

Geometrijsko - morfometrijske značajke potočnog raka Austropotamobius torrentium (Schrank, 1803) u jugoistočnoj Europi

Vodanović, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:477658>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno – matematički fakultet

Biološki odsjek

Ivana Vodanović

Geometrijsko - morfometrijske značajke potočnog raka *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803) u jugoistočnoj Europi

Diplomski rad

Zagreb, rujan 2019.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod voditeljstvom prof. dr. sc. Ivane Maguire, radi stjecanja zvanja magistar biologije – smjer ekologija.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Geometrijsko - morfometrijske značajke potočnog raka *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803) u jugoistočnoj Europi

Ivana Vodanović

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb, Republika Hrvatska

Potočni rak, *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803) jedna je od četiri autohtone europske vrste iz porodice Astacidae koja živi u hrvatskim slatkovodnim ekosustavima te je zakonom strogo zaštićen. Rakovi su ključni dio tih ekosustava i pokretači kruženja organskih tvari zbog svoje raznovrsne prehrane, a i sami su hrana raznim vodenim i terestričkim predatorima. Nedavna istraživanja u Europi i Hrvatskoj pokazala su značajan pad u brojnosti, najviše zbog antropogenog utjecaja uslijed industrijalizacije i regulacije vodenih tokova, ali i zbog širenja alohtonih invazivnih vrsta rakova. Morfološka obilježja vrste mijenjaju se pod utjecajem genetičkih faktora, ali i zbog adaptacije vrste na razne ekološke i stanišne čimbenike. Sukladno tome, cilj rada je obraditi izmjerene podatke o veličini i obliku prikupljenih jedinki potočnih rakova te uz upotrebu metoda geometrijske morfometrije što bolje prikazati varijabilnost pojedinih filogrupa. Upotrebom geometrijske morfometrije i statističkom obradom dobivenih rezultata, utvrđene su razlike između pojedinih filogrupa na području jugoistočne Europe te se rezultati podudaraju s prethodnim molekularno-filogenetskim istraživanjima i saznanjima. Budući da na potočnom raku dosad nije obavljeno puno geometrijsko-morfometrijskih analiza, dobiveni rezultati će biti vrijedan izvor informacija za buduća istraživanja ekoloških, evolucijskih i taksonomskih obilježja vrste na razini Europe.

(36 stranica, 11 slika, 7 tablica, 49 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: Astacidae, tradicionalna morfometrija, geometrijska morfometrija, filogrupe

Voditelj: Dr. sc. Ivana Maguire, prof.

Ocjenitelji: prof. dr. sc. Ivana Maguire, prof.
izv. prof. dr. sc. Renata Šoštarić
izv. prof. dr. sc. Ana Galov

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Geometric morphometric characteristics of stone crayfish, *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803) in Southeastern Europe

Ivana Vodanović

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb, Croatia

The stone crayfish, *Austropotamobius torrentium* is one of four native European species from the Astacidae family, inhabiting Croatian freshwater ecosystems and is protected by Croatian laws. Crayfish play an essential role in those ecosystems and therefore they are the key stone species.

Recent studies in Europe and Croatia showed a significant decrease in numbers of stone crayfish populations, mainly because of the anthropogenic impact caused by industrialization and water flow regulations, but also because of a growing number of allochthonous crayfish species. Morphological variability within the species is a result of both genetic and environmental mechanisms. Main goal of this graduate thesis is to process measured data for the size and shape of collected stone crayfish specimens using geometric morphometric methods and use the results to establish the differences among different phylogroups previously obtained by molecular phylogenetic research. By using geometric morphometric methods and statistical data analyses of our results, the differences among phylogroups in South-eastern Europe were confirmed and our results match previous molecular phylogenetic research and data.

Since the number of geometric morphometric analysis on the stone crayfish is scarce, obtained results will be a valuable source of information for future research of their ecology, evolution and taxonomic characteristics.

(36 pages, 11 figures, 7 tables, 49 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: *Austropotamobius torrentium*, Astacidae, geometric morphometry, phylogroups

Supervisor: Dr. Ivana Maguire, Prof.

Reviewers: Dr. Ivana Maguire, Prof.
Dr. Renata Šoštarić, Prof.
Dr. Ana Galov, Prof.

Zahvale

Prvo i najosnovnije, najveće zahvale mentorici i spasiteljici prof. dr. sc. Ivani Maguire na razumijevanju, pristupačnosti, pomoći, stručnim savjetima i svim riječima podrške, bez nje ovo nikako ne bi bilo moguće.

Drugo i najosnovnije, mag. biol. Leoni Lovrenčić na strpljenju i podršci u najneočekivanim trenucima.

Posebno hvala svim mojim najdražima koji su mi bili emocionalna i tehnička podrška te uho za slušanje u ovim turbulentnim i uzbuđljivim danima.

Sadržaj

1.	Uvod	1
1.1.	Klasifikacija i geografska rasprostranjenost pripadnika porodice Astacidae	1
1.2.	Biologija vrste <i>Austropotamobius torrentium</i>	4
1.2.1	Morfološke karakteristike vrste	4
1.2.2.	Molekularna filogenija vrste	6
1.2.3.	Geodinamički procesi kao uzrok genetičke raznolikosti vrste	7
1.2.4.	Geografska rasprostranjenost različitih haplotipova	8
1.2.5.	Ugroženost i zaštita vrste	9
1.3.	Geometrijska morfometrija u znanstvenim istraživanjima	11
1.4.	Odabir glavopršnjaka kao model sistema za GM istraživanja	13
2.	Ciljevi istraživanja	14
3.	Materijali i metode	14
3.1.	Područja uzorkovanja na području jugoistočne Europe	14
3.2.	Lov i uzorkovanje rakova	15
3.3.	Geometrijsko morfometrijska analiza rakova	17
3.3.1.	Odabir specifičnih točaka mjerenja na glavopršnjaku	17
3.3.2.	Statistička obrada podataka dobivenih geometrijskom morfometrijom	19
4.	Rezultati	20
4.1.	Rezultati geometrijsko morfometrijske analize rakova	20
4.1.1	Generalizirana Prokrustova analiza (GPA)	20
4.1.2.	Analiza oblika glavopršnjaka i usporedba različitih filogrupa	22
5.	Rasprava	29
6.	Zaključak	31
7.	Literatura	32
8.	Životopis	36

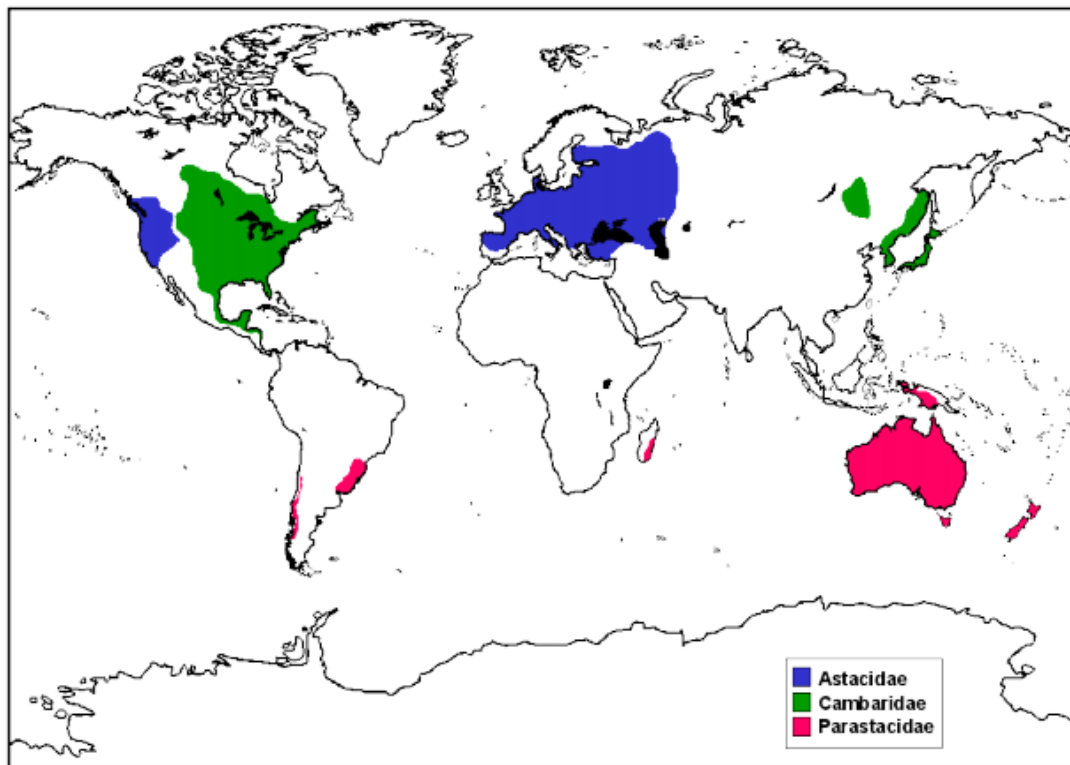
1. Uvod

1.1. Klasifikacija i geografska rasprostranjenost pripadnika porodice Astacidae

Red Decapoda taksonomski pripada vrlo brojnom i raznolikom potkoljenu rakova (Crustacea). Unutar Decapoda nalazi se podred Astacoida Latreille, 1802 s dvije nadporodice: Astacoidea Latreille, 1802 koji su rasprostranjeni na sjevernoj polutki i Parastacoidea Huxley, 1879 koji žive na južnoj polutki.

Nadporodica Astacoidea obuhvaća dvije porodice: Cambaridae s preko 420 opisanih vrsta u 12 rodova te Astacidae s opisanih 39 vrsta u 3 roda (Crandall i Buhay, 2008). Vrste porodice Astacidae su rasprostranjene na tri kontinenta – Aziji, Europi i Sjevernoj Americi (Slika 1.)

Rakovi (Crustacea) su jedna od najstarijih živućih skupina organizama i prema najranijim pronađenim fosilnim dokazima, slatkovodni rakovi potječu iz trijasa, iz vremena postojanja superkontinenta Pangee. Prema postojećim fosilnim ostacima, neki znanstvenici pretpostavljaju njihovo monofiletsko porijeklo. Njihov zajednički predak živio je u slatkovodnim staništima na području Pangee (Scholtz, 2002). Podjela Pangee na Lauraziju i Gondvanu rezultirala je odvajanjem populacija i specijacijom što potvrđuju današnje filogenetske analize (Scholtz, 2002). Nadalje, neki autori smatraju da su porodica Astacidae i Cambaridae monofiletske skupine (De Grave i sur., 2009), za razliku od Scholtz (2002) i Sinclair i sur. (2004) koji ističu da nema dovoljno podataka za potvrdu njihove monofilije. Neki pak autori predlažu da se ove dvije porodice smatraju parafiletskim zbog povezanosti roda *Cambaroides* s porodicom Astacidae (Crandall, 2000 i Scholtz, 2002).



Slika 1. Geografska rasprostranjenost porodica slatkovodnih rakova u svijetu (Fetzner, 2010)

Sistematika:

Koljeno: ARTHROPODA – člankonošci

Potkoljeno: CRUSTACEA – rakovi

Razred: MALACOSTRACA – viši rakovi

Podrazred: EUMALACOSTRACA

Red: DECAPODA – deseteronošci

Podred: ASTACOIDA

Nadporodica: ASTACOIDEA

Porodica: CAMBARIDAE

Porodica: ASTACIDAE

Rod: *ASTACUS*

Rod: *AUSTROPOTAMOBIVS*

Nadporodica: PARASTACOIDEA

Porodica: PARASTACIDAE

Širenje autohtonih vrsta porodice Astacidae po području današnje Europe krenulo je nakon zadnjeg ledenog doba. Prema Albrecht (1983), za vrijeme ledenog doba, populacije su bile potisnute južnije i otapanjem leda i rastom temperatura, krenuli su migrirati prema sjeveru, uzvodno rijekama koje više nisu bile zamrznute.

U Europi su prirodno rasprostranjeni samo pripadnici porodice Astacidae i to na području od Urala na istoku do Iberijskog poluotoka na zapadu. Na sjeveru dolaze i do južne Skandinavije, a nastanjuju i Veliku Britaniju (Holdich, 2002).

Porodica Astacidae je zastupljena s dva autohtona roda: *Astacus* (Fabricius, 1775) i *Austropotamobius* (Skorikov, 1907). Rod *Pacifastacus* (Bott, 1950) rasprostranjen je u Sjevernoj Americi, a vrsta *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) unesena je u Europu gdje se pokazala kao invazivna vrsta (Maguire, 2010).

Prema Holdich (2002) danas na području Europe živi pet autohtonih vrsta slatkovodnih rakova iz ove porodice: *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803) – potočni rak ili rak kamenjar, *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858) – bjelonogi ili primorski rak, *Astacus astacus* (Linnaeus, 1758) – riječni ili plemeniti rak, *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) – uskoškari, turski ili barski rak i *Astacus pachypus* (Rathke, 1837).

Danas je vrsta *Astacus astacus* rasprostranjena u istočnim, središnjim i sjevernim dijelovima Europe, vrsta *Astacus pachypus* živi na području oko Crnog i Azovskog mora, te oko Kaspijskog jezera dok je vrsta *Astacus leptodactylus* uglavnom rasprostranjena u Aziji i istočnoj Europi iako je unesena i u druge europske zemlje i širi se vodenim putevima prema zapadu. Vrsta potočni rak (*Austropotamobius torrentium*), koja je i predmet istraživanja ovog diplomskog rada, raširena je u središnjoj i jugoistočnoj Europi (Slika 2.), a njegov srodnik, vrsta *Austropotamobius pallipes* rasprostranjena je u južnoj i zapadnoj Europi, uključujući i Britansko otočje (Holdich i Lowery, 1988; Kouba i sur., 2014).

Granice areala roda *Austropotamobius* su Balkanski poluotok na istoku, Britansko otočje na sjeveru, Italija na jugu te Iberijski poluotok na zapadu dok je filogenetski mlađi rod *Astacus* rasprostranjen na području cijele Europe, osim Iberijskog poluotoka (Holdich i Lowery, 1988; Maguire, 2010; Holdich i sur. 2009).



Slika 2. Geografska rasprostranjenost vrste *A. torrentium*
 (žuta boja: prirodan areal, ljubičasta boja: naknadno unesen; izvor:
<http://www.iucnredlist.org>)

1.2. Biologija vrste *Austropotamobius torrentium*

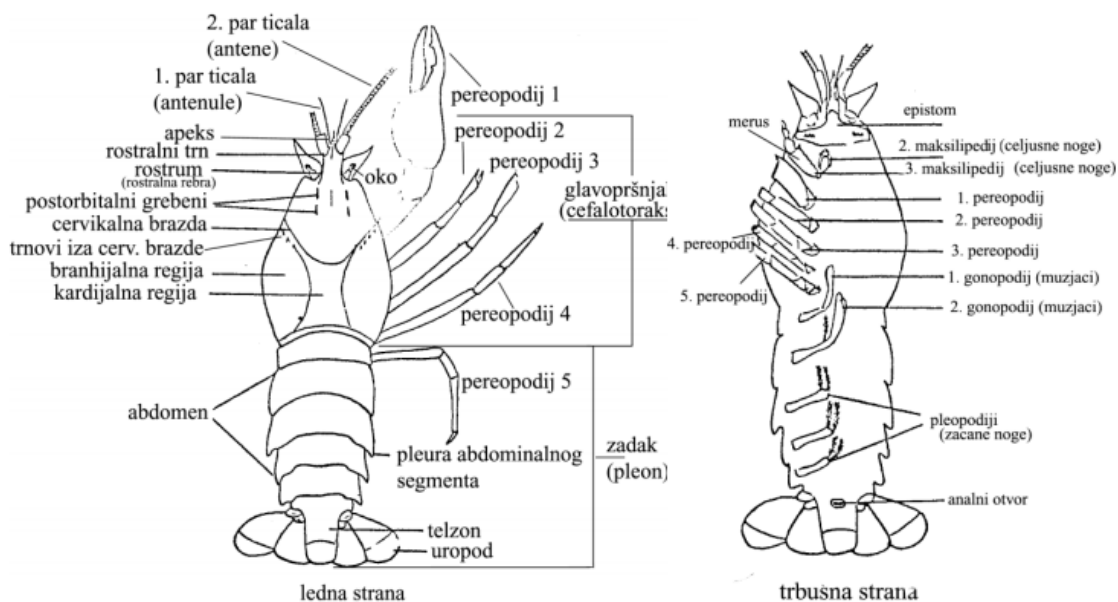
1.2.1 Morfološke karakteristike vrste

Svim rakovima porodice Astacidae zajednička je tagmatizacija tjelesnih kolutića u dvije funkcionalne skupine – glavopršnjak (lat. *cephalotorax*) i zadak (lat. *pleon*). Glavopršnjak je sastavljen od pet kolutića cefalona koji su srasli s osam kolutića toraksa. Na njemu se nalaze pomične stapkaste oči na pokretnim drščima, dva para ticala, čeljusti sastavljene od gornje i dva para donjih čeljusti, tri para čeljusnih nožica te pet pari nogu za hodanje. Prvi par nogu za hodanje je preobražen u kliješta.

Karapaks je prekriven kožnim naborom ili korom (karapaks) koja ima zaštitnu funkciju te je na njemu vidljiva transverzalno položena cervikalna brazda koja predstavlja granicu između cefalona i toraksa.

Zadak je sastavljen od pet članaka koji nose plivaće nožice i repnu peraju koja je sastavljena od uropoda i telzona. Kod mužjaka su prva dva para plivaćih nožica pretvorena u kopulatorne organe, a kod ženki je prvi par reduciran (Slika 3.) (Maguire, 2010).

Razdvojena su spola te je prisutan spolni dimorfizam. Nakon postizanja spolne zrelosti mužjacima brže rastu klijesta, a ženkama zadak kao prilagodba za nošenje jaja (Maguire, 2010). Razlikuju se i u položaju spolnih otvora – kod ženki je na trećem paru prsnih nogu za hodaње, kod mužjaka na petom paru.



Slika 3. Vanjska morfologija rakova (preuzeto iz Maguire, 2010)

Potočni rak je najmanja vrsta porodice Astacidae. Najveći primjerci dosegnu duljinu od 11 cm, iznimno 15 cm. Mužjaci su nešto veći – 8 do 11 cm, dok su ženke manje - 6 do 9 cm.

Tijelo im je tamnosmeđe do maslinastozelene boje, ali su zabilježeni i svjetliji, čak i plavi primjerci. Strane karapaksa su glatke dok je površina klijesta prekrivena grubim granulama (Slika 4).

U usporedbi s drugim vrstama, vrste roda *Austropotamobius* imaju samo jedan par postorbitalnih grebena, a glavin šiljak (rostrum) ima manje rostralne trnove.



Slika 4. *Austropotamobius torrentium* – granulirana klijesta (autorica: Leona Lovrenčić)

1.2.2. Molekularna filogenija vrste

Filogenija je znanstvena disciplina koja proučava evolucijsku povijest i odnose između pojedinih vrsta ili skupina organizama. Odnosi se uspostavljaju proučavanjem genetičkih, morfoloških i etoloških obilježja odabranih skupina.

Svi živi organizmi se tokom života i razvoja prilagođavaju okolišu u kojem žive i te se promjene mogu vidjeti na njihovim promijenjenim morfološkim obilježjima. Ali, suprotno učenjima Lamarcka – promjena vanjskih obilježja ne utječe na genotip te se ne prenosi se na potomstvo. Isto tako, u procesu specijacije, odvojene populacije mogu s vremenom razviti promjene u svom genotipu koje se ne moraju nužno odraziti na njihovu morfologiju. Fenotipske promjene između odvojenih skupina mogu biti znak početka specijacije, ili znak očekivane prilagodbe jedinki drugom okolišu.

Primjenom molekularnih metoda u filogenetskim istraživanjima danas možemo detaljnije i točnije opisati evoluciju vrsta i njihovu genetičku povezanost ili različitost.

Kao što je već rečeno, porodica Astacidae uključuje tri roda – *Astacus*, *Austropotamobius* i *Pacifastacus* koji su filogenetski opisani kao sestrinske skupine (Martin i Davis, 2001). Prema Trontelj i sur. (2005), vrste roda *Austropotamobius* su monofiletskog porijekla te su sestrinske skupine.

Mitohondrijska DNA (mtDNA) pokazala se kao odličan model za molekularno – filogenetske analize jer se prvenstveno lako izolira, ima veliku brojnost unutar stanica, genom je malen te ne sadrži introne (kod životinja) i nasljeđuje se po majčinoj liniji što sve uvelike olakšava rad i vršenje analiza.

Dosadašnja molekularno – filogenetska istraživanja temeljena na mtDNA rakova roda *Austropotamobius* su napravila velik pomak, ali i pomutnju. Unutar roda *Austropotamobius* je dokazano da vrsta *A. pallipes* posjeduje visoku genetsku raznolikost između, ali i unutar samih populacija te se sugerira *A. pallipes* zvati kompleksom vrsta (Holdich, 2002). Dodatna istraživanja upućuju da postoje dvije dobro definirane vrste unutar kompleksa, *A. pallipes* i *A. italicus* koje se treba smatrati odvojenim vrstama. Unutar vrste *A. italicus* je opisano i nekoliko podvrsta (Zaccara i sur., 2004, 2005; Fratini i sur., 2005; Trontelj i sur., 2005; Cataudella i sur., 2006)

Vrsta *Austropotamobius torrentium* je manje proučavana na taksonomskoj i filogenetskoj razini za razliku od vrste *A. pallipes* i dosada je unutar vrste opisano 7 divergentnih linija (Trontelj i sur., 2005; Klobučar i sur., 2013).

1.2.3. Geodinamički procesi kao uzrok genetičke raznolikosti vrste

Prema dosadašnjim analizama mitohondrijske DNA s područja cijele Europe (Trontelj i sur., 2005), otkriveno je da unutar vrste *A. torrentium* postoji visoka genetska raznolikost te se mogu odvojiti jasno definirani haplotipovi. Uočeno je da su populacije sjeverno i zapadno od Alpa bogate različitim haplotipovima, ali su oni bliski i puno manje divergirani od onih jugoistočno od Alpa. Taj uzorak pokazuje da su se povijesni događaji koji su utjecali na razdvajanje populacija dogodili u drugoj polovici miocena (Trontelj i sur., 2005; Klobučar i sur., 2013). Geodinamičkim procesima nastanka mladih planina na području današnjeg Mediterana, more Tetis se odvojilo na dva područja: Mediteran i Paratetis. Paratetis je obuhvaćao područje središnje Europe, sve do zapadne Azije. Zbog promjena u klimi, tektonskog uzdizanja, orogeneze Alpi i Dinarida te mesinske krize saliniteta, Paratetis je prošao nekoliko procesa refragmentacije te izolacije pojedinih podbazena što je pogodovalo razvoju endemske biote (Palcu i sur., 2015).

Na prijelazu između pliocena i pleistocena, tektonske promjene na području Dinarida, bile su ključne za formiranje krajobraza i razvoja krškog reljefa što je dovelo do stvaranja

široke hidrogeografske mreže površinskih i podzemnih vodenih tokova te naseljavanje faune (Verovnik, Sket i Trontelj, 2004; Trontelj i sur. 2007).

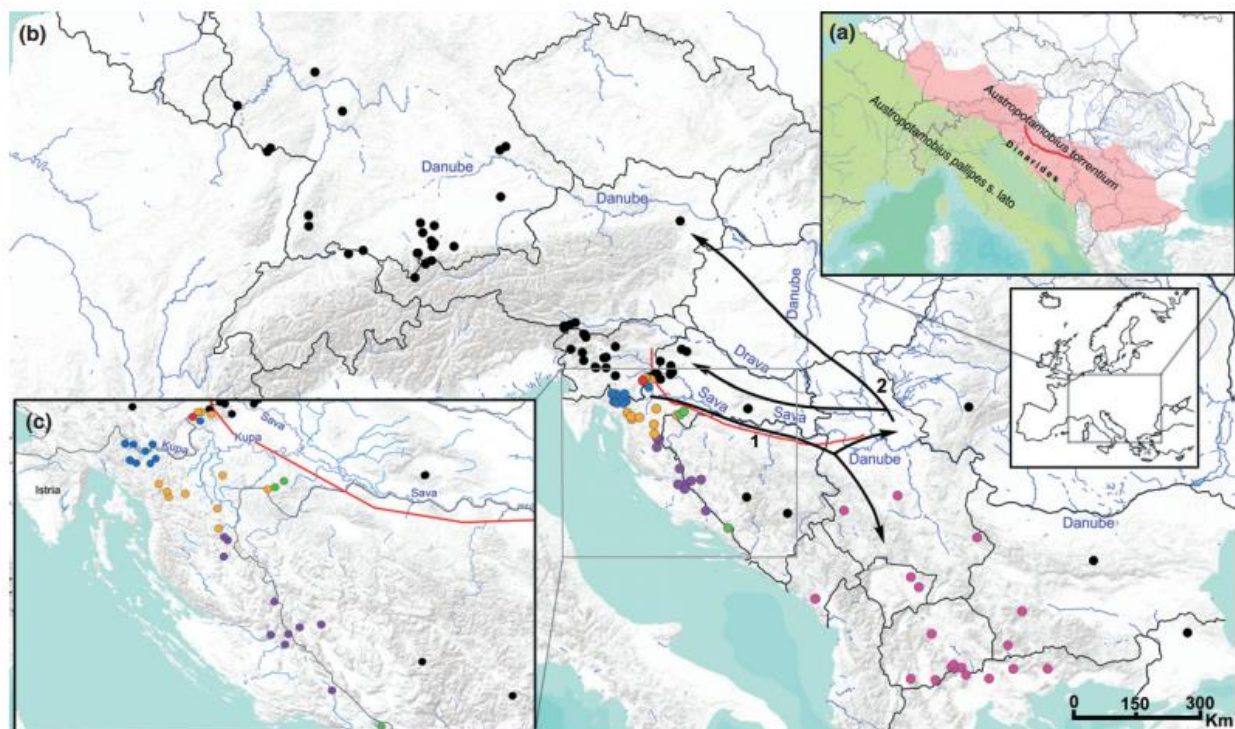
Dinarski krš obuhvaća područje unutar samih Dinarida, od Italije i Austrije na sjeverozapadu do južne Albanije na jugoistoku. Velika raznolikost mitohondrijske DNA na području jugoistočne Europe pokazuje da je područje dinarskog krša vruća točka („hot spot“) bioraznolikosti (Gaston i David, 1994). Novija filogenetska istraživanja su pokazala da postoji mnogo mikrorefugija za različite taksone unutar dinarske regije (Verovnik i sur. 2005).

1.2.4. Geografska rasprostranjenost različitih haplotipova

Kao što je već rečeno, potočni rak je jedna od pet autohtonih vrsta slatkovodnih rakova koji žive na području središnje i istočne Europe. Nastanjuje prostor od Njemačke i Češke na sjeveru, zapadno do Luksemburga i Francuske, južno do Grčke i istočno do Bugarske (Holdich, 2002). Pronađen je i na teritoriju Turske, ali se ne zna je li unesen ili je tamo prirodno rasprostranjen (Harlioglu i Güner, 2006).

U Hrvatskoj ga nalazimo u vodotocima crnomorskog slijeva kontinentalnog dijela, a zabilježen je i u nekoliko potoka jadranskog slijeva, kao što su pritoke Zrmanje i Krke (Maguire i sur., 2011).

Klobučar i sur. (2013) su analizom gena mitohondrijske c oksidaze podjedinice 1 (COI) i 16S rRNA gena utvrdili postojanje sedam značajno divergentnih filogrupa koje su i geografski definirane. To su: „južni Balkan“ (SB), „središnja i jugoistočna Europa“ (CSE) te pet filogrupa koje pripadaju području sjeverno - središnje dinarske regije (eng. *northern – central Dinaric region*, NCD). One odgovaraju geografskim područjima gdje su prikupljene jedinke: „Banovina“ (BAN), „Gorski Kotar“ (GK), „Lika i Dalmacija“ (LD), „Zeleni Vir“ (ZV) te „Žumberak, Plitvice i Bjelolasica“ (ŽPB) (Slika 5).



Slika 5. a) Karta Europe koja pokazuje areal vrste *Austropotamobius pallipes sensu lato* i *Austropotamobius torrentium* u odnosu na Dinaride. b) Karta geografske distribucije različitih filogrupa vrste *A. torrentium* u Europi. Crne strelice pokazuju vjerojatno prepleistocensko (1) i širenje poslije ledenih doba (2). c) Distribucija različitih filogrupa unutar sjeverno – centralne dinaridske regije u Hrvatskoj. Crvene linije na (a), (b) i (c) pokazuju južnu granicu Panonskog jezera u periodu između kasnog miocena i ranog pliocena. Oznake na kartama: crne točke – srednja i jugoistočna Europa (CSE), plave točke – Gorski Kotar (GK), ljubičaste točke – Lika i Dalmacija (LD), narančaste točke – Žumberak, Plitvice i Bjelolasica (ŽPB), ružičaste točke – južni Balkan (SB), zelene točke – Banovina (BAN) i crvene točke – Zeleni Vir (ZV). (Preuzeto iz Klobučar i sur., 2013)

1.2.5. Ugroženost i zaštita vrste

Potočni rakovi obitavaju na višim nadmorskim visinama, obično u izvorišnim i gornjim dijelovima potoka, u brzim tekućicama s kamenitim dnom (Maguire i Gottstein-Matočec, 2004; Füreder i sur. 2010). Odgovara im niža temperatura vode, uglavnom prosječna godišnja temperatura ne prelazi 10 °C (Maguire i Gottstein-Matočec, 2004). Noćne su životinje koje preferiraju staništa s puno zaklona jer se preko dana zadržavaju u sklonišcima, pod kamenjem, korijenjem ili u rupama koje naprave u obalama potoka, rijeka i jezera. Noćni

način života je evolucijska prilagodba koja im omogućava izbjegavanje predatora, ali i odgovara dnevnom ciklusu njihovog plijena. Prehrana je raznovrsna, od bentičkih bezkralježnjaka i detritusa do vodene vegetacije, a i sami su plijen raznim vodenim predatorima pa su time ključan dio akvatičkih ekosustava (Maguire, 2010).

Brojna istraživanja u Europi i Hrvatskoj bilježe značajan pad broja jedinki autohtonih vrsta roda *Austropotamobius* i potočni rakovi su stavljeni pod zaštitu nacionalnih i međunarodnih institucija. Na međunarodnoj razini su uvršteni na IUCN-ovu crvenu listu ugroženih životinja pod oznakom DD – *data deficient* (nedovoljno istražen) dok je u Hrvatskoj prema IUCN kriterijima klasificiran kao VU – *vulnerable* (osjetljiva vrsta). Dodatno je u Hrvatskoj uvršten u Pravilnik o strogo zaštićenim vrstama (NN 144/2013) zajedno s vrstama *A. pallipes* i *Astacus astacus*.

Izuzetno su netolerantni na promjene u staništu i zagađenje okoliša (Maguire i Gottstein-Matočec, 2004). Najveća prijetnja njihovoj brojnosti je antropogeni utjecaj na stanište (Füreder i sur., 2006). Direktno prijetnje koje ih ugrožavaju su urbani razvoj, neplanske promjene vodenih režima, kanaliziranja i produbljivanja korita, izgradnja brana i akumulacija, uništavanje obalne vegetacije koju potočni rakovi koriste kao sklonište. Dodatan problem su i onečišćenje rijeka i potoka otpadnim vodama te korištenje pesticida u poljoprivredi koji u slatke vode dolaze ispiranjem tla ili iz zraka. Fragmentacija ili izolacija njihovih staništa je često posljedica antropogenog utjecaja, što smanjuje protok gena i gensku raznolikost te dovodi do potencijalnog izumiranja populacija, a prema Bohl (1997) kod potočnih rakova ne dolazi do rekolonijalizacije nakon što nestane lokalna zajednica.

Dodatan problem za sve populacije autohtonih slatkovodnih rakova u Europi je i prisutnost alohtonih vrsta. Američke alohtone vrste su unesene krajem 19. stoljeća radi uzgoja u akvakulturi, a zajedno s njima, na područje Europe unesena je i račja kuga. Američke vrste su otporne na zarazu i samo su vektori širenja uzročnika bolesti, vodene plijesni *Aphanomyces astaci* Schikora, 1906 (Oomycetes) koja napada autohtone vrste i u njih izaziva razvoj bolesti te najčešće završava uginućem. Alohtone vrste dodatno dominiraju u kompeticiji za staništem i hranom (Holdich i sur., 2009) te svojom prisutnošću utječu na brojnost i raznolikost autohtonih populacija.

U Europi su najčešće američke alohtone vrste *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) iz porodice Astacidae te *Faxonius limosus* (Rafinesque, 1817) i *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) iz porodice Cambaridae. Uz zabilježene američke vrste, u Europi danas možemo naći i vrste australskog roda *Cherax* (Erichson, 1846) iz porodice Parastacidae.

Zbog velike važnosti za akvatičke ekosustave i uske ekološke valencije te osjetljivosti na zagađenje i promjene staništa, potreban je poseban oprez te dodatna zaštita preostalih populacija. Potočni rak je uvršten u Dodatke Direktivi u sklopu ekološke mreže Natura 2000 te je potrebno više istraživanja kako bi se utvrdila točna brojnost i sastav populacija te očuvalo njihova prirodna staništa.

1.3. Geometrijska morfometrija u znanstvenim istraživanjima

Analiza oblika je važan dio mnogih bioloških istraživanja. Različiti biološki procesi mogu dovesti do razlika u morfologiji jedinki ili njihovih dijelova tijela i razlike u morfologiji mogu ukazati na uzroke i procese koji su doveli do te raznolikosti te adaptaciju jedinki na promjene u stanišnim ili ekološkim uvjetima (Baltanás, 2008).

Morfometrija je grana morfologije koja povezuje statistiku s morfologijom. Na kvantitativan način opisuje, analizira i interpretira promjene veličina i oblika morfoloških cjelina uz upotrebu statističkih metoda na osnovu podataka dobivenih mjerenjem (Rohlf, 1990). Cilj metode je univarijantnim i multivarijantnim statističkim metodama utvrditi odnose veličine i oblika morfološke cjeline te odstupanje u razlikama u veličini i obliku promatrane cjeline između jedinki iste vrste kao i između grupa različitih taksona (Ivanović i Kalezić, 2009).

Stariji pristup analizi morfoloških cjelina je tradicionalna ili klasična morfometrija koja ima neka ograničenja u obradi podataka u odnosu na noviju granu morfometrije koja je korištena u ovom radu – geometrijsku morfometriju.

Metode tradicionalne morfometrije koriste izmjerene (linearne) dimenzije između jasno definiranih točaka određene morfološke cjeline, ali se ne uzimaju u obzir geometrijske konfiguracije značajki, odnosno oblik. Izmjerene vrijednosti (udaljenost, kutevi, omjeri) se nalaze izvan konteksta u geometrijskom i biološkom smislu (Bookstein, 1993) i taj gubitak informacija čini ovu metodu ograničenom. Uz to, metode mjerenja su često subjektivne, nije moguće rekonstruirati originalan oblik samo na temelju izmjerenih linearnih vrijednosti, te one čine samo mali dio informacija o obliku (Lestrell, 1997).

Geometrijska morfometrija (dalje u tekstu: GM) je grana morfometrije koja konceptualno i statistički omogućava analize varijabilnosti u veličini i obliku složenih morfoloških struktura (Ivanović i Kalezić, 2009). Analizira položaj, odn. koordinate karakterističnih

točaka mjerenja i kao rezultat daje vizualizaciju i kvantifikaciju željene morfološke strukture - oblika. Polazni podaci u analizama GM su konfiguracije specifičnih točaka (eng. *landmarks*, LM) koje jasno odgovaraju karakterističnim morfološkim točkama i koje možemo točno odrediti na svim jedinkama u uzorku. Odabir točaka je izuzetno bitan i potrebno je vrlo dobro poznavanje anatomije istraživanog objekta. Raspored specifičnih točaka treba što bolje ocrtavati oblik i ravnomjerno pokriti cijelu strukturu. Bookstein (1993) predstavlja tri osnovna tipa specifičnih točaka:

a) sjecišta različitih morfoloških cjelina (npr. točka na kojoj se sijeku dva ili više živaca u nervaturi krila kukaca) i jasno definirani centri nekih anatomskih struktura (npr. zjenica oka, centri manjih otvora na skeletu kukaca)

b) točke koje predstavljaju mjesta najvećeg zakrivljenja (udubljenja, ispupčenja) anatomske strukture (npr. vrh ticala, vrh tjelesnog nastavka); ovaj tip točaka pokazuje najveći postotak pogreške

c) ekstremne, rubne točke koje se mogu definirati samo u odnosu na cijelu strukturu; također postoje ograničenja i postoji nešto veći postotak pogreške zbog subjektivnosti ili nepostojanja fotografije cijelog uzorka.

Prema Zeldich i sur. (2004), idealne specifične točke su homologni anatomske lokusi koji ne mijenjaju svoj topološki položaj u odnosu na druge točke mjerenja, imaju dovoljnu pokrivenost cijele morfologije, mogu se pouzdano naći na svim promatranim objektima i nalaze se u istoj ravnini kao ostale specifične točke. Prednost GM je da pri analizama omogućuje usporedbe veličine i oblika morfološke cjeline kombinacijom uni- i multivarijantnih statističkih metoda i metoda direktnog grafičkog predstavljanja varijabilnosti oblika (Adams i sur. 2004). Nadalje, metoda je osjetljiva i otkriva promjene/razlike u obliku koje klasična morfometrija često ne može otkriti (Klingenberg, 2002). U ovoj metodi veličine centroida predstavljaju veličinu proučavane morfološke cjeline, a one se definiraju kao raspršenje svake točke (LM) od središta (središnja vrijednost svih mjera tog LM) mjenjenog oblika (Bookstein, 1991). Kako bi se uklonili efekti veličine, položaja i orijentacije i jasno definirao oblik morfološke cjeline potrebno je provesti Generaliziranu Prokrustovu analizu (engl. *Generalized Procrustes analysis*, GPA) odnosno Prokrustovu superimpoziciju (poravnavanje) (Rohlf i Slice, 1990; Dryden i Mardia, 1998, citirano iz Klingenberg, 2013; Rohlf, 1999).

Danas je GM bitna u mnogim biološkim disciplinama i često se primjenjuje u različitim taksonomskim, ekološkim i evolucijskim istraživanjima oblika tijela. U istraživanjima slatkovodnih rakova, specifično potočnog raka, do sada su bila provedena istraživanja morfometrije klasičnim pristupom (Maguire et al., 2017), a na manjem setu podataka je proveden i geometrijsko-morfometrijski pristup (Pavić, 2019). Stoga je provedeno ovo istraživanje kako bi se nadopunile spoznaje o razlikama u obliku različitih populacija/filogrupa vrste *A. torrentium*.

1.4. Odabir glavopršnjaka kao model sistema za GM istraživanja

Prema Ivanović i Kalezić (2009) evolucijska morfologija proučava složene sisteme koji imaju izraženu varijabilnost pri čemu se oslanja na statistiku. Primjenom statistike se može utvrditi kako pojedinačni čimbenici utječu na varijabilnost odabrane osobine ili modela. Pritom je bitno odabrati model koji je reprezentativan i nije pod utjecajem čimbenika koji nam nisu od interesa.

Morfometrijska mjerenja se već godinama koriste kao način određivanja razlika između populacija i vrsta slatkovodnih rakova te su se pokazala kao pouzdana metoda koja daje relevantne rezultate (Maguire i Dakić, 2011; Sint i sur., 2005). Streissl i Hödl (2002) su pokazali da kod slatkovodnih rakova postoji spolni dimorfizam koji se odražava u alometrijskom rastu kliješta kod mužjaka te abdomena kod ženki, a istraživanja Scalici i sur. (2010) su dovela do saznanja da se ne postoje razlike između spolova u obliku glavopršnjaka. Kako bi se izbjegle pogreške i odstupanja u mjerenjima, pogotovo u usporedbi s različitim istraživanjima odvojenih populacija vrste, bilo je potrebno odabrati specifične točke koje nisu pod utjecajem spolnog dimorfizma. Scalici i sur. (2010) su se u daljnjem istraživanju usmjerili na anteriorni dio glavopršnjaka i odredili točke mjerenja koje nisu pod utjecajem spolnog dimorfizma. Posebnu pozornost su posvetili obliku rostruma jer je pokazano da je morfologija rostruma važan model za determinaciju i razlikovanje populacija te odražava zemljopisno porijeklo jedinki (Albrecht, 1982).

U ovom diplomskom radu je glavopršnjak odabran kao model sistem i poseban fokus je stavljen na anteriornu regiju, po uzoru na istraživanja Scalici i sur. (2010. i 2012.), ali su odabrane drugačije specifične točke, bolje prilagođene morfometriji vrste *A. torrentium* koje su već korištene u prethodnom istraživanju ove vrste (Pavić, 2019).

2. Ciljevi istraživanja

Glavni cilj ovog diplomskog rada je proučiti geometrijsko morfometrijske karakteristike vrste potočnog raka i to jedinki prikupljenih na području jugoistočne Europe te usporediti postoje li razlike u geometrijsko-morfometrijskim značajkama / obliku između pojedinih, prethodno utvrđenih, filogrupa.

Upotrebom geometrijske morfometrije i usporedbom s dosad prikupljenim podacima, pokazat ćemo postoje li razlike u morfološkim karakteristikama te kako dobiveni podaci odgovaraju prethodnim molekularno - filogenetskim istraživanjima i saznanjima.

Ovaj rad je nastavak prvog istraživanja geometrijsko-morfometrijskih karakteristika vrste potočnog raka započeto 2018. godine (Lovrenčić i sur. in press), a dobiveni rezultati će poslužiti za daljnja istraživanja ekoloških, evolucijskih i taksonomskih obilježja vrste na razini Europe.

3. Materijali i metode

3.1. Područja uzorkovanja na području jugoistočne Europe

Proučavani uzorci rakova vrste *Austropotamobius torrentium* prikupljeni su u razdoblju od 2005. do 2017. godine na području Hrvatske, Slovenije, Bosne i Hercegovine, Kosova, Crne Gore, Rumunjske, Bugarske te Makedonije. Lokaliteti su odabrani prema područjima prethodno izvršenih molekularno – filogenetskih istraživanja kako bi bile uključene populacije iz svih dosadašnjih opisanih filogrupa (Klobučar i sur., 2013) i kako bi se mogli usporediti dobiveni podaci (Tablica 1).

3.2. Lov i uzorkovanje rakova

Rakovi su lovljeni različitim metodama; ručnim prevrtanjem supstrata dna potoka ili ručno izrađenim vršama (Maguire, 2002) sastavljenim od dva cilindra, izrezana iz plastičnih boca, umetnutih jedan u drugi te ulaznog lijevka, napravljenog od plastične mrežice, na krajevima cilindra (Slika 6). Ovakav tip vrše odgovara manjim vodotocima kao što su vodotoci na lokalitetima u sklopu ovog istraživanja. Vrše su bile postavljane predvečer uz rub vodotoka, a kao mamac su korištene hrenovke. Vrše s mamcima su ostavljene u potoku do slijedećeg dana, a uhvaćeni rakovi su premješteni u kantu s vodom do daljnih mjerenja.



Slika 6. Izgled i položaj ručno izrađene vrše u potoku

Tablica 1. Lokaliteti na kojima su prikupljane jedinke za analize

Filogrupa	Lokaliteti	Broj rakova ukupno/ovo istraživanje
BAN	Bručina - Mali Gradac; Bručina - Drenovac Banski; Graduša - Žabari; Maja; Stupnica; Petrinčica; Glina, Slunjčica; Radošnica	52/11
CSE	bezimeni potok (Bugarska – dunavski sliv); Curak - Glušinja; potok Jarak; potok Konšćica (Rude); Okićnica; Jarak - pritoka Bregane; bezimeni potok (Rumunjska-dunavski sliv); bezimeni potok pritoka Bosne (BiH)	104/53
GK	Polje Lug; Blate; Skrad; Mrzlica; Bela Vodica; Leskova Draga; Bresni potok; Vele vode; Delnički potok; Bukovska Dobra	60/31
LD	bezimena pritoka Zrmanja; Preodac – Bosansko Grahovo; Kobilica; Orašnica; Prijeboj; Čujića Krčevine; Krasulja	86/27
SB	Rijeka Crnojevića (Crna Gora); bezimeni potok (Bugarska – egejski slijev); Lumi Zhegovc i Orllan (Kosovo); Bošava, Jakupica, Bitola, Kozuf, Manastirska rijeka (Makedonija)	56/56
ZV	Zeleni Vir	11/11
ŽPB	Graba (Drežnica); pritoka Jamnika; Sopotski slap; Ratković; Tounjčina; Krakarski potok; Jarak; Sartuk; Slapnica	63/34

3.3. Geometrijsko morfometrijska analiza rakova

Jedinke su analizirane neovisno o spolu, budući da učinak seksualnog dimorfizma na GM značajke u istraživanju Scaliccia i sur. (2010) vrste *A. pallipes* kao ni za vrstu *A. torrentium* (Lovrenčić i sur., in press) nije utvrđen.

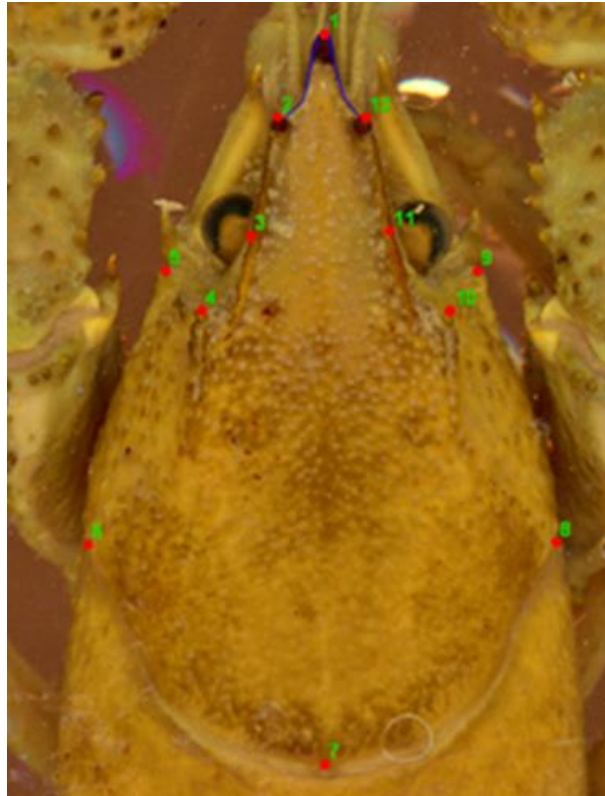
Za geometrijsko morfometrijsku analizu su korištene skenirane fotografije prikupljenih jedinki koje su obrađene pomoću programskih paketa TPS (Jamer Rohlf) i MorphoJ (Klingenberg, 2011).

3.3.1. Odabir specifičnih točaka mjerenja na glavopršnjaku

Na svakom raku određene su 22 dvodimenzionalne specifične točke mjerenja (engl. *landmarks* - LM i *semilandmarks* - SLM) (Tablica 2.) koje su označene uvijek istim rasporedom na istim, prethodno odabranim, položajima na glavopršnjaku jedinki. Poseban fokus stavljen je na oblik apeksa rostruma te sam rostrum (Slika 7.).

Postavljanje specifičnih točaka (LM i SM) izvedeno je u računalnom programu TpsDig2, a za statističku obradu dobivenih podataka korišten je program MorphoJ (Klingeneberg, 2011), uz korištenje Generalizirane Prokrustove analize (GPA), Analize glavnih komponenti (PCA) te Kanoničke diskriminantne analize (CVA).

Ove metode su primjenjene jer, za razliku od tradicionalne morfometrije, bolje prikazuju razlike između oblika i veličine morfološke cjeline i nisu ovisne o samoj veličini promatranih jedinki.



Slika 7. 12 karakterističnih LM (prikazano crvenim točkama) i 2 plave linije (svaka od po 5 SLM) za određivanje morfološke varijabilnosti glavenog dijela potočnog raka geometrijsko morfometrijskim metodama (izrađeno u TpsDig2).

Tablica 2. Oznake i opisi odabranih karakterističnih točaka – 12 *landmarks* i 10 *semilandmarks*

Karakteristične točke – landmarks (LM)	Opis karakterističnih točaka
1	Apeks rostruma
2, 12	Vrh rostralnog trna
3, 11	Rostralno rebro na prijelazu prema očnoj šupljini
4, 10	Vrh postorbitalnog grebena
5, 9	Lateralni rub karapaksa
6, 8	Lateralni rub cervikalne brazde
7	Posteriorni rub cervikalne brazde
<u>Karakteristične točke – semilandmarks (SLM)</u>	Opis karakterističnih točaka
13 – 17 , 18 – 22	Apeks rostruma – vrh rostralnog trna

3.3.2. Statistička obrada podataka dobivenih geometrijskom morfometrijom

Nakon što su sve jedinke obilježene (dodijeljene su im LM i SLM), uslijedila je statistička obrada podataka pri čemu je korišten statistički program MorphoJ (Klingenberg, 2011). Provedena je Generalizirana Prokrustova analiza (GPA) kojom je uklonjena varijabilnost uzrokovana pozicioniranjem, orijentacijom i skaliranjem (Rohlf i Slice, 1990). Veličina centroida korištena je kao varijabla veličine, a dobivene Prokrustove koordinate kao varijabla oblika.

Uslijedila je kanonička diskriminativna analiza (engl. *Canonical Variate Analysis*, CVA) kako bi se utvrdila varijabilnost u obliku između jedinki koje pripadaju u sedam različitih filogrupa. Grafički prikaz rezultata kanoničke analize omogućuje vizualizaciju utvrđenih razdvajanja analiziranih filogrupa. U grafičkom prikazu svaka kanonička os opisuje koliki se postotak razlika među grupama može pripisati pojedinoj osi. Prva kanonička os (CV1) obično nosi najveći postotak razdvajanja među srednjim vrijednostima analiziranih grupa, dok sve druge kanoničke osi (CV2, CV3, itd) opisuju manji postotak razlika među grupama. Promjene oblika duž izdvojenih kanoničkih osi grafički su prikazane u TPS deformacijskim mrežama i „*wireframe*“ grafovima. Analize su rađene na dva seta podataka; prvi set je obuhvaćao podatke prikupljene u okviru ovog diplomskog, a drugi set sveukupne podatke (iz istraživanja Pavić 2018. i ovog istraživanja) (Tablica 1.).

U svim statističkim analizama je korišten nivo značajnosti od 5% ($p < 0,05$).

4. Rezultati

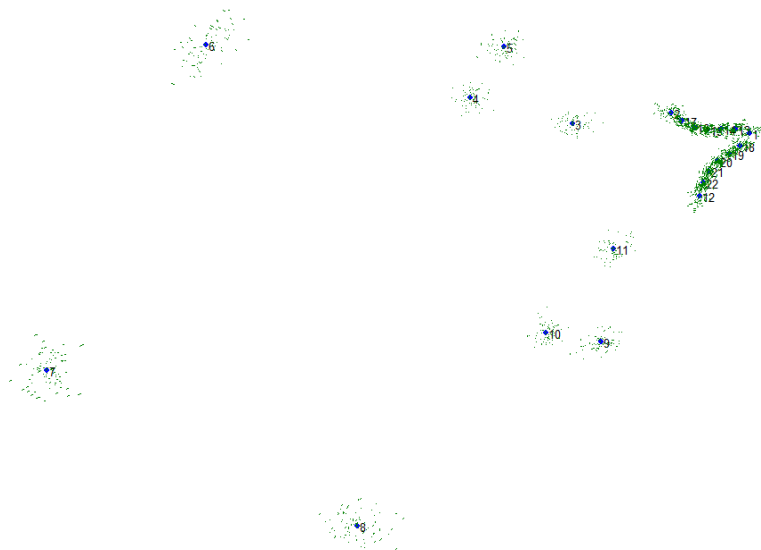
4.1. Rezultati geometrijsko morfometrijske analize rakova

Rezultati geometrijsko morfometrijske analize glavopršnjaka (dalje u tekstu GM) dobiveni su analizom 223 raka ulovljenih na području jugoistočne Europe u razdoblju od 2005. do 2017. godine (Hrvatska, Slovenija, Bosna i Hercegovina, Kosovo, Crna Gora, Rumunjska, Bugarska te Makedonija). Rađen je i drugi set analiza na sveukupnom setu podataka koji je obuhvaćao prethodne i podatke prikupljene kroz ovaj diplomski rad (Tablica 1).

Rakovi su grupirani prema prethodno određenim filogrupama. Broj ulovljenih jedinki, lokacije i brojnost po filogrupama su vidljivi u Tablici 1.

4.1.1 Generalizirana Prokrustova analiza (GPA)

U prvom setu analiza analizirane su slike 223 glavopršnjaka potočnog raka, a generaliziranom Prokrustovom analizom dobivene su varijable veličine i oblika glavopršnjaka – za svaku jedinku promatranih populacija je izračunata veličina centroida (CS) kao varijabla veličine i Prokrustove koordinate kao izdvojene varijable oblika. Vrijednosti centroida za 22 odabrane karakteristične točke glavopršnjaka (12 landmarks i 10 semilandmarks) s koordinatama X i Y su prikazane u Tablici 3., dok se njihov položaji u koordinatnom sustavu prikazan je na Slici 8.



Slika 8. Prikaz centroida 22 karakteristične točke na glavenom dijelu potočnih rakova. Plave točke uz koje se nalazi broj su centroidi, a zelene točkice raspršene oko centroida predstavljaju pojedinačne vrijednosti (koordinate) za svaku analiziranu jedinku.

Tablica 3. Vrijednosti centroida (koordinate x i y) 22 karakteristične točke glavopršnjaka potočnih rakova.

<u>Specifične točke</u>	<u>Koordinata (x)</u>	<u>Koordinata (y)</u>
1	0,15822655	0,00000000
2	0,08928615	0,04091208
3	-0,01489077	0,06885340
4	-0,09270193	0,12291358
5	-0,04141456	0,16265264
6	-0,32745274	0,25602336
7	-0,58519206	0,00000000
8	-0,32745274	-0,25602336
9	-0,04141456	-0,16265264
10	-0,09270193	-0,12291358
11	-0,01489077	-0,06885340
12	0,08928615	-0,04091208
13	0,15332318	0,00592530
14	0,13628247	0,01129642
15	0,11846602	0,01671289
16	0,10214321	0,02459420
17	0,09044173	0,03504712
18	0,15332318	-0,00592530
19	0,13628247	-0,01129642
20	0,11846602	-0,01671289
21	0,10214321	-0,02459420
22	0,09044173	-0,03504712

4.1.2. Analiza oblika glavopršnjaka i usporedba različitih filogrupa

Kako bismo utvrdili postoje li morfometrijske razlike između pojedinih filogrupa, upotrebljavamo kanoničku diskriminativnu analizu (CVA). To je metoda koja povezuje osnovnu analizu komponenti i kanoničku ovisnost. Prilikom proučavanja nekoliko varijabli između dvije ili više grupa, CVA procjenjuje linearnu kombinaciju varijabli koja ima najveću moguću povezanost između grupa. Za analizirane jedinice rakova dobiveno je šest kanoničkih diskriminantnih funkcija (KDF). Položaj rakova u morfo-prostoru koje smo prikazali u ovom radu najbolje definiraju prve dvije kanoničke funkcije – CV1 i CV2. U prvom setu analiza koji obuhvaća nove podatke, CV1 opisuje varijabilnost od 44,30 %, a CV2 objašnjava varijabilnost oblika u vrijednosti od 30,21 %, kumulativno 70,20 % varijabilnosti (Tablica 4.).

Tablica 4. Svojtvene vrijednosti (eng. *eigenvalues*) i udio varijance u kanoničkoj diskriminantnoj analizi geometrijske morfometrije za prvi set podataka (novi uzorci)

KDF	Svojtvene vrijednosti	% varijance	% kumulativno
1.	1,10085262	44,300	44,300
2.	0,64378642	25,907	70,207
3.	0,33367756	13,428	83,635
4.	0,29077446	11,701	95,336
5.	0,07394233	2,976	98,312
6.	0,04195594	1,688	100,000

Udaljenosti između pojedinih filogrupa predstavljene su kao Prokrustove udaljenosti. U većini slučajeva, filogrupe su značajno udaljene (iznimka su parovi SB-BAN; ZV-CSE i ŽPB-ZV) (Tablica 5.). Prema dobivenim podacima, najveća udaljenost u morfo-prostoru je između filogrupa GK i BAN (0,0504) te SB i GK (0,0491) pa slijedi LD i BAN (0,0401) što je i vidljivo iz kanoničkog prikaza diskriminantne analize (Slika 9). Najmanja vrijednost

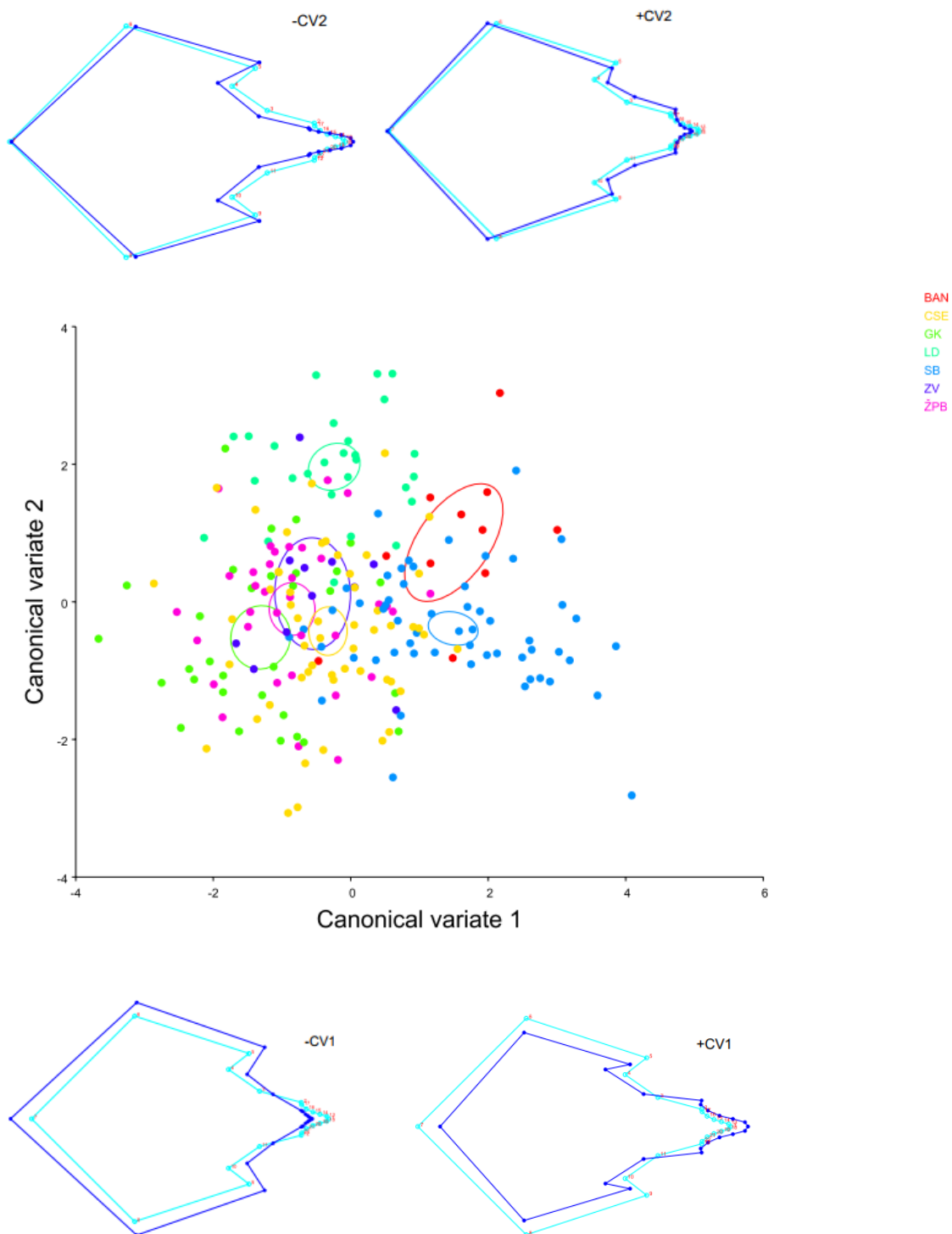
Prokrustove udaljenosti je između filogrupa ŽPB i ZV, ali ona nije statistički značajna (0,0074).

Prva kanonička os odvaja jedinke iz SB i BAN od ostatka filogrupa (Slika 9). Kako je ova os u pozitivnom smjeru karakterizirana izduženim apeksom rostruma, možemo reći da su jedinke iz SB i BAN karakterizirane duljim apeksom rostruma u odnosu na potočne rakove iz drugih filogrupa. Nadalje, druga kanonička os odvaja jedinke iz filogrupe LD od ostalih filogrupa. Kako je pozitivni dio druge osi karakteriziran robusnijom glavom (lateralno proširena u odnosu na prosjek) i širim i kraćim rostrumom, možemo reći da je moguće razlikovati rakove iz filogrupe LD upravo po tim značajkama oblika glavopršnjaka (Slika 9). Jedinke iz ostalih filogrupa se u prikazu prve dvije kanoničke osi većinom preklapaju.

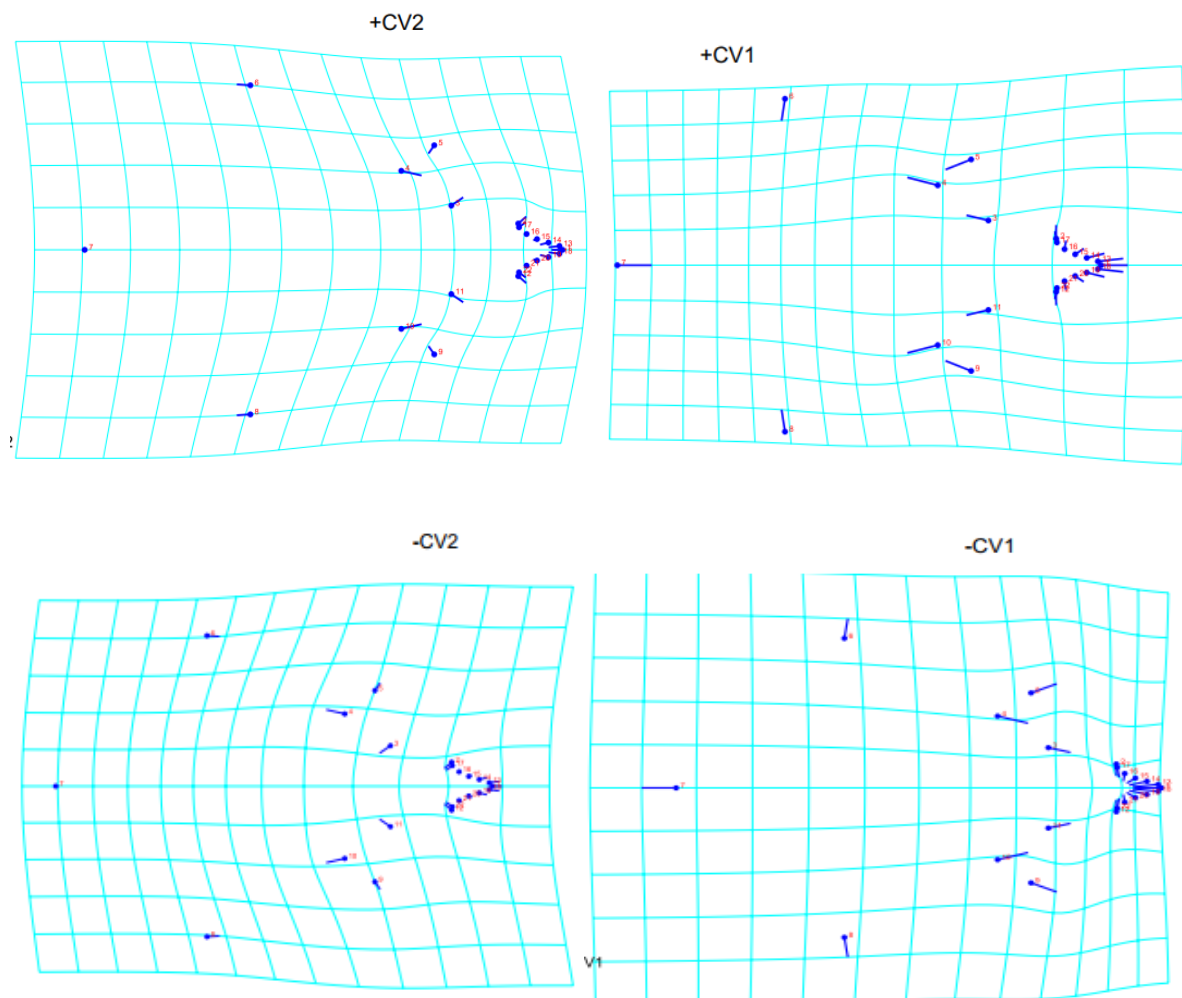
Promjene oblika glavenog dijela rakova iz različitih filogrupa, u maksimalnom/ ekstremnom pozitivnom i negativnom smjeru, prikazanih pomoću TPS deformacijskih mreža za prve dvije osi prikazana je na Slici 10 i odgovara prikazu oblika na Slici 9.

Tablica 5. Prokrustove udaljenosti između analiziranih filogrupa rakova su prikazane iznad dijagonale, a P vrijednosti permutacijskog testa analiziranih Prokrustovih udaljenosti sedam filogrupa ispod dijagonale.

	BAN	CSE	GK	LD	SB	ZV	ŽPB
BAN	XX	0,0267	0,0504	0,0401	0,0120	0,0369	0,0391
CSE	<,0001	XX	0,0267	0,0248	0,0249	0,0218	0,0239
GK	<,0001	<,0001	XX	0,0251	0,0491	0,0280	0,0292
LD	0,0026	<,0001	<,0001	XX	0,0386	0,0192	0,0206
SB	0,1670	<,0001	<,0001	<,0001	XX	0,0334	0,0353
ZV	0,0005	0,1802	0,0064	0,0017	0,0009	XX	0,0074
ŽPB	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	0,6859	XX



Slika 9. Kanonički prikaz diskriminantne kanoničke analize napravljene za 22 homologne točke glavopršnjaka rakova iz 7 filogrupa (boje odgovaraju nazivu u legendi). Svijetlo plava boja označava hipotetsku konsenzus jedinku, odnosno prosječnu vrijednost svih proučavanih oblika. Tamno plava boja označava najekstremniji oblik, odnosno odstupanje od konsenzus oblika.



Slika 10. Promjene oblika glavopršnjaka različitih filogrupa prikazanih pomoću TPS deformacijskih mreža. Plavi vektori označavaju promjene i deformacije mreža koje odgovaraju osima CV1 i CV2 u pozitivnim i negativnim smjerovima.

I u drugom setu podataka je dobiveno šest kanoničkih diskriminantnih funkcija, a položaj rakova u morfo-prostoru prikazanom u radu se odnosi na prve dvije kanoničke funkcije koje zajedno objašnjavaju 65,05 % varijabilnosti; CV1 definira 38,56 % varijabilnosti, a CV2 26,48 % (Tablica 6.).

Tablica 6. Svojstvene vrijednosti (eng. *eigenvalues*) i udio varijance u kanoničkoj diskriminantnoj analizi za drugi set podataka (zajedno novi i stari podaci)

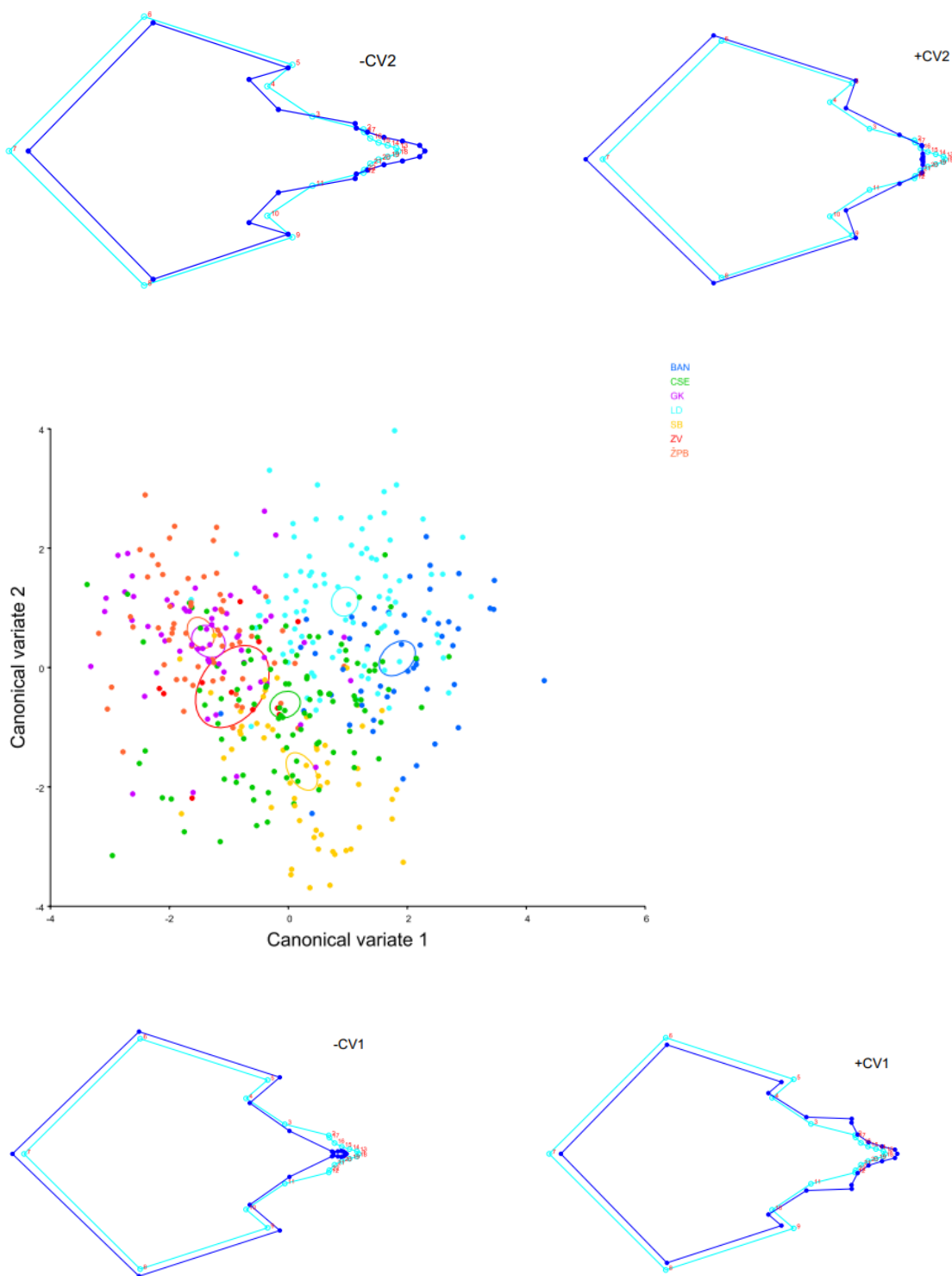
KDF	Svojstvene vrijednost	% varijance	% kumulativno
1.	1,199	38,564	38,564
2.	0,824	26,488	65,052
3.	0,437	14,057	79,108
4.	0,330	10,617	89,726
5.	0,284	9,131	98,857
6.	0,036	1,143	100,000

Prokrustove udaljenosti između jedinki različitih filogrupa su prikazane u Tablici 7. Sve filogrupe su međusobno bile statistički značajno udaljene/različite, osim rakova iz filogrupa ZV i ŽPB. Rezultati ukazuju da je najveća udaljenost bila između filogrupa GK i SB (0,0504), a zatim između ŽPB i SB (0,0480) (Tablica 7).

Tablica 7. Prokrustove udaljenosti između analiziranih filogrupa rakova. Udaljenost koja nije bila statistički značajna označena je u kurzivu.

	BAN	CSE	GK	LD	SB	ZV
CSE	0,0147					
GK	0,0411	0,0338				
LD	0,0292	0,0256	0,0290			
SB	0,0230	0,0229	0,0504	0,0403		
ZV	0,0315	0,0244	0,0243	0,0234	0,0334	
ŽPB	0,0443	0,0368	0,0256	0,0233	0,0480	<i>0,0198</i>

Na Slici 11. prikazana je diskriminacija između 7 filogrupa (set koji uključuje ukupno 432 raka) dobivena kanoničkom analizom 22 homologne točke rakova. Uočljivo je da prva kanonička os dobro odvaja rakove iz filogrupa LD i BAN, od rakova iz filogrupa CSE i SB i rakova iz filogrupa GK, ŽPB i ZV. Ako imamo u vidu da je negativni smjer prve osi karakteriziran izgledom rostruma koji nalikuje jednakostraničnom trokutu možemo predvidjeti da sve jedinice koje karakterizira taj oblik rostruma vjerojatno pripadaju filogrupama iz sjevernih Dinarida, tj. GK, ŽPB i ZV. Druga os donekle izdvaja rakove iz filogrupe SB, a kako je ta os karakterizirana (u negativnom smjeru) izduženim rostrumom i apeksom, možemo reći da je to značajka koja odvaja rakove iz SB od ostalih potočnih rakova iz drugih filogrupa.



Slika 11. Kanonički prikaz diskriminantne kanoničke analize napravljene za 22 homologne točke glavopršnjaka rakova iz 7 filogrupa na datasetu koji uključuje 432 analizirana raka (boje odgovaraju nazivu u legendi). Svijetlo plava boja označava hipotetsku konsenzus jedinku, odnosno prosječnu vrijednost svih proučavanih oblika. Tamno plava boja označava najekstremniji oblik, odnosno odstupanje od konsenzus oblika.

5. Rasprava

Utjecaj okoliša na varijabilnost fenotipa je odavno prepoznat, isto kao i sam geografski položaj organizma koji utječe na morfološke razlike unutar vrste, između populacija, ali i između vrsta. Prirodna selekcija neke oblike preferira više od drugih i poznavanje razlika i prepoznavanje njihovog uzroka je bitna za poznavanje same vrste i njene evolucije.

Kod vrsta koje su osjetljive na promjene u okolišu kao što je potočni rak, i najmanja promjena u okolišnim čimbenicima može utjecati na njihovu brojnost. Populacijska genetika govori kako su male i izolirane populacije posebno osjetljive na sve promjene u genskoj zalihi. Mutacijsko taljenje („mutational meltdown“) može dovesti do akumulacije pogubnih mutacija koje utječu na uspješnost preživljavanja („fitness“). Male izolirane populacije koje imaju mali protok gena pokazuju nisku gensku raznolikost unutar populacija, te visoku gensku raznolikost između populacija. To često dovodi do genske fragmentacije unutar vrste kao posljedica lokalne adaptacije okolišu. Informacije o razini razdvajanja i geografskoj raspodjeli filogrupa je bitno znati kako bi se što bolje odredile strategije zaštite (Grandjean i Souty-Grosset, 2000).

Molekularno – filogenetsko i filogeografsko istraživanje mitohondrijske DNA potočnih rakova (Klobučar i sur., 2013) pokazalo je da na području jugoistočne Europe postoji sedam divergentnih i zasebnih monofiletskih filogrupa. Utvrđena je najveća genetska raznolikost unutar sjeverno – središnje dinarske regije koja obuhvaća pet od sedam opisanih filogrupa: Banovinu (BAN), Gorski Kotar (GK), Liku i Dalmaciju (LD), Zeleni Vir (ZV) te Žumberak, Plitvice i Bjelolasicu (ŽPB). Pronalazak tih izoliranih filogrupa upućuje na postojanje kriptičnih vrsta unutar vrste *A. torrentium* koja upućuje i na geološku povijest tog područja. Prema Trontelj i sur. (2005) glavno razdvajanje roda *Austropotamobius* na *pallipes* koji je rasprostranjen na zapadnom dijelu Europe, te *torrentium* koji obuhvaća prostor središnje i istočne Europe. Krajem miocena se Paratetis isušio, nakon mesinijske kriz saliniteta je došlo do nastanka Panonskog jezera (Magyar i sur., 1999), Dunavski sliv je nastao u bivšem Panonsko, jezeru (Gabris, 1994) i to je dovelo do nastanka različitih, odvojenih staništa koja su kasnije uvjetovala razdvajanje genskih linija i migraciju populacija. Početkom pliocena filogrupe iz NCD regije (GK, ZV, ŽPB i LD) su obitavale na jugozapadnoj granici Panonskog jezera (Magyar i sur., 1999) koja graniči s današnjim geografskim staništem.

Areal rasprostranjenosti je bio odvojen od istoka velikim boćatim jezerima, a od sjevera i zapada planinskim lancima tada mladih Dinarida i Alpa (Klobučar i sur., 2013).

Tradicionalna morfometrija od šezdesetih godina prošlog stoljeća koristi metode statističke analize kako bi što bolje objasnila razlike unutar i između grupa jedinki. Mjerenje udaljenosti, omjera i kutova između morfoloških cjelina analizira se uz pomoć multivarijaltnih statističkih metoda kako bi se definirali odnosi veličine i oblika morfološke cjeline te odstupanje u razlikama. Ali te metode ne uzimaju u obzir razlike u veličinama između jedinki, ne postoje homologne referentne točke na temelju kojih se mogu odrediti homologne linearne udaljenosti te se u setu proučavanih jedinki u obzir ne uzima i lokacija na kojoj su jedinke mjerene (Adams i sur., 2013). Ta ograničenja i potreba za boljim načinom opisivanja geometrije i prostornog rasporeda morfoloških cjelina, neovisno o veličini jedinke i/ili alometriji, doveli su do razvoja modernije metode analize oblika – geometrijske morfometrije.

Dosadašnja istraživanja na drugim vrstama porodice Astacidae su pokazala da je geometrijska morfometrija prikladna metoda procjene filogenetskog i klasifikacijskog statusa vrsta, a istraživanja su do sada provedena na vrsti *Austropotamobius pallipes* (Scalici i sur., 2010; Scalici i Bravi, 2012), *Procambarus clarkii* (Malavé *et al.*, 2018), *Cambarus halli* i *Cambarus englishi* (Helms i sur., 2015). Preliminarno istraživanje na vrsti *Austropotamobius torrentium* je provedeno prošle godine (Pavić, 2018) i cilj tog istraživanja je bio usporediti rezultate klasične, tradicionalne morfometrije i geometrijske morfometrije. S obzirom da su rezultati bili podudarni, i da se GM pokazala brzom i pouzdanom metodom, odlučeno je proširiti istraživanja uključivanjem dodatnih uzoraka koji će „pokriti“ sve prethodno utvrđene filogrupe (Klobučar i sur., 2013). Rezultati ovih istraživanja su u skladu s rezultatima Pavić (2018) i Lovrenčić i sur. (in press) i pokazali su da je GM adekvatna metoda za razdvajanje rakova iz različitih populacija/filogrupa na temelju oblika. Pokazalo se da su značajke/oblik rostruma, posebice apeksa, karakteristike koje se značajno razlikuju između filogrupa i značajno pridonose njihovom razdvajanju (Slika 9 i 11). S obzirom da su značajno različite / udaljene grupe potočnih rakova (Tablice 5 i 6) pripadale različitim genetski duboko divergiranim linijama (Klobučar i sur., 2013) možemo zaključiti da je osnova njihove morfološke razlike u njihovom genomu (Sint i sur., 2007; Cataudella i sur., 2010; Maguire i sur., 2017). Međutim, unutar filogrupa postoji određena morfološka varijabilnost (Slike 9 i 11), pa sigurno možemo reći da je dio fenotipskih razlika uvjetovan i utjecajem okoliša kao što je prethodno utvrđeno u istraživanjima Baric i sur. (2005a,b), Bertocchi i sur. (2008), Mathews i sur. (2008), Helms i sur. (2015), Berger i sur. (2018).

6. Zaključak

- Rezultati ovog istraživanja potvrdili su primjenjivost GM u analizi morfoloških značajki slatkovodnih rakova vrste *Austropotamobius torrentium*
- Značajke koje najviše pridonose razdvajanju potočnih rakova iz različitih filogrupa su oblik rostruma i apeksa, odnosno robusnost lateralnih dijelova glave
- Rezultati ovog istraživanja su kongruentni s preliminarnim rezultatima dobivenim za ovu vrstu
- U budućim istraživanjima se preporuča dodatno uključiti veći broj uzoraka po filogrupi te napraviti analize korelacija između molekularnih, morfoloških i geografskih podataka.

7. Literatura

1. Adams D. C., Rohlf F. J., Slice D. E. (2004): Geometric morphometrics: ten years of progress following the “revolution”. *Italian Journal of Zoology*, **71**: 5-16.
2. Albrecht, H. (1982): Das System der Europaischen Flusskrebse (Decapoda, Astacidae): Vorschlag und Begründung. *Mitteilungen aus dem Hamburgischen Zoologischen Museum und Institut* **79**: 187–210.
3. Baltanas A., Geometric Morphometrics – A contribution to the study of shape variability in Ostracods (2008) *Ber. Inst. Erdwiss. K.-F.-Univ. Graz* ISSN 1608-8166 Band 13 Graz
4. Bertocchi S., Brusconi S., Gherardi F., Buccianti A., Scalici M., (2010): Morphomeric characterization of the *Austropotamobius pallipes* species complex, *Journal of Natural History*, 42 (31-32)
5. Bohl, E. (1987): Comparative studies on crayfish brooks in Bavaria (*Astacus astacus* L., *Austropotamobius torrentium* Schr.). *Freshwater Crayfish*, 7, 287-294.
6. Bookstein, F. L. (1993): A brief history of the morphometric synthesis. In: L. F. Marcus, E. Bello and A. García-Valdecasas (Eds.) *Contributions to Morphometrics. Monografías. Museo Nacional de Ciencias Naturales. Consejo Superior de Investigaciones Científicas.* pp. 15-40.
7. Cataudella, R., Puillandre, N., Grandjean, F. (2006): Genetic analyses for conservation of *Austropotamobius italicus* populations in Marches region (Central Italy). *Bulletin Francais de la Pêche et de la Pisciculture* , **380-381**: 991-1000.
8. Crandall, K. A., Buhay, J. E. (2008): Global diversity of crayfish (Astacidae, Cambaridae, and Parastacidae – Decapoda) in freshwater. *Hydrobiologia*, **595**: 295-301
9. Cukerzis J. (1988): *Astacus astacus* in Europe. U: D.M. Holdich i R.S. Lowery: *Freshwater crayfish: biology, management and exploitation.* London, Croom Helm (Chapman i Hall)
10. 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

11. Fetzner, J. W. 2010. The crayfish and lobster taxonomy browser. Online: <http://iz.carnegiemnh.org/crayfish/NewAstacidea/infraorder.asp?io=Astacidea>
12. 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
13. 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>.
14. Gaston K. J., David R. (1994): Hotspots across Europe. *Biodiversity Letters*, **2**, 108–116.
15. Harlioglu, M. M., Güner, U. (2006): Studies on the recently discovered crayfish, *Austropotamobius torrentium*, in Turkey: morphological analysis and meat yield. *Aquaculture research*, **37**: 538-542.
16. Holdich D. M. (2002): Present distribution of Crayfish in Europe and some adjoining countries. *Bulletin Francais de la Pêche et de la Pisciculture*, **367**: 611-65.
17. Holdich D. M., Lowery R. S. (1988): Freshwater crayfish – biology, management and exploitation. University Press, Cambridge.
18. Holdich D. M., Reynolds J. D., Souty-Grosset C., Sibley P. J. (2009): A review of the ever increasing threat to European crayfish from non-indigenous crayfish species. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, **11**: 394-395.
19. Ivanović, A., Kalezić, M. (2009): Evolucionarna morfologija. Teorijske postavke i geometrijska morfometrija. Beograd: Biološki fakultet Univerzitetu Beogradu.
20. Klingenberg, C. P. (2002): Morphometrics and the role of the phenotype in studies of the evolution of developmental mechanisms. *Gene*, **287**: 3-10.
21. Klobučar, I. V. G., Podnar, M., Jelić, M., Franjević, D., Faller M., Štambuk, A., Gottstein, S., Simić, V., Maguire, I. (2013): Role of the Dinaric Karst (western Balkans) in shaping the phylogeographic structure of the threatened crayfish *Austropotamobius torrentium*. *Freshwater Biology* **58**, 1089–1105.
22. Kouba, A., Petrusek, A., Kozák, P. (2014): Continental-wide distribution of crayfish species in Europe: update and maps, *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, **401**: 31
23. Kozak P., Duris Z., Policar T. (2002): The stone crayfish *Austropotamobius torrentium* (Schrank) in the Czech republic. *Bull. Fr. Pêche Piscic.* **367**: 707-713

24. Lestrel, P. E. 1997. Introduction and overview of Fourier descriptors. In: Lestrel, P. E. (Ed.) *Fourier descriptors and their applications in Biology*. 4. Cambridge U.P., Cambridge. pp. 22-24.
25. Maguire, I. (2010): *Slatkovodni rakovi priručnik za inventarizaciju i praćenje*. DZZP, Zagreb.
26. Maguire, I., Gottstein-Matočec, S. (2004): The distribution pattern of freshwater crayfish in Croatia. *Crustaceana* 77 (1): 25-49.
27. 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.
28. Maguire, I., Klobučar, G. (2011): Size structure, maturity size, growth and condition index of stone crayfish (*Austropotamobius torrentium*) in North-West Croatia. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 401, 12.
29. Maguire, I., Marn, N., Klobučar, G. (2017): Morphological evidence for hidden diversity in the threatened stone crayfish *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803) (Decapoda: Astacoidea: Astacidae) in Croatia. *Journal of Crustacean Biology*, 37 (1), 7-15.
30. 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.
31. Narodne Novine (2013): Pravilnik o strogo zaštićenim vrstama. Narodne novine 144/13
32. Narodne Novine (2013): Zakon o zaštiti prirode. Narodne novine 80/13.
33. Palcu, Dan V., Tulbure, M., Bartol, M., Kouwenhoven, Tanja J. & Krijgsman, W. (2015): The Badenian-Sarmatian Extinction event in the Carpatioan foredeep basin of Romania: paleogeographic changes in the Paratethys domain. *Global and Planetary Change*. Doi: 10.1016/gloplacha.2015.08.014
34. Rohlf F. J. (2015): The tps series of software, *Italian Journal of Mammalogy* 26 (1): 9-12.
35. Rohlf, F.J. (1990): Morphometrics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **21**: 299–316
36. Rohlf, F. J., Slice D. E. (1990): Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Zoology*, **39**: 40–59.
37. Scallici, M., Spani F., Traversetti L., Carpaneto G. M., Piras P. (2018): Cranial shape parallelism in soft-furred sengis: moving on a geographic gradient. *Journal of Mammalogy* 99 (6):1375-1386

38. Scholtz, G. 2002. Phylogeny and evolution. U: Holdich, D. M. (ur.) Biology of freshwater crayfish. Blackwell Science, Oxford, 30-52
39. Schrank, F. 1803. Fauna Boica Durchgedachte geschichte der in Baiern einheimischen und zahmen Thiere. Vol. 3. Steinschen buchandlung, Nürnberg.
40. Sinclair, E.A., James W.F., Buhay J., Crandall, K.A. (2004) Proposal to complete a phylogenetic taxonomy and systematic revision for freshwater crayfish (Astacoidea). *Freshwater Crayfish 14*: 21-29.
41. Sint, D., Dalla Via, J., Füreder, L. (2007): Phenotypical characterization of indigenous freshwater crayfish populations. *Journal of Zoology*, **273**: 210–219
42. Skurdal, J., Taugbøl, T. (2002): *Astacus*. U: Holdich, D.M.: Biology of freshwater crayfish. Blackwell Science, Oxford, 467-510
43. Streissl, F., Hödl, W. (2002): Growth, morphometrics, size at maturity, sexual dimorphism and condition index of *Austropotamobius torrentium* Schrank. *Hydrobiologia*, **477**: 201-208
44. Trontelj, P., Machino Y., Sket B. (2005): Phylogenetic and phylogeographic relationships in the crayfish genus *Austropotamobius* inferred from mitochondrial COI gene sequences. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, **34**: 212-226.
45. 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.
46. Verovnik, R., Sket, B., Trontelj, P. (2004): Phylogeography of subterranean and surface populations of water lice *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda). *Molecular Ecology*, **13**: 1519–1532.
47. Webster M., Sheets D. H. A practical introduction to landmark-based geometric morphometrics U knjizi: Quantitative methods in Paleobiology. Cambridge: The Paleontological Society Papers, vol 16. 2010, 163-188
48. 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.
49. Zelditch M. L., Swiderski D. L., Sheets H. D., Fink W. L. Geometric Morphometrics for Biologists: A primer. Cambridge: Academic Press; 2004.

8. Životopis

OSOBNI PODACI:

Ime i prezime: Ivana Vodanović

Datum i mjesto rođenja: 29. rujna 1983., Zagreb, Republika Hrvatska

Adresa prebivališta: Ozaljska 73, Zagreb

Broj mobilnog telefona: 098 / 793 127

E – mail adresa: ivana.vodanovic@gmail.com

OBRAZOVANJE:

2003. – 2019. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno – matematički fakultet, Biološki odsjek, smjer ekologija

1999. – 2003. VII gimnazija, Zagreb

1991. – 1999 . Osnovna škola Ante Starčevića