matočec, 2004).

Postoji još jedna opasnost koja ima značajan utjecaj na populaciju autohtonih rakova, a to je pojava bolesti račje kuge koju uzrokuje gljivica *Aphanomyces astaci* Schikora, 1906 (Oomycetes). Dokazano je da su alohtoni rakovi otporni na račju kugu te su prijenosnici spomenute bolesti, dok su autohtoni rakovi podložni toj pogubnoj bolesti. Upravo ta sposobnost prijenosa račje bolesti daje prednost alohtonim vrstama u potiskivanju populacija autohtonih rakova (Taylor, 2002; Maguire i Gottstein-Matočec, 2004).

Kao što je spomenuto, u Republici Hrvatskoj su zabilježene alohtone vrste *Pacifastacus leniusculus* te *Orconectes limosus* (Hudina i sur., 2009; Maguire i sur., 2011). Prema podacima Maguire i sur. (2011) alohtone vrste utječu na smanjivanje broja vrste

roda *Astacus*. Do sada nije zabilježen utjecaj invazivnih vrsta rakova na vrste roda *Austropotamobius*, no invazivne vrste i dalje predstavljaju prijetnju svim autohtonim rakovima u Hrvatskoj i Europi (Taylor, 2002; Maguire i sur., 2011).

Iz priloženog vidimo s kolikim se prijetnjama slatkovodni rakovi suočavaju, a posebno treba naglasiti da većina slatkovodnih rakova ima usku ekološku valenciju što ih čini ugroženima (Crandall i Buhay, 2008). Na međunarodnoj razini broj vrsta roda *Astacus* i *Austropotamobius* je toliko smanjen da su uvršteni u Crveni popis ugroženih svojti Međunarodne unije za zaštitu prirode (IUCN). Vrsta *Austropotamobius pallipes* je uvrštena u kategoriju ugroženosti kao ugrožena vrsta (EN), a vrsta *A. torrentium* kao nedovoljno poznata vrsta (DD). Također, vrste *A. pallipes* i *A. torrentium* štiti Dodatak III Konvencije o zaštiti europskih divljih vrsta i prirodnih staništa (Bernska konvencija, 2002), te Dodatak II i Dodatak V Europske direktive o zaštiti prirodnih staništa i divlje faune i flore (2007).

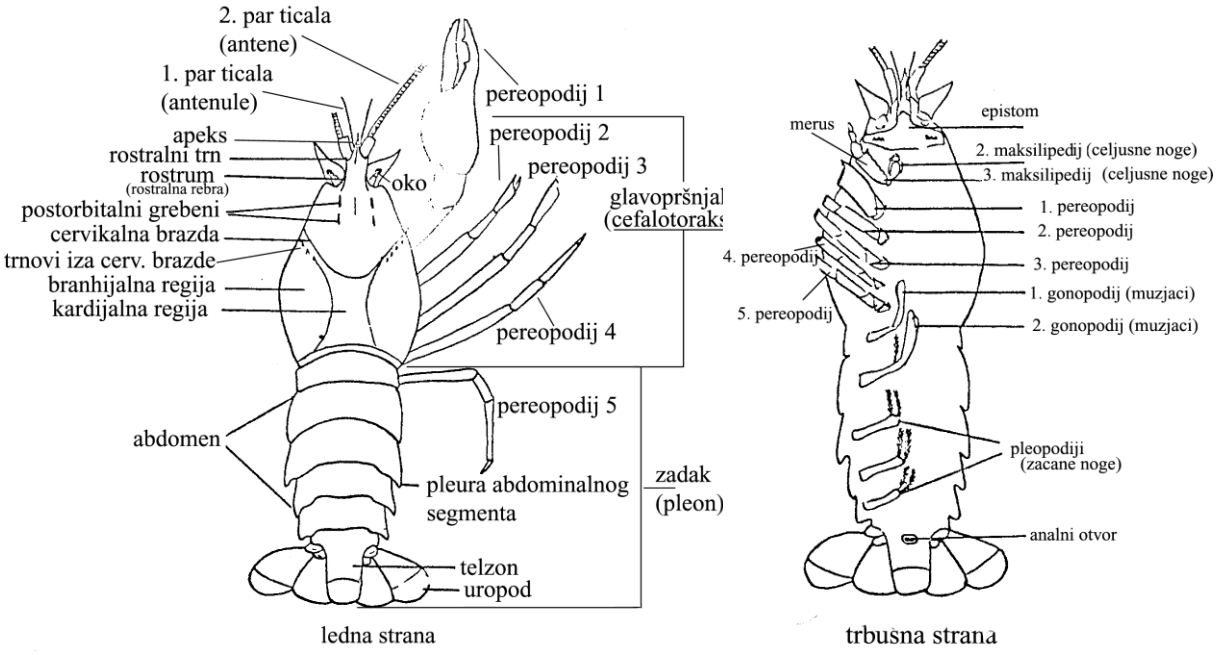
U Republici Hrvatskoj su prema Gottstein i sur. (2011) rakovi roda *Austropotamobius* uvršteni u Crveni popis, gdje je vrsta *A. pallipes* uvrštena u kategoriju ugroženosti kao ugrožena vrsta (EN), a vrsta *A. torrentium* kao osjetljiva vrsta (VU). Također, rod *Austropotamobius* je zaštićen Zakonom o zaštiti prirode (NN 80/13) te Pravilnikom o proglašavanju divljih svojti zaštićenim i strogo zaštićenim (NN 99/09).

1.5. Biologija istraživanih vrsta rakova

1.5.1. Morfološke značajke

Zajednička morfološka značajka rakova porodice Astacidae je tagmatizacija tjelesnih kolutića u dvije funkcionalne cjeline, glavopršnjak (cefalopereon ili cefalotoraks) i zadak (pleon). Glavopršnjak pokriva kožni nabor ili kora (karapaks) koji ima zaštitnu funkciju, te je sastavljen od: pomičnih stapkastih očiju, dva para ticala (atenula i atena), čeljusti (gornja čeljust odnosno mandibula i dva para donjih čeljusti odnosno maksilula i maksila), tri para čeljusnih nožica (maksilipediji) i pet pari noga za hodanje (pereopodiji). Zadak je sastavljen od pet pari članaka koji nose plivaće nožice (pleopodiji) i repne peraje

koja se sastoji od uropoda i telzona. Kod mužjaka su prva dva para plivaćih nožica pretvorena u kopulatorne organe, a kod ženki je prvi par reduciran (Slika 6) (Maguire, 2010).



Slika 6. Vanjska morfologija rakova (preuzeto iz Maguire, 2010).

Svaki rod i vrsta imaju morfološka obilježja po kojima ih možemo lako razlikovati od drugih. Kao što je rečeno, za definiciju vrsta se uvelike koristi morfološka analiza pa ću spomenuti najznačajnije morfološke značajke pomoću kojih možemo odrediti vrste istraživane u ovom diplomskom radu (Tablica 1) (Slika 7).



Slika 7. *Austropotamobius torrentium* (lijevo) i *Austropotamobius pallipes* (desno) (Rakovi, 2014)

Tablica 1. Morfološke značajke za određivanje vrsta roda *Austropotamobius* (Prilagođeno prema Füreder i Machino, 2002 i Maguire, 2010).

KRITERIJI \ VRSTA	***Austropotamobius torrentium***	***Austropotamobius pallipes***
ROSTRALNA REBRA	niska, trokutasto položena i glatka	trokutast ili trapezoidan
ROSTRALNI TRNOVI	prisutno, vrlo malo	prisutno
ROSTRALNA KRESTA	prisutno ili neznatno primjetno	prisutno
UDUBLJENJE NA UNUTRAŠNJEM RUBU NEPOKRETNOG PRSTA KLIJEŠTA	vrlo izraženo, kod regeneriranih kliješta manje izraženo	nije prisutno
IZGLED KLIJEŠTA	vrlo velika i široka	
POVRŠINA KLIJEŠTA	velike i grube granule	sitne granule
POSTORBITALNI GREBENI	1 par	1 par, a ponekad je 2. par neznatno primjetan
TRNOVI IZA CVERKALNE BRAZDE	nije prisutno	prisutno, jedan do nekoliko jače izraženih trnova
TALON NA 2. PLEOPODU KOD MUŽJAKA	ponekad prisutno, ponekad ne	prisutno

BOJA TIJELA	tamnosmeđa do maslinastozelena, moguće svijetle ili plave boje	zeleno-brončana do siva boja s bijelom trbušnom stranom

Vrsta *A. pallipes* tokom života naraste maksimalno do 14 cm, dok *A. torrentium* naraste do 10-tak cm. U rakova postoji spolni dimorfizam; naime nakon postizanja spolne zrelosti mužjacima alometrijski rasu kliješta, a ženkama zadak (kao prilagodba za nošenje jaja) (Maguire, 2010).

1.5.2. Ekološke značajke

Zbog svoje velike morfološke raznolikosti, rakovi porodice Astacidae su prilagođeni na različita staništa, ali svima je zajednička značajka da preferiraju staništa raznolike strukture dna kako bi se mogli zakloniti ili sami iskopati zaklon (Taylor, 2002; Maguire i Gottstein-Matočec, 2004).

Vrste roda *Austropotamobius* nalazimo u tekućicama, ali se mogu naći i u stajaćicama (Füreder i sur., 2010). Staništa u kojem obitava vrsta *A. torrentium* nalaze se na višim nadmorskim visinama, obično u izvorišnim i gornjim dijelovima potoka, u tekućicama brzog strujanja i kamenitog dna (Maguire i Gottstein-Matočec, 2004; Füreder i sur., 2010). Vrstama roda *Austropotamobius* odgovaraju hladnije temperature vode pri čemu vrsta *A. pallipes* preferira tekućice čija je prosječna godišnja temperatura do 16°C, a *A. torrentium* do 10°C (Maguire i Gottstein-Matočec, 2004). Vrsti *A. pallipes* odgovaraju tekućice sporijeg strujanja uzduž obale, s pjeskovitim i kamenitim dnom gdje je razvijena vodena vegetacija (Gottstein i sur., 1999; Maguire i Gottstein-Matočec, 2004; Maguire, 2010). Ova vrsta nije tolerantna na zagađenje okoliša (Gottstein i sur., 1999; Maguire i Gottstein-Matočec, 2004).

Rakovi imaju raznoliku prehranu, ali su i sami plijen drugim većim predatorima, stoga su važan dio hranidbenih lanaca. Prehrana im se bazira na manjim životinjama, vodenoj vegetaciji i detritusu (Gottstein i sur., 1999; Nyström, 2002). Veličina populacije

ovisi o dostupnosti i količini hrane (Gottstein i sur., 1999). Rakovi su većinom noćne životinje, no zabilježena je i dnevna aktivnost kod nekih vrsta za vrijeme parenja, pa i kod vrste *A. torrentium* (Skurdal i Taugbøl, 2002; Maguire, 2010).

1.5.3. Reprodukcijski ciklus

Razmnožavanje rakova porodice Astacidae ovisi o klimatskim uvjetima i uvjetima staništa te posebno o temperaturi (Reynolds, 2002). Sezona parenja započinje na jesen kad padnu temperature. Trajanje parenja može biti od dva do tri tjedna. Nakon parenja, od nekoliko sati do šest tjedana, dolazi do oplodnje i izlijeganja jajašaca. Oplođena jajašca nosi ženka između pleopodnih nožica do sljedećeg ljeta, a razvoj jajašaca i vrijeme izlijeganja ovise o temperaturi vode. Primijećena je povezanost između broja jajašaca i veličine ženke; veće ženke nosit će više jajašaca. Nakon što se juvenilni rakovi izlegu, nekoliko dana žive na ili u blizini majke, a zatim postaju samostalni. Rast nastavljaju kroz periodična presvlačenja tijekom toplijeg dijela godine (Reynolds, 2002; Maguire, 2010). Broj presvlačenja ovisi o dostupnosti hrane i temperaturi; u povoljnijim uvjetima se češće presvlače (Reynolds, 2002).

Vrsta *Austropotamobius pallipes* spolnu zrelost dostiže između 2. i 3. godine života. Sezona parenja u Republici Hrvatskoj počinje u listopadu, a juvenilni rakovi se izliježu od kasnog ožujka do kraja svibnja. Vrsti *A. torrentium* sezona parenja počinje u studenom, a juvenilni rakovi se izliježu do lipnja (Maguire i sur., 2002).

1.6. Genetska varijacija istraživanih vrsta

Pojavom molekularnih metoda dokazana je velika varijabilnost i na razini gena kod deseteronožnih rakova (Decapoda) (Lécher i sur, 1995). Genetska varijabilnost je bitna jer služi kao indikator potencijalne adaptacije vrsta na promjene u okolišu. Što je genetska varijabilnost neke vrste manja, veći je rizik njezina izumiranja. Procjena genetske varijabilnosti unutar vrste omogućava nam identifikaciju strukture populacije koja nam

pomaže u donošenju pravilnih mjera za očuvanje vrste (Fetzner i Crandall, 2002).

Jedna od metoda za otkrivanje intra- i interspecijske genetske varijabilnosti su analize broja i morfologije diploidnih kromosoma (Lécher i sur., 1995; Fetzner i Crandall, 2002). Prema broju diploidnih kromosoma koje nalazimo kod deseteronožnih rakova (Decapoda), najvarijabilnijim se pokazao infrared Astacidea. Također, kod nekih vrsta je primijećen polimorfizam u broju kromosoma (Lécher i sur., 1995; Coluccia i sur., 2004).

Proučavanje rakova na temelju genetske varijabilnosti broja kromosoma unutar vrste i između vrsta može imati važnu ulogu u razumijevanju evolucije i u pojašnjavanju filogenetskih odnosa (Fetzner i Crandall, 2002).

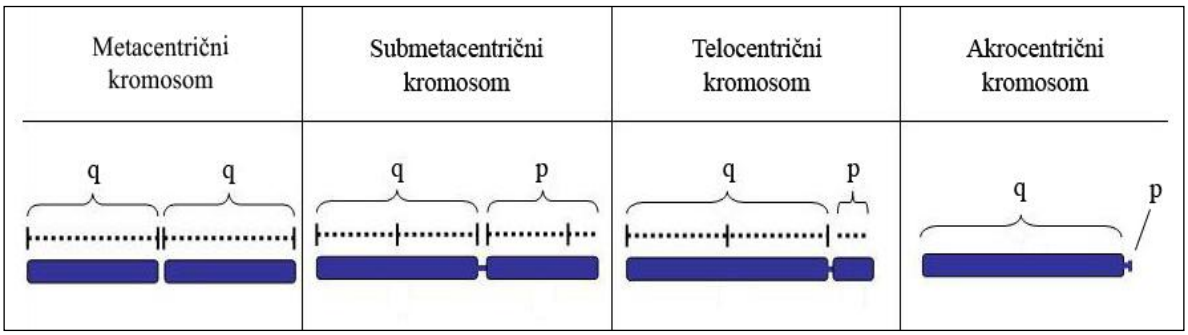
1.7. Značajke eukariotskih kromosoma

Kromosom je građen od kromatina, a kromatin je građen od jedne dvolančane molekule DNA i određenih proteina. Kromatinska struktura nije jednaka cijelom dužinom kromosoma. Za vrijeme interfaze jedan dio kromosoma ostaje visoko kondenziran i transkripcijski neaktivan; to je heterokromatin. Ostatak kromosoma, odnosno eukromatin, se dekondenzira i raspoređuje po jezgri pri čemu je genetski aktivan (Tamarin, 2002). U heterokromatskim regijama su primijećene ponavljajuće sekvence zvane satelitna DNA. Najčešće se nalaze oko centromera i na krajevima kromosoma. Većina tih sekvenci je transkripcijski neaktivna i posjeduje strukturnu funkciju (Plohl, 2010). Primjer satelitne DNA su geni za rRNA, stoga su vrlo često korišteni u filogenetskim istraživanjima jer sadrže velik broj kopija i sekvence koje su jednake za velik broj vrsta (Fetzner i Crandall, 2002).

Postoji nekoliko tehnika bojenja kromosoma pri čemu se otkrivaju različite regije kromosoma. Pomoću ovih tehnika mogu se razlikovati tri osnovna tipa kromatina: eukromatin, konstitutivni i interkalarni heterokromatin. Konstitutivni heterokromatin je bogat satelitskom DNA i okružuje centromeru, dok se interkalarni heterokromatin nalazi po cijeloj dužini kromosoma (Tamarin, 2002). U širokom rasponu tehnika kromosomskog pruganja najčešće je u istraživanjima korištena tehnika bojenja po Giemsi. U ovom

diplomskom radu je korišteno fluorescencijsko bojenje, 4,6-diamidino-2-fenilindol ili DAPI koji se interkalira u AT bogate heterokromatske regije DNA (Thermo 2014).

Centromera je specijalizirana regija eukariotskog kromosoma koja je ključna za pravilnu segregaciju kromosoma ili sestrinskih kromatida u dvije stanice kćeri tijekom mitoze ili mejoze stanica. Na metafaznim kromosomima možemo primjetiti suženje na kromosomu gdje se nalazi centromera. To suženje se zove primarno suženje kromosoma (Vagnarelli i sur., 2008). Kod nekih kromosoma, osim centromera, postoje dodatna suženja koje zovemo sekundarna suženja i oni nemaju nikakvu ulogu pri diobenoj seregaciji. Prema Levan i sur. (1964) kromosome s obzirom na položaj centromere dijelimo na metacentrične (r=1-1,7), submetacentrične (r=1,7-3), telocentrične (r=3-7) i akrocentrične (r>7), gdje je r omjer duljine krakova kromatida (Slika 8). Kraći krak je označen slovom p, dok je duži krak označen slovom q.



Slika 8. Klasifikacija kromosoma prema položaju centrometre (prilagođeno prema GeneticSuite, 2014).

Ukupni kromosomski set odnosno kariotip se najbolje vidi mikroskopom tijekom mitoze. Shematski prikaz svih kromosoma se zove idiogram, a kariogram je aranžman fotografiranih kromosoma prema veličini i položaju centromere (Tamarin, 2002).

Kod deseteronožnih rakova (Decapoda) kromosomi često imaju oblik utega, štapića, sferoida ili čak u obliku slova V (Lécher i sur., 1995).

1.8. Poliploidija

Eukariotske vrste posjeduju konstantan broj kromosoma. U organizmu većine eukariota somatske stanice imaju diploidni broj kromosoma, no njihove spolne stanice, odnosno gamete, sadrže haploidni broj kromosoma. Promjena u broju kromosomu nastaje zbog kromosomskih anomalija. Ako promjena uključuje cijeli kromosomski set, naziva se euploidija, a ako uključuje samo pojedine kromosome, naziva se aneuploidija (Tamarin, 2002). Euploidna promjena kod koje dolazi do pojave većeg broja setova kromosoma u stanici se naziva poliploidija.

Poliploidne promjene u biljaka su česte, pri čemu su poliploidne biljke otpornije i prilagodljivije od onih koji to nisu. Poliploidne promjene nisu samo pronađene kod biljaka, već i kod beskralježnjaka i nižih kralježnjaka (Rousseau-Gueutin i sur., 2009). Utjecaj poliploidije na životinjske organizme je uglavnom štetan pri čemu može doći do poremećaja u stvaranju vijabilnih gameta, no djelovanje može biti i letalno (Sellars i sur., 2010). Zabilježen je utjecaj poliploidije u evoluciji mnogih eukariota, pri čemu poliploidija djeluje kao jaka evolucijska sila (Lécher i sur., 1995; Soltis i Soltis, 1999).

1.9. B kromosomi

U eukariotskim organizmima postoji standardni set kromosoma koji se nazivaju A kromosomima. Ipak, u većini vrsta životinja, biljaka i nekim vrstama gljiva uočeni su B kromosomi. Ti posebni kromosomi su dodatni kromosomi priključeni standardnom kromosomskom setu (A kromosomima), a zovu se još i prekobrojni kromosomi (Camacho i sur., 2000). B kromosomi su većinom heterokromatski i nose ribosomalne gene, dok ih je većina transkripcijski inaktivna (Marscher i sur., 2007). Stoga B kromosomi uglavnom nemaju utjecaja na normalnu funkciju organizama. Ne prate Mendelove zakone nasljeđivanja niti sudjeluju u rekombinaciji, zbog čega su prisutni u nekim jedinkama populacije dok u drugim jedinkama nisu (Camacho i sur., 2000). B kromosomi mogu biti uzrok inter- i intraspecijske varijacije diploidnog broja kromosoma (Leitao i sur., 2008).

Porijeklo B kromosoma još uvijek nije u potpunosti utvrđeno. Uvriježeno mišljenje je da su B kromosomi nastali različitim mehanizmima kod različitih organizama. Kod vrste *Crepis capillaris* se smatra da su B kromosomi nastali od A kromosoma iste vrste, a kod vrste *Leiopelma hochstetteri* od spolnih kromosoma. Međusobnim križanjem blisko srodnih vrsta *Coix aquaticus* i *C. gigantea* je utvrđeno moguće porijeklo B kromosoma križanjem među vrstama (Camacho i sur., 2000).

Kod deseteronožnih rakova (Decapoda) zabilježena je visoka varijabilnost u broju kromosoma, a uzrokom se smatraju B kromosomi. Kod Decapoda su zabilježeni veličinom mali i veliki B kromosomi, pri čemu su se mali B kromosomi pojavljivali češće (Coluccia i sur., 2004).

1.10. Dosadašnja kariološka istraživanja o rakovima

Danas postoji vrlo mali broj dostupnih molekularno-citogenetičkih istraživanja na slatkovodnim rakovima. Razlog tomu je što rakovi kao skupina nisu jednostavan model za istraživanje (Lécher i sur., 1995; Fetzner i Crandall, 2002). Većina vrsta slatkovodnih rakova ima velik broj kromosoma koji su veličinom mali i zbog toga su kariološke analize otežane. Također, postoji velika varijabilnost među jedinkama, unutar vrste te između vrsta što može uzrokovati poteškoće u analizi (Lécher i sur., 1995; Fetzner i Crandall, 2002; Coluccia i sur., 2004). Prema postojećim istraživanjima, slatkovodni rakovi infrareda Astacidea pokazuju najveću raznolikost u broju kromosoma (Tablica 2).

Rezultati kariološko-citogenetičkih istraživanja roda *Austropotamobius* su dosad objavljeni samo u jednom preliminarnom radu (Mlinarec i sur., 2013) i ukazuju da je diploidni broj kromosoma vrste *A. torrentium* 2n=174.

Tablica 2. Usporedba diploidnog broja kromosoma između porodica rakova iz infrareda Astacidea.

PORODICA	IME VRSTE	2n	AUTORI
Astacidae	*Astacus astacus*	176	Mlinarec i sur., 2011
	Astacus leptodactylus	180	Mlinarec i sur., 2011
	Austropotamobius torrentium	174	Mlinarec i sur., 2013
	Pacifastacus leniusculus	376	Niiyama, 1962
Cambaridae	*Cambaroides japonicus*	196	Niiyama, 1934
	Procambarus clarkii	188	Murofushi i sur., 1984
	Procambarus digueti	102	Diupotex Chong i sur., 1997
	Procambarus llamasi	120	Indy i sur., 2010
Parastacidae	*Cherax destructor*	188	Scalici i sur., 2010
	Cherax quadricarinatus	200	Tan i sur., 2004
Nephropidae	*Homarus americanus*	135-136	Coluccia i sur., 2001
	Nephrops japonicus	136	Murofushi i sur., 1984
	Nephrops norvegicus	131-140	Deiana i sur., 1996

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Rezultati molekularno-citogenetičkih istraživanja mogu pomoći u razjašnjavanju filogenetskih odnosa među vrstama/podvrstama kao i u zaključivanju o taksonomskim pozicijama istraživane skupine. Činjenica je da su filogenetski odnosi vrsta/podvrsta roda *Austropotamobius* kao i njihov taksonomski status neriješeni, te ne postoje molekularno-citogenetička istraživanja na vrstama ovog roda. Stoga je cilj ovog istraživanja po prvi puta istražiti broj kromosoma i kariološke značajke vrsti *Austropotamobius pallipes* i *A. torrentium*.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci

U istraživanju sam koristila 6 odraslih mužjaka vrste *Austropotamobius pallipes* i 3 odrasla mužjaka vrste *A. torrentium*. Vrsta *A. pallipes* je uzorkovana u rijeci Kotluši (pritoka Cetine), a vrsta *A. torrentium* u Kraljevečkom potoku (Medvednica).

3.1.2. Kemikalije

U istraživanju sam koristila sljedeće kemikalije:

- Carnoy fiksativ: smjesa metanola CH_3OH (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska) i ledene octene kiseline, CH_3COOH (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedelja, Hrvatska); koristila sam 2 različita volumna omjera:
  - Cranoy fiksativ I: V (metanol) : V (ledena octena kiselina) = 3:1 i
  - Cranoy fiksativ II: V (metanol) : V (ledena octena kiselina) = 1:1.
- Octena kiselina, CH_3COOH (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedelja, Hrvatska), w=50 %.
- Ugljikov(IV) oksid, $CO_2(s)$ (Messer Croatia Plin d.o.o., Zagreb, Hrvatska).
- 4,6-diamino-2-fenilindol DAPI (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Njemačka), γ=2 μg/ml.
- Otopina za uklapanje koja usporava izbjeljivanje uzrokovano svjetlošću (Dako, Glostrup, Njemačka).

3.1.3. Tehnička pomagala

U istraživanju sam koristila sljedeća tehnička pomagla:

- Fluorescencijski mikroskop Olympus BX51, opremljen digitalnom kamerom visoke

osjetljivosti Olympus DP70.

- Računalni programi: Adobe Photoshop CS2 i Microsoft Office Excel 2007.

3.2. Metode

3.2.1. Izrada preparata i fiksiranje

Postupak izrade preparata napravljen je prema metodologiji Mlinarec i sur. (2011). Za izradu preparata sam koristila prethodno preparirano tkivo testisa rakova koje je konzervirano u Carnoy otopini I (metanol : ledena octena kiselina = 3:1). Testise sam narezala na komadiće veličine 1-2 mm na sterilnom predmetnom stakalcu. Prvo sam komadić tkiva inkubirala u 50% ledenoj octenoj kiselini na jedan sat, a zatim ga macerirala u Carnoy fiksativu II (metanol : ledena octena kiselina = 1:1). Macerirani preparat sam pokrila pokrovnicom koju sam lagano stisnula palcem preko komadića filter papira. Za smrzavanje preparata sam koristila ugljikov (IV) oksid (Sharma i Sharma, 1972) te sam smrznutu pokrovnicu odstranila skalpelom. Nakon toga sam preparat sušila 24 sata na zraku pri sobnoj temperaturi.

3.2.2. Bojenje

Preparat sam inkubirala otopinom 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) te sam ga pokrila narančastom pokrovnicom na 15 minuta u mraku pri sobnoj temperaturi. Pomoću ovog postupka se vizualiziraju heterokromatinske AT pruge na kromosomima. Nakon bojenja, preparate sam isprala destiliranom vodom te sam ih uklopila u otopinu koja usporava izbjeljivanje uzrokovano svjetlošću (Dako).

3.2.3. Vizualna obrada preparata i analiza podataka

Za vizualnu obradu preparata sam koristila fluorescencijski mikroskop Olympus

BX51, opremljen digitalnom kamerom visoke osjetljivosti (Olympus DP70) kojom sam fotografirala preparate pri povećanju od 600x. Za analizu i obradu fotografija te za izradu kariograma sam koristila računalni program Adobe Photoshop CS2.

3.2.4. Izrada kariograma

Odabrala sam fotografiju metafazne ploče s dobro raspoređenim kromosomima. Za obradu fotografije i mjerenje kromosoma koristila sam program Adobe Photoshop CS2. Klasifikacija kromosoma je određena prema Levan i sur. (1964).

3.2.5. Statistička obrada podataka

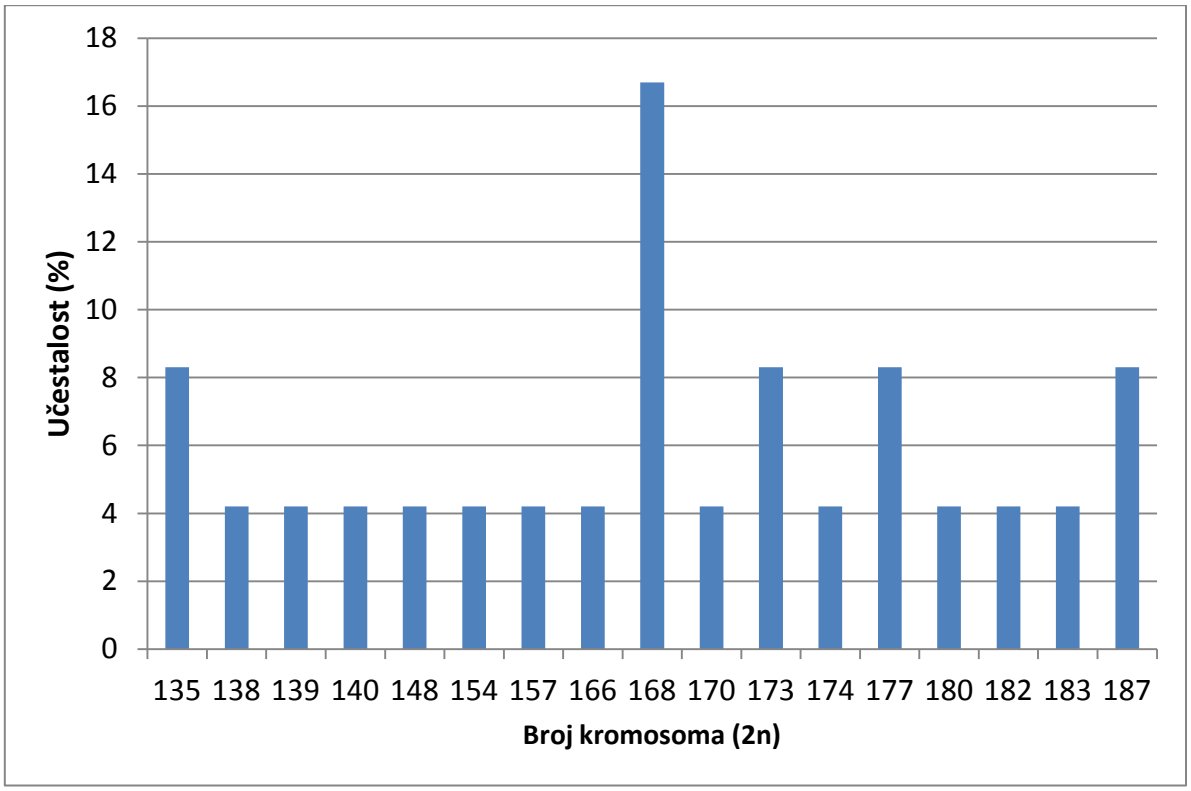
Za obradu i prikaz podataka sam koristila računalni program Microsoft Office Excel 2007.

4. REZULTATI

4.1. Broj kromosoma i struktura kariotipa

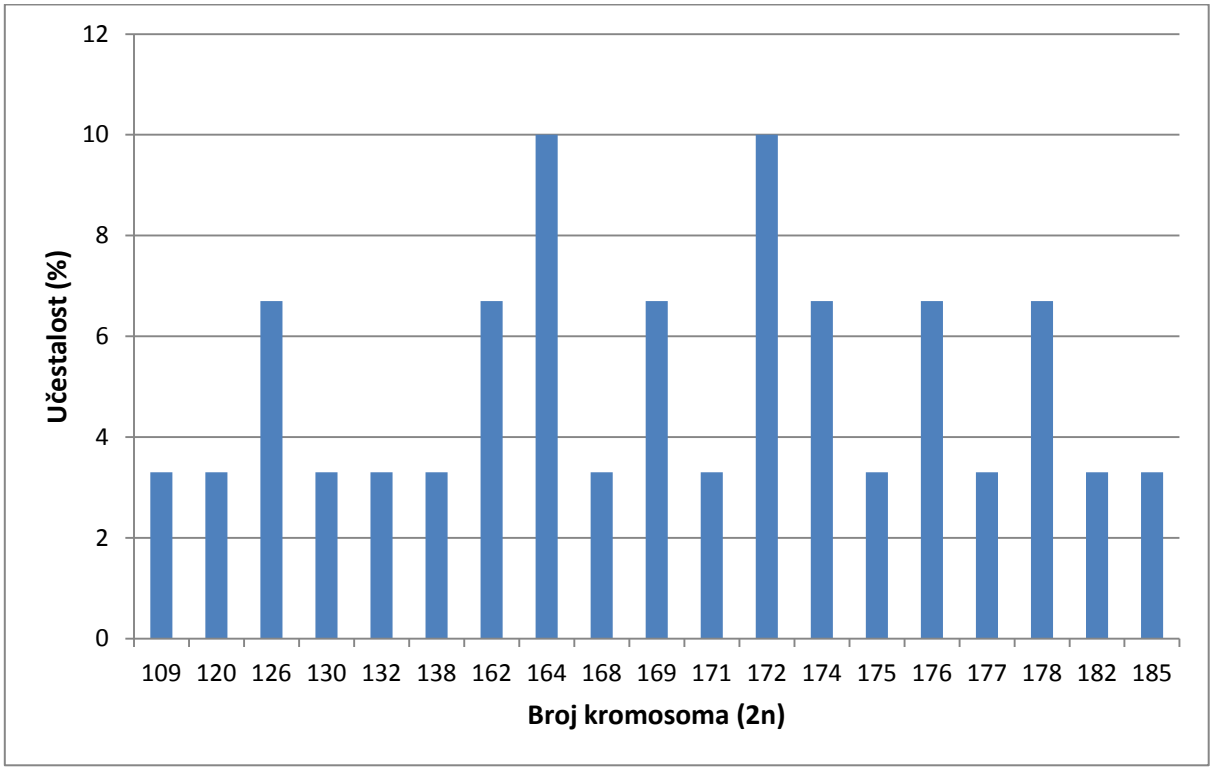
Kako bih utvrdila broj i morfologiju kromosoma vrste *Austropotamobius pallipes* i *A. torrentium*, analizirala sam po 24-30 kvalitetnih prikaza metafaznih ploča svake istraživane vrste. Preparacijom tkiva vrsta *A. pallipes* i *A. torrentium* dobila sam slike spermatogonijske metafaze koje su prikladne za analizu.

Kod vrste *Austropotamobius pallipes* je izbrojen diploidan broj kromosoma u rasponu od 2n=135 do 2n=187 s najvećom učestalošću kod 2n=168 (16,7 %) (Slika 9).



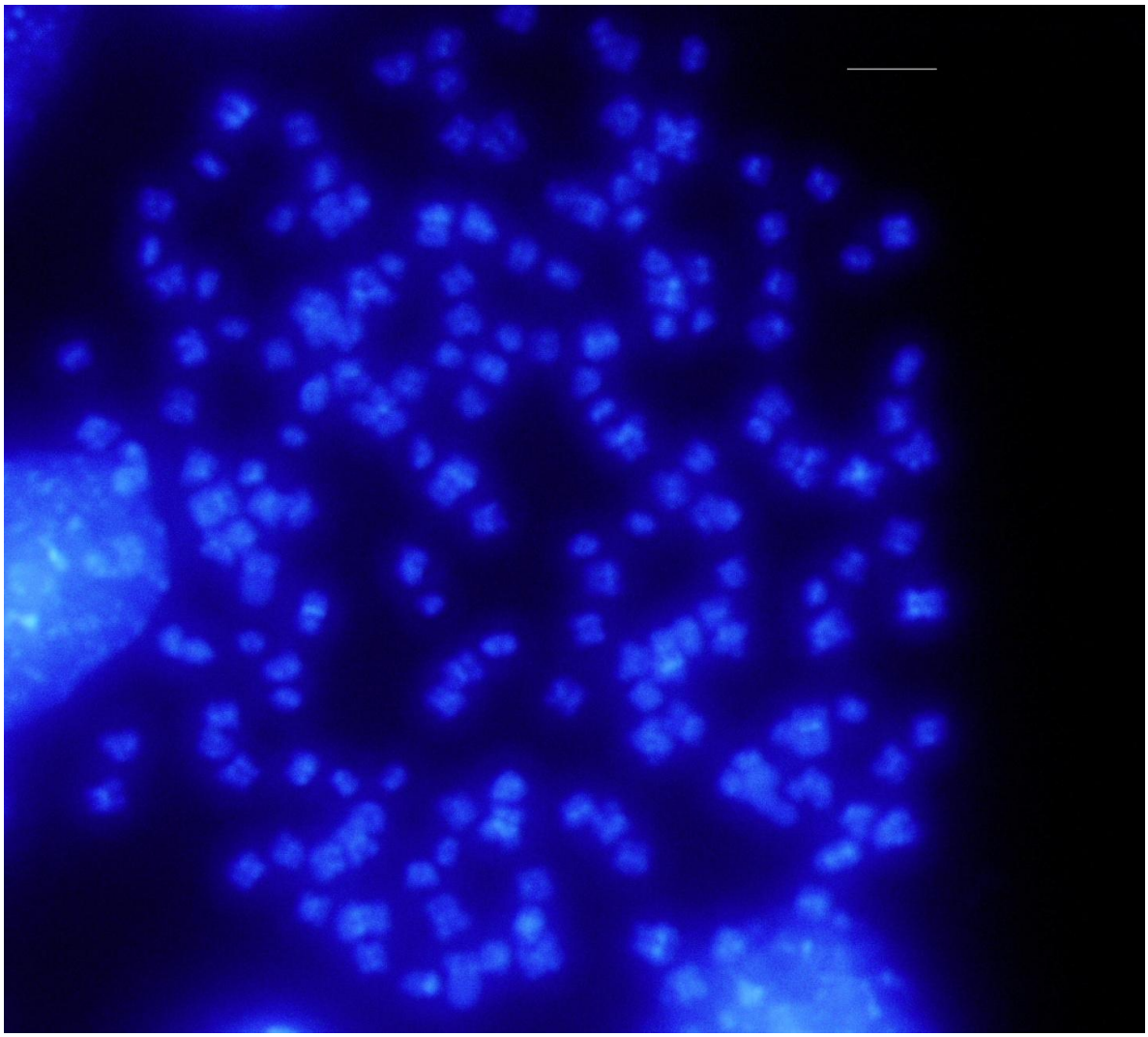
Slika 9. Učestalost pojedinog broja kromosoma zabilježenog u analiziranim metafazama vrste *Austropotamobius pallipes*.

Diploidan broj kromosoma izbrojen kod vrste *Austropotamobius torrentium* varira u rasponu od 2n= 109 do 2n=185, s najvećom učestalošću kod 2n=164 i 2n=172 (10 %) (Slika 10).

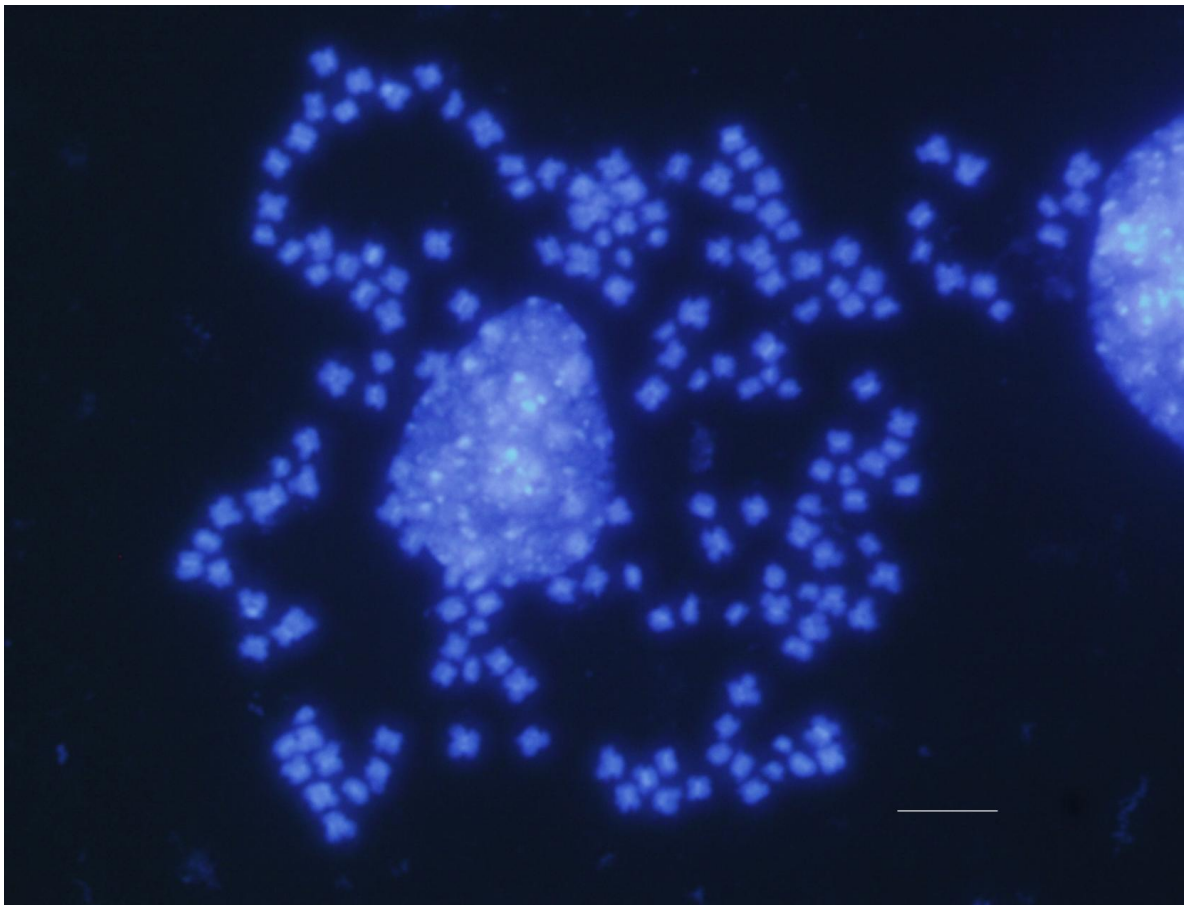


Slika 10. Učestalost pojedinog broja kromosoma zabilježenog u analiziranim metafazama vrste *Austropotamobius torrentium*.

Za izradu kariograma koristila sam najkvalitetnije spermatogonijske metafaze vrste *Austropotamobius pallipes* i *A. torrentium* (Slika 11 i 12).

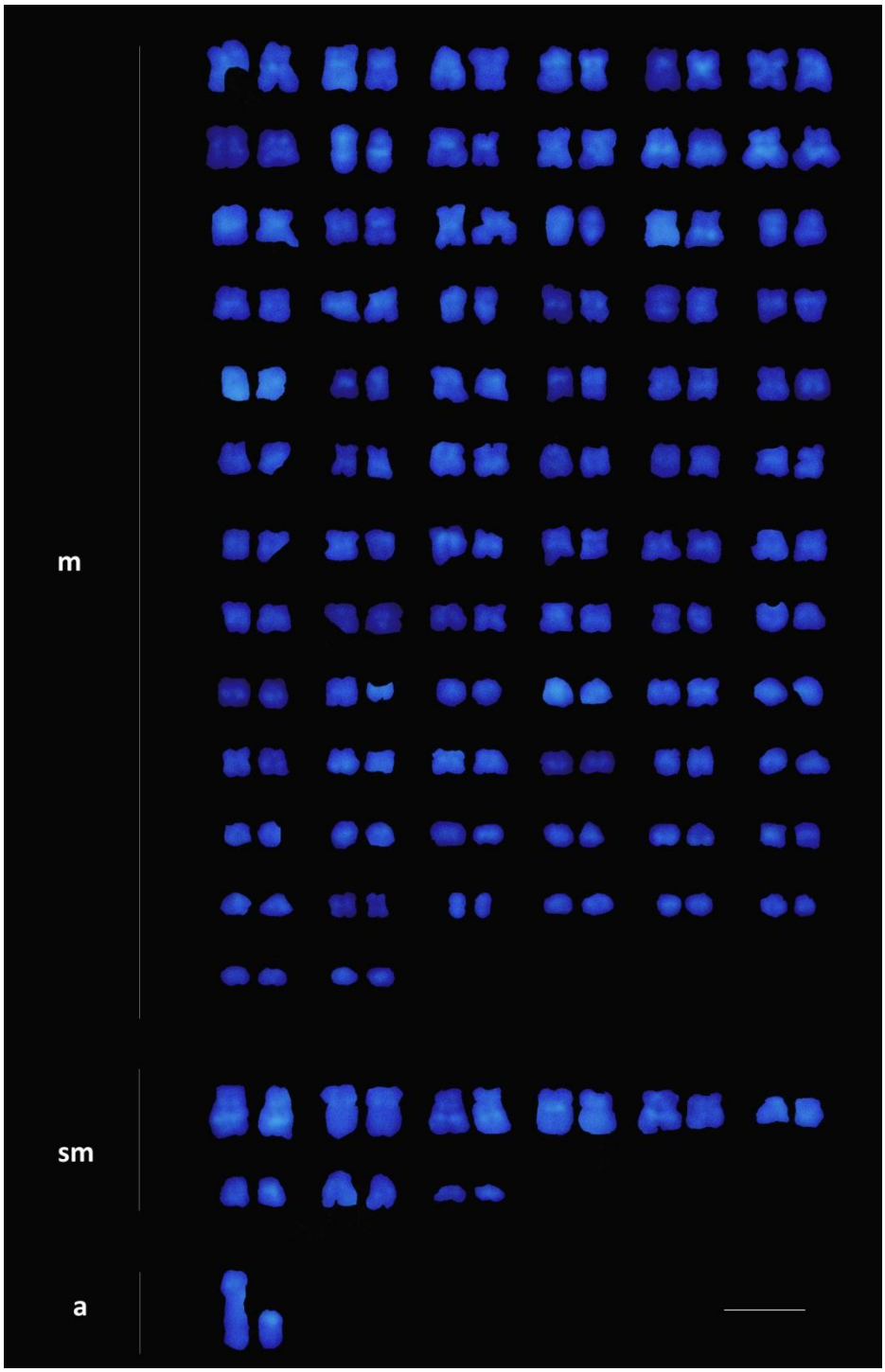


Slika 11. Metafaza u mitozi vrste *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858) sa 2n=168 nakon DAPI fluorescencijskog bojanja. Skala=10 μm.



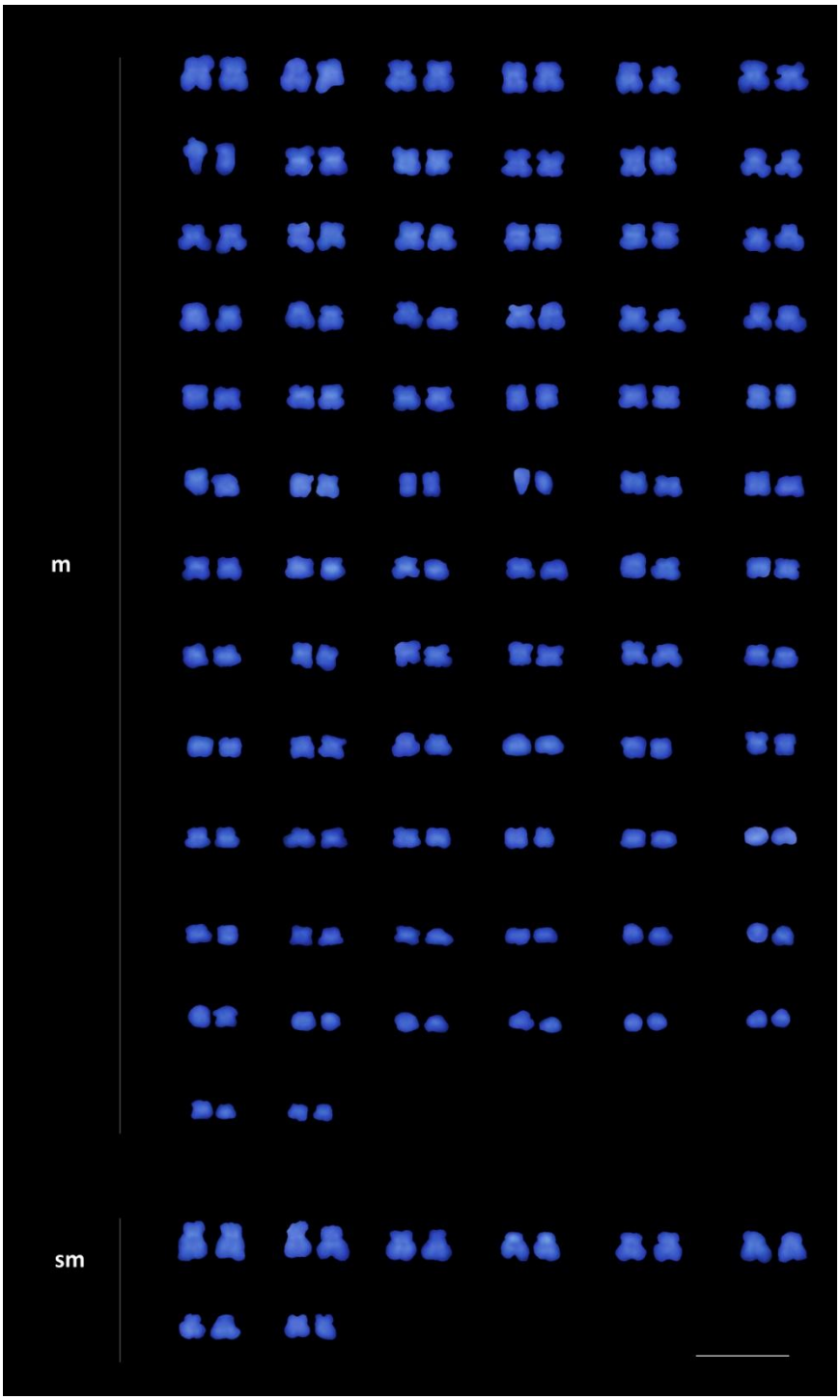
Slika 12. Metafaza u mitozi vrste *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803) s 2n=164 nakon DAPI fluorescencijskog bojanja. Skala=10 μm.

Detaljnom analizom kromosoma sam utvrdila da se diploidni set vrste *A. pallipes* (2n=168) sastoji od: 148 metacentrična, 18 submetacentrična i 2 akrocentrična kromosoma (Slika 13). Dakle, predložena formula kariotipa za vrstu *A. pallipes* je 2n=168, 148m+18sm+2a. Duljina analiziranih kromosoma je od 2,12- 9,55 μm.



Slika 13. Kariotip vrste *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858) s 2n= 168 nakon bojanja DAPI; m, metacentrični kromosomi; sm, submetacentrični kromosomi. Skala=10 μm.

Detaljnom analizom broja kromosoma utvrdila sam da je diploidni broj kromosoma za vrstu *Austropotamobius torrentium* (2n=164). Analizom njihove morfologije utvrđeno je da je njih 148 metacentričnih, a 16 submentacentričnih (Slika 14). Predložena formula kariotipa za vrstu *A. torrentium* je 2n=164-172, 148m+16sm. Duljina kromosoma varira od 1,04 – 3,94 μm.



Slika 14. Kariotip vrste *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803) s 2n= 164 nakon bojanja DAPI; m, metacentrični kromosomi; sm, submetacentrični kromosomi. Skala=10 μm.

4.2. Položaj heterokromatinskih pruga na kromosomima istraživanih vrsta

Koristila sam metodu pruganja fluorescencijskom bojom 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) za određivanje položaja heterokromatinskih pruga, koje su bogate AT parovima baza na kromosomima istraživanih vrsta.

Analizom se pokazalo da vrste *Austropotamobius palllipes* i *A. torrentium* sadrže jasno izražene heterokromatinske blokove smještene u centromernom/pericentromernom području te interkalarno na kromosomima. Većina kromosoma obje vrste sadrži AT pruge na centromernom/pericentromernom području. Kod vrste *A. torrentium* je primijećeno nekoliko kromosoma koji ne posjeduju centromerne pruge. Intersticijske pruge su primijećene kod obje vrste, a telomerne heterokromatinske pruge nisu primijećene kod nijedne od njih.

Primijećena je razlika u jačini DAPI signala među nekim kromosomskim homolognim parovima. Signali pruga koji su bogati AT parovima su različitog intenziteta i veličina, pri čemu možemo razlikovati kromosome unutar kompleta.

5. RASPRAVA

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da su diploidni brojevi kromosoma vrste *Austropotamobius pallipes* 2n=168, a kod vrste *A. torrentium* 2n=164 što ukazuje na značajnu sličnost između istraživanih vrsta.

Utvrđeni broj kromosoma vrste *A. torrentium* (2n=164) pokazuje povezanost s rezultatima prethodnih preliminarnih istraživanja u kojemu je utvrđeno da vrsta *A. torrentium* ima 2n=174 (Mlinarec i sur., 2013).

Prema dostupnim podacima, do sada nije provedeno kariološko istraživanje za vrstu *Austropotamobius pallipes*. Stoga su u ovom radu po prvi put dobiveni podaci o kariološkim značajkama vrste *A. pallipes*.

Dobiveni diploidni brojevi kromosoma kod vrsta *A. pallipes* i *A. torrentium* pokazuju različitost u broju kromosoma prethodno utvrđenih u drugih slatkovodnih predstavnika infrareda Astacoidea. Kod porodice Astacidae pokazuju najmanju različitost u broju kromosoma s vrstama *Astacus leptodactylus* koja ima utvrđeni broj 2n=180 i *Astacus astacus* s brojem 2n=176 (Mlinarec i sur., 2011). Značajna razlika se primijećuje na porodici Cambaridae za vrste *Procambarus clarkii* 2n=188 (Murofushi i sur., 1984) i *Procambarus llamasi* 2n=120 (Indy i sur., 2010) te na porodici Parastacidae za vrste *Cherax destructor* 2n=188 (Scalici i sur., 2010) i *Cherax quadricarinatus* 2n=200 (Tan i sur., 2004).

Upravo te varijacije u broju kromosoma upućuju da su promjene kariotipa, odnosno promjene broja kromosoma, bile pod utjecajem evolucije i specijacije kod infrareda Astacidea. Geografska rasprostranjenost infrareda Astacidea i široki raspon broja kromosoma ukazuju da je evolucija vjerojatno višestruko djelovala. Poliplodija bi mogla biti jedna od evolucijskih sila odgovornih za nastanak novih kromosomskih setova zbog čega dolazi do evolucijske divergencije među vrstama (Lécher i sur., 1995; Soltis i Soltis, 1999).

Analizom broja kromosoma vrste roda *Austropotamobius* uočeno je da vrsta *A. pallipe*s ima stalniji broj kromosoma, dok su rezultati za vrstu *A. torrentium* raspršeniji.

Takvi se rezultati mogu objasniti na više načina. Jedan od mogućih razloga je postojanje eksperimentalne pogreške. Moguće je da se pri izradi preparata kromosomi nisu zadržali na metafaznoj ploči zbog čega se objašnjava nedostatak istih na fotografijama.

Drugo je moguće objašnjenje postojanje B kromosoma kod vrste *A. torrentium*. Do sada je zabilježena prisutnost B kromosoma kod vrste *Nephrops norvegicus* 2n=131-140 (Deiana i sur., 1995), *Palinurus elephas* 2n=138-150 (Coluccia i sur., 2004) te *Homarus americanus* 2n=135-136 (Coluccia i sur., 2001). No, s obzirom da tijekom analize nije nađena niti jedna metafaza mejoze I, dokazivanje prisutnosti B kromosoma nije bilo moguće.

Postoji morfološka sličnost kariotipa vrsta *A. torrentium* i *A. pallipes*. Metacentrični kromosomi prevladavaju u obje vrste, s time da su metacentrični kromosomi kod *A. torrentium* izraženiji. Samo je kod vrste *A. pallipes* uočen heteromorfan par koji je akrocentričan.

Citogenetičkom analizom roda *Austropotamobius* primijećena je razlika između vrsta u veličini i položaju heterokromatinskih pruga. Neki kromosomi kod *A. torrentium* ne posjeduju centromerne pruge, već interkalarne AT pruge.

Analizom kariograma primijećena je značajna razlika između vrsta roda *Astacus* (Mlinarec i sur., 2011) i vrsta roda *Austropotamobius*. *Austropotamobius torrentium* i *A. pallipes* sadrže značajno više metacentričnih kromosoma, za razliku od vrste *Astacus astacus*. Vrstama *A. astacus* i *A. pallipes* je zajedničko što je uočen akrocentrični par kromosoma koji je i heteromorfan. Izražena je razlika između vrste *Astacus astacus* i vrsta roda *Austropotamobius* u veličini i položaju heteromokromatinskih blokova. Kod vrste *A. astacus* su izraženije pruge u DAPI singalu.

Citogenetička i kariološka varijabilnost među vrstama bi mogle ukazivati na evolucijsku divergenciju. Stoga, citogenetičke analize velikog broja vrsta mogu značajno pomoći pri pojašnjavanju evolucijskih, pa time i filogenetskih odnosa između vrsta.

6. ZAKLJUČAK

- Vrsta *Austropotamobius pallipes* ima diploidan broj kromosoma 2n=168.
- Vrsta *A. torrentium* ima diploidan broj kromosoma: 2n=164.
- Formula kariotipa za vrstu *A. pallipes* je 2n=168, 148m+18sm+2a,
- Formula kariotipa za vrstu *A. torrentium* je 2n=164, 148m+16sm.
- Obje istraživane vrste imaju izražene heterokromatske blokove te je zabilježena prisutnost centromerne i interkalarne AT bogate DAPI pozitivne pruge.
- Rezultati ovog istraživanja pokazuju kako bi daljnja istraživanja na većem broju jedinki i vrsti mogla pomoći u razjašnjavanju filogenetskih odnosa i evolucijskih puteva slatkovodnih rakova natporodice Astacoidea.

7. LITERATURA

1. Bernska konvencija 2002. Europska direktiva o zaštiti prirodnih staništa i divlje faune i flore. Online: <http://conventions.coe.int/treaty/FR/Treaties/Html/104-3.htm>.

2. Camacho, J. P. M., Sharbel, T. F., Beukeboom, L. W. 2000. B-chromosome evolution. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, **355**, 163-178.

3. Coluccia, E., Cannas, R., Cau, A., Deiana, A. M., Salvadori, S. 2004. B chromosomes in Crustacea Decapoda. Cytogenet Genome Res, **106**, 215-221, doi:10.1159/000079290.

4. Coluccia, E., Cau, A., Cannas, R., Milia, A., Salvadori, S., Deiana, S. M. 2001. Miotic and meiotic chromosomes of the American lobster *Homarus americanus* (Nephropidae, Decapoda). Hydrobiologia, **449**, 149-152.

5. Crandall, K. A., Buhay, J. E. 2008. Global diversity of crayfish (*Astacidae*, *Cambaridae*, and *Parastacidae – Decapoda*) in freshwater. Hydrobiologia, **595,** 295-301, doi:10.1007/s10750-007-9120-3.

6. Crandall, K. A., Harris, D. J., Fetzner Jr, J. W. 2000. The monophyletic origin of freshwater crayfish estimated from nuclear and mitochondrial DNA sequences. Proceedings of the Royal Society of London, Series B, **267**, 1679-1686, doi:10.1098/rspb.2000.1195.

7. De Grave, S., Pentcheff, N. D., Ahyong, S. T., Chan, T.-Y., Crandall, K. A., Dworschak, P. C., Felder, D. L., Feldmann, R. M., Fransen, C. H. J. M., Goulding, L. Y. D., Lemaitre, R., Low, M. E. Y., Martin, J. W., Ng, P. K. L., Schweitzer, C. E., Tan, S. H., Tshudy, D., Wetzer, R. 2009. A classification of living and fossil genera of decapod crustaceans. Raffles Bulletin of Zoology, Supplement, **21**, 1–109.

8. Deiana, A. M., Coluccia, E., Milia, A., Salvadori, S. 1996. Supernumerary chromosomes in *Nephrops norvegicus* L. (Crustacea, Decapoda). Heredity, **76**, 92-99.

9. Diupotex Chong, M. E., Foster, N. R., Zarate, C. A. 1997. A cytogenetic study of the crayfish *Procambarus digueti* (Bouvier, 1897) (*Decapoda*, *Cambaridae*) from lake Camecuaro, Michoacan, Mexico. Crustaceana, **70,** 875-885.

10. Europska direktiva o zaštiti prirodnih staništa i divlje faune i flore 2007. Online < http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1992:206:0007:0050:EN:PDF>

11. Fetzner, J. W. 2010. The crayfish and lobster taxonomy browser. Online: <http://iz.carnegiemnh.org/crayfish/NewAstacidea/infraorder.asp?io=Astacidea>.

12. Fetzner, J. W., Crandall, K. A. 2002. Genetic variation. U: Holdich, D. M. (ur.) Biology of freshwater crayfish. Blackwell Science, Oxford, 291-326.

13. Fratini, S., Zaccara, S., Barbaresi, S., Grandjean, F., Souty-Grosse, C., Crosa, G., Gherardi, F. 2005. Phylogeography of the threatened crayfish (genus *Austropotamobius*) in Italy: implications for its taxonomy and conservation. Heredity, **94**, 108–118.

14. Füreder, L., Gherardi, F., Holdich, D., Reynolds, J., Sibley, P., Souty-Grosset, C. 2010. *Austropotamobius pallipes*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. <www.iucnredlist.org>.

15. Füreder, L., Gherardi, F., Souty-Grosset, C. 2010. *Austropotamobius torrentium*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. <www.iucnredlist.org>.

16. Füreder, L., Machino, Y. 2002. A revised determination key of freshwater crayfish in Europe. Berichte des naturwissenschaftlich-medizinischen vereins in Innsbruck, **89**, 169 – 178.

17. GeneticsSuite, 2014. Online: <geneticssuite.net/node/16>

18. Gottstein, S., Kerovec M., Maguire, I., Bukvić, I. 1999. Ecological notes on *Autropotamobius pallipes italicus* (Faxon, 1914) (*Decapoda*, *Astacidae*) in a karstic spring of Neretva delta (Croatia). Freshwater Crayfish, **12**, 620-627.

19. Holdich, D. M. 2002. Distribution of crayfish in Europe and some adjoining countries. Bulletin Francais de la Peche et de la Pisciculture, **367,** 611-650.

20. Hudina, S., Faller, M., Lucić, A., Klobučar, G., Maguire, I. 2009. Distribution and dispersal of two invasive crayfish species in the Drava river basin, Croatia. Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems, **9**, 394-395.

21. Indy, J. R., Arias-Rodriguez, L., Páramo-Delgadillo, S., Hernández-Vidal, U., Alvarez-González, C. A., Contreras-Sánchez, W. M. 2010. Mitotic karyotype of the tropical freshwater crayfish *Procambarus (Austrocambarus) llamasi* (Decapoda: Cambaridae). Revista de Biología Tropical, **58** (2), 655-662.

22. Lécher, P., Defaye, D., Noel, P. 1995. Chromosomes and nuclear DNA of Crustacea. Paper presented at the First European Crustacean Conference, Paris, August 31 - September 5, 1-42.

23. Levan, A., Fredga, K., Sandberg, A. 1964. Nomenclature for centromeric position of chromosomes. Hereditas, **52**, 201-220.

24. Maguire, I., Dakić, L. 2011. Comparative analyses of *Astacus leptodactylus* morphological characteristics from Croatia and Armenia. Biologia, **66** (3), 491-498. doi:10.2478/s11756-011-0045-y.

25. Maguire, I., Gottstein Matočec, S. 2004. The distribution pattern of freshwater crayfish in Croatia. Crustaceana, **77** (1), 25-49.

26. Maguire, I., Jelić, M., Klobučar, G. 2011. Update on the distribution of freshwater crayfish in Croatia. Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems, **401**, 31-41.

27. Martin, J. W., Davis., G. E. 2001. An updated classification of the recent *Crustacea*. Natural History Museum of Los Angeles county, Science series 39, Los Angeles.

28. Mlinarec, J., Mužić, M., Pavlica, M., Šrut, M., Klobučar, G., Maguire, I. 2011. Comparative karyotype investigations in the European crayfish *Astacus astacus* and *A. leptodactylus* (*Decapoda*, *Astacidae*). Crustaceana, **84** (12-13), 1497-1510, doi:10.1163/156854011x607015

29. Mlinarec, J., Mužić, M., Šrut, M., Klobučar, G., Maguire, I. 2013. Karyotype investigations in the european crayfish *Austropotamobius torrentium* (Decapoda, Astacidae). U: Maguire, I. (ur.) Book of Abstracts. Regional European Crayfish Meeting CrayCro, Zagreb, 49.

30. Murofushi, M., Deguchi, Y., Yosida, T. H. 1984. 79. Karyological study of the red swamp crayfish and the Japanese lobster by air-drying method. Proceedings of the Japan Academy**,** Series B, **60** (8), 306-309.

31. Niiyama, H. 1934. The Chromosomes of the crayfish, Cambaroides Japonicus (De Haan). Journal of the Faculty of Science, Hokkaido Imperial University, Series VI, Zoology, **3** (2), 41-53.

32. Niiyama, H. 1962. On the unprecedently large number of chromosomes of the crayfish *Astacus trowbridgii* Stimpson. Annotationes Zoologicae Japonenses, **35,** 229-233.

33. Nyström, P. 2002. Ecology. U: Holdich, D. M. (ur.) Biology of Freshwater Crayfish. Blackwell Science, Oxford, 192-235.

34. Plohl, M. 2010. Those mysterious sequences of satellite DNAs. Periodicum biologorum, **112** (4), 403–410.

35. Pravilnik o proglašavanju divljih svojti zaštićenim i strogo zaštićenim 2009. NN 99/09.

36. Rakovi 2014. Online: <http://rakovi.biol.pmf.unizg.hr/rakovi/index.htm>.

37. Reynolds, J. D. 2002. Growth and reproduction. U: Holdich, D. M. (ur.) Biology of freshwater crayfish. Blackwell Science, Oxford, 152-191.

38. Rousseau-Gueutin, M., Gaston, A., Aïnouche, A., Aïnouche, M. L., Olbricht, K., Staud, G., Richard, L., Denoyes-Rothan, B. 2009. Tracking the evolutionary history of polyploidy in *Fragaria* L. (strawberry): New insights from phylogenetic analyses of low-copy nuclear genes. Molecular Phylogenetics and Evolution, **51**, 515–530, doi:10.1016/j.ympev.2008.12.024.

39. Scalici, M., Solano, E., Gibertini, G. 2010. Karyological analyses on the Australian crayfish *Cherax destructor* (*Decapoda*: *Parastacidae*). Journal of Crustacean Biology, **30** (3), 528-530.

40. Scholtz, G. 2002. Phylogeny and evolution. U: Holdich, D. M. (ur.) Biology of freshwater crayfish. Blackwell Science, Oxford, 30-52.

41. Sharma, A. K., Sharma, A. 1972. Chromosome techniques — theory and practice. Butterworth Publishers, London.

42. Sinclair, E. A., Fetzner Jr, J. W., Buhay, J., Crandall, K. A. 2004. Proposal to complete a phylogenetic taxonomy and systematic revision for freshwater crayfish (*Astacidea*). Freshwater Crayfish, **14**, 21-29.

43. Skurdal, J., Taugbøl, T. 2002. *Astacus.* U: Holdich, D. M. (ur.) Biology of freshwater crayfish. Blackwell Science, Oxford, 467-510.

44. Śmietana, P., Schulz, H. K., Keszka, S., Schulz, R. 2006. A proposal for accepting *Pontastacus* as a genus of European crayfish within the family *Astacidae* based on a revision of the West and East European taxonomic literature. Bulletin Francais de la Peche et de la Pisciculture, **380-381**, 1041-1052.

45. Soltis, D. E., Soltis P. S. 1999. Polyploidy: Recurrent formation and genome evolution. Trends in Ecology & Evolution, **14** (9), 348-352.

46. Tamarin, R. H. 2002. Principles of genetics, seventh edition. WCB/McGraw-Hill, Boston.

47. Tan, X., Qin, J. G., Chen, B., Chen, L., Li, X. 2004. Karyological analyses on redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (*Decapoda*: *Parastacidae*). Aquaculture, **234,** 65–76, doi:10.1016/j.aquaculture.2003.12.020.

48. Taylor, C. A. 2002. Taxonomy and conservation of native crayfish stocks. U: Holdich, D. M. (ur.) Biology of freshwater crayfish. Blackwell Science, Oxford, 236-257.

49. Thermo 2014. DAPI nuclear counterstain. U: Thermo scientific 2014. Online: <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=01041204>.

50. Trontelj, P., Machino, Y., Sket, B. 2005. Phylogenetic and phylogeographic relationships in the crayfish genus *Austropotamobius* inferred from mitochondrial COI gene sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution, **34**, 212–226, doi:10.1016/j.ympev.2004.09.010.

51. Vagnarelli, P., Ribeiro, S. A., Earnshaw, W. C. 2008. Centromeres: Old tales and new tools. FEBS letters, **582**, 1950–1959, doi:10.1016/j.febslet.2008.04.014.

52. Zaccara, S., Stefani, F., Gali, P., Nardi, P. A., Crosa, G. 2004. Taxonomic implications in conservation management of white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes*) (Decapoda, Astacidae) in Northern Italy. Biological Conservation, **120**, 1-10, doi: 10.1016/j.biocon.2004.01.020.

53. Zaccara S., Stefani, F., Crosa G. 2005. Diversity of mitochondrial DNA of the endangered white-clawed crayfish (*Austropotamobius italicus*) in the Po River catchment. Freshwater Biology, **50**, 1262-1272, doi:10.1111/j.1365-2427.2005.01385.x.

54. Zakon o zaštiti prirode, 2013. NN 80/13.

8. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI:

Ime i prezime:	Ines Porupski
Datum i mjesto rođenja:	03.08.1989., Slavonski Brod
Adresa:	Cvijete Zuzorić 51, 10 000 Zagreb
Država:	Republika Hrvatska
Mobitel:	091/308 1989
E-mail:	ines.porupski@gmail.com

OBRAZOVANJE:

Diplomski studij	**Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu**
2011. -	Diplomski studij Eksperimentalne biologije, modul Zoologija
Preddiplomski studij	**Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu**
2008. – 2011.	Preddiplomski studij Biologije
	Sveučilišna prvostupnica biologije
Srednja škola	**III. gimnazija, prirodoslovno-matematički smjer, Zagreb**
2004. – 2008.	

SUDJELOVANJE:

2013.	Eighth ISABS Conference in Forensic, Anthropologic and Medical Genetics and Mayo Clinic Lectures in Translational Medicine, Split, Croatia
2013.	15. riječki-dani bioetike na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci „Visoko obrazovanje za sve: perspektive podzastupljenih skupina“
	sudjelovanje na raznim radionicama udruga za invalide
2010. – 2013.	radionice „Noć Biologije“, organizirao Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek Sveučilišta u Zagrebu

ZNANJA I VJEŠTINE:

hrvatski znakovni jezik

međunarodni znakovni jezik

odlično korištenje računala, poznavanje rada Windows, MS Office, Internet

amatersko fotografiranje

rad u laboratoriju

sklonost timskom radu, sklonost brizi i pomaganju drugim ljudima, ustrajanost i discipliranost