

**MALAKOLOGIJA I
ASTAKOLOGIJA U NASTAVI
BIOLOGIJE (208676)
2P+1V+0S 4 ECTS**



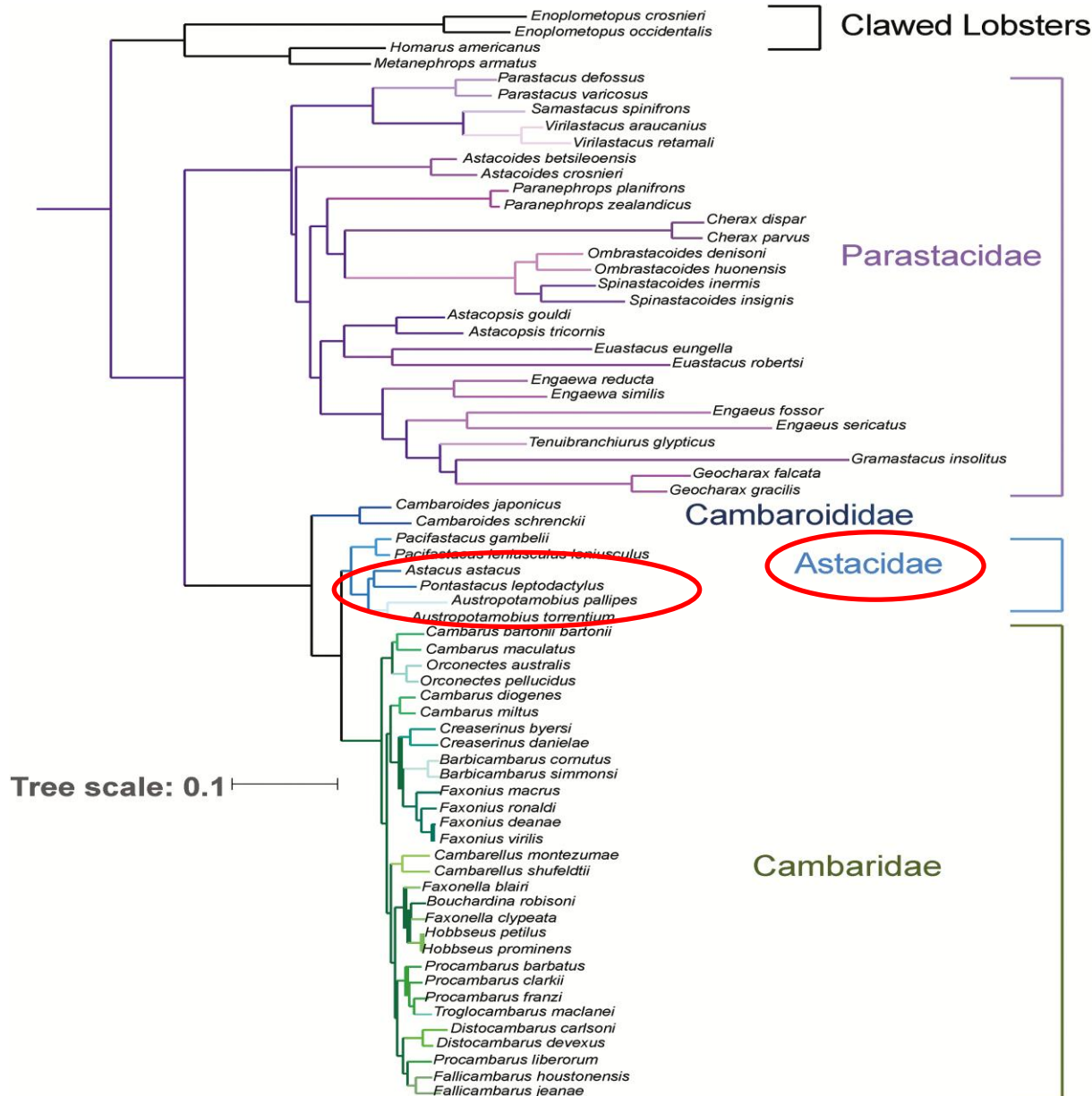


Figure 2. **Phylogenetic estimate of the freshwater crayfishes** based on a subset of data from Stern et al. (2017). Family clades of freshwater crayfish are shown in distinct colors with lobster outgroups shown in black.

Filogenija (grč. *phylon* i *phyle* – vrsta, rod, podrijetlo, srodstvo, *genesis*- nastajanje, *postanak*, *rođenje*) je znanstvena disciplina koje se bavi proučavanjem evolucijske (razvojne) povezanosti pojedinih skupina (taksa), koristeći se pri tome morfološkim, anatomskim, embriološkim, fiziološkim, **genetskim, molekularnim, fosilnim i geografskim homologijama**. Krajnji cilj filogenetskih istraživanja jest **rekonstrukcija rodoslovnog stabla nekog organizma (filogram)**.

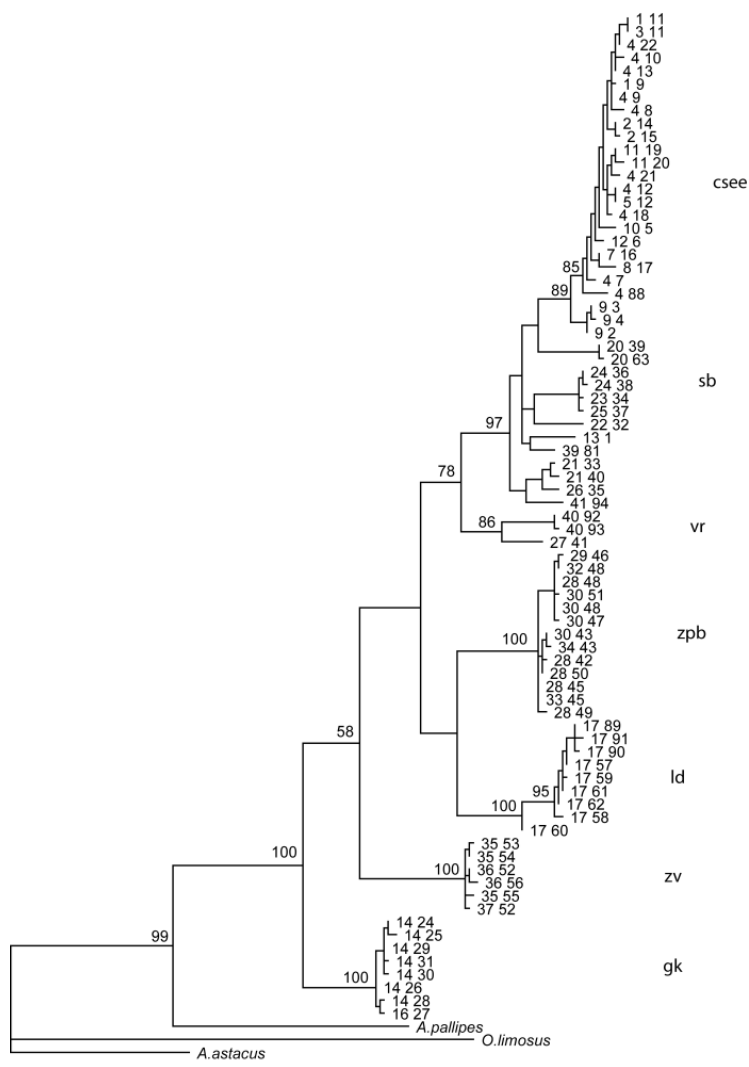
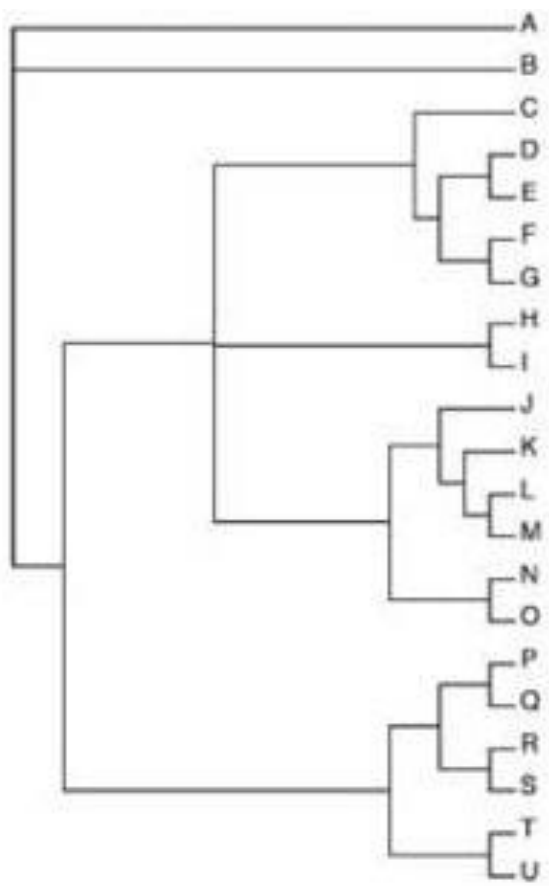
Filogeografija je znanstvena disciplina koja uz pomoć filogenetskih metoda nastoji rekonstruirati povijesne promjene rasprostranjenosti vrsta na Zemlji.

Populacijska genetika je grana genetike koja proučava nasljedne pojave i procese na razini reproduksijski povezanih grupa organizama – populacija. Istražuje moguće odnose u genetičkoj strukturi populacije, faktorima održavanja i narušavanja njene ravnoteže, dinamiku i prirodu tih promjena. Ukratko, to je disciplina koja proučava gensku raznolikost jedinki u populaciji.

Modeli distribucije vrsta (eng. SDM), ili modeli okolišnih (ili ekoloških) niša (eng. ENM), ili modeli staništa, ili predikcijski modeli distribucije u okolišu - koriste računalne algoritme kako bi predvidjeli distribuciju vrste u geografskom prostoru koristeći okolišne podatke (i distribuciju vrste)

Kladogram – dijagram evolucijskog odnosa potomci–predak (nema info. o evolucijskoj udaljenosti)

Filogram – daje informaciju o evolucijskim udaljenostima (na to ukazuje duljina grana)



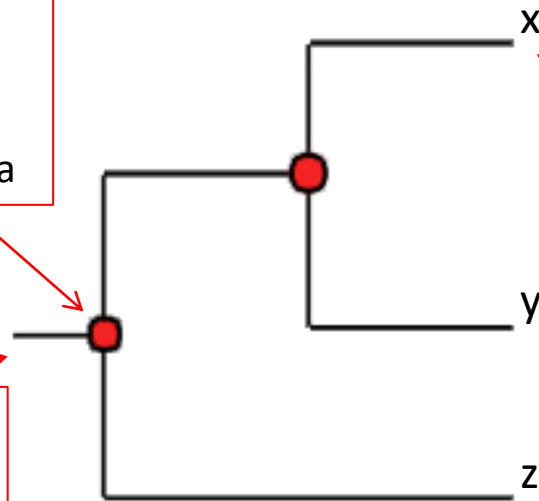
Čvor (node) –
mjesto
neposrednog
zajedničkog pretka

Korijen -
predstavlja
ancestralnu
liniju

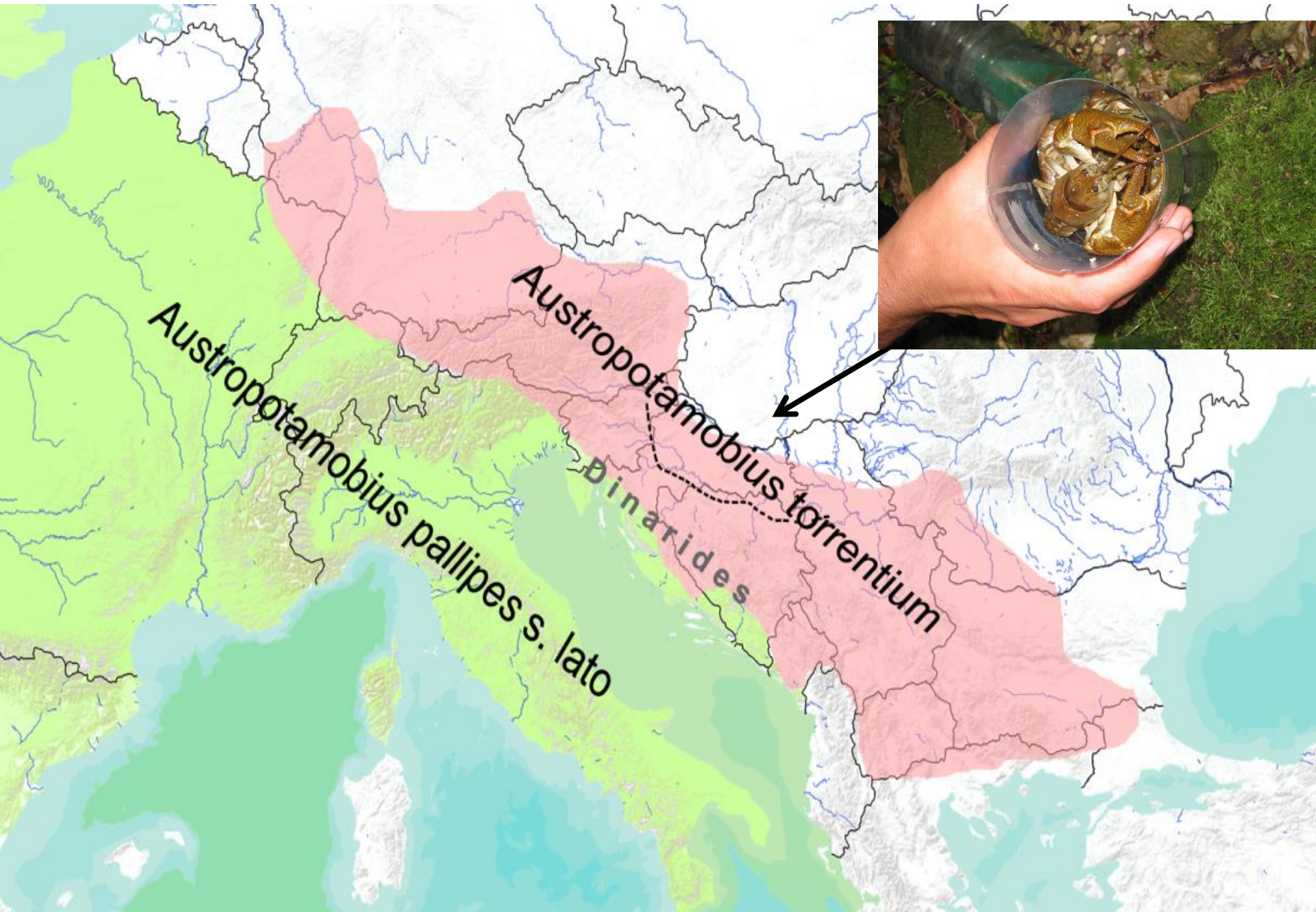
Grana - klada

Takson – krajnji potomci –
sestrinski taksoni (x i y) dijele
neposrednog zajedničkog pretka

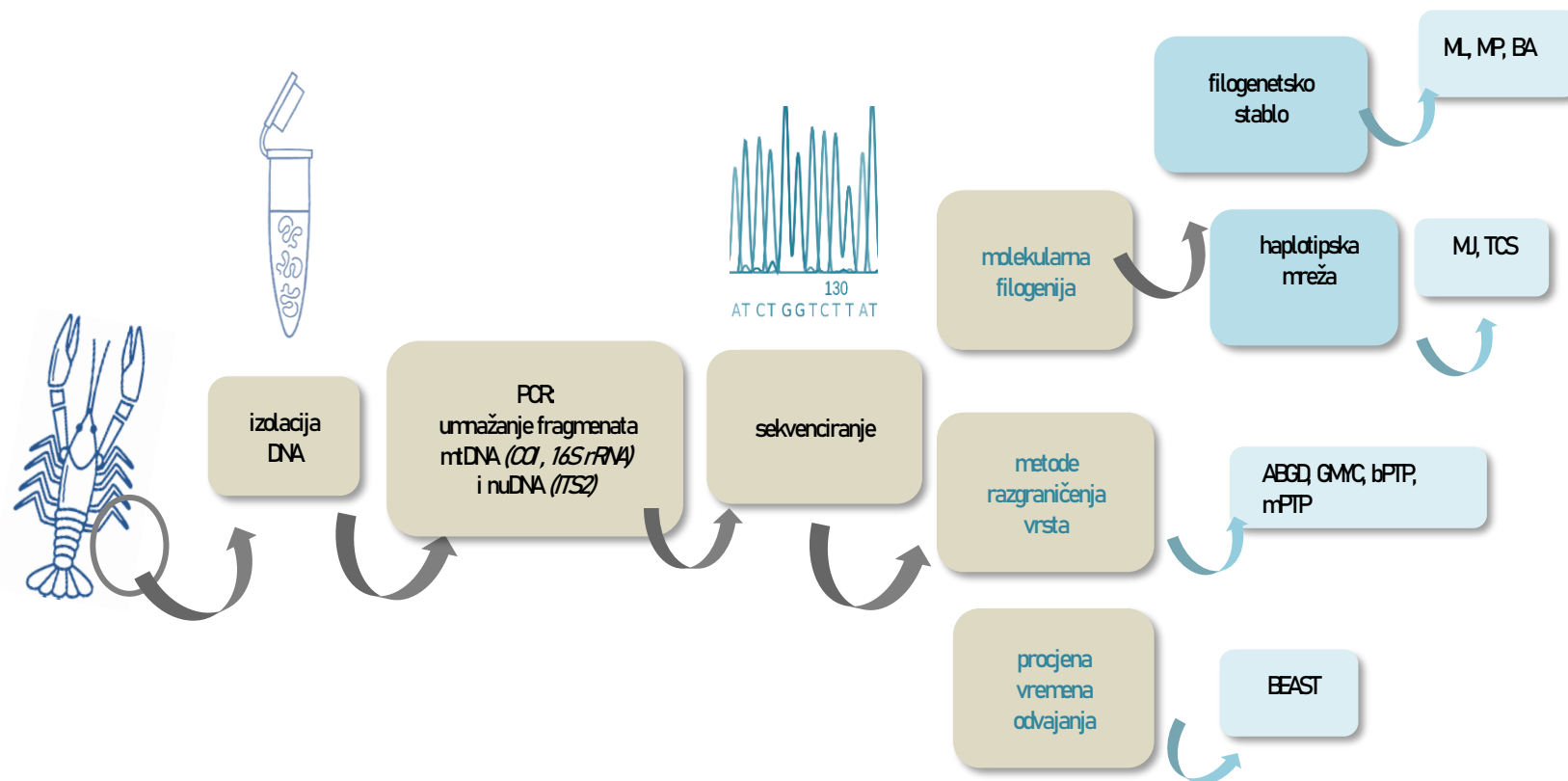
Haplotipovi (molekularna
filogenija) - jedinstvena
kombinacija genetičkih biljega
prisutna u uzorku



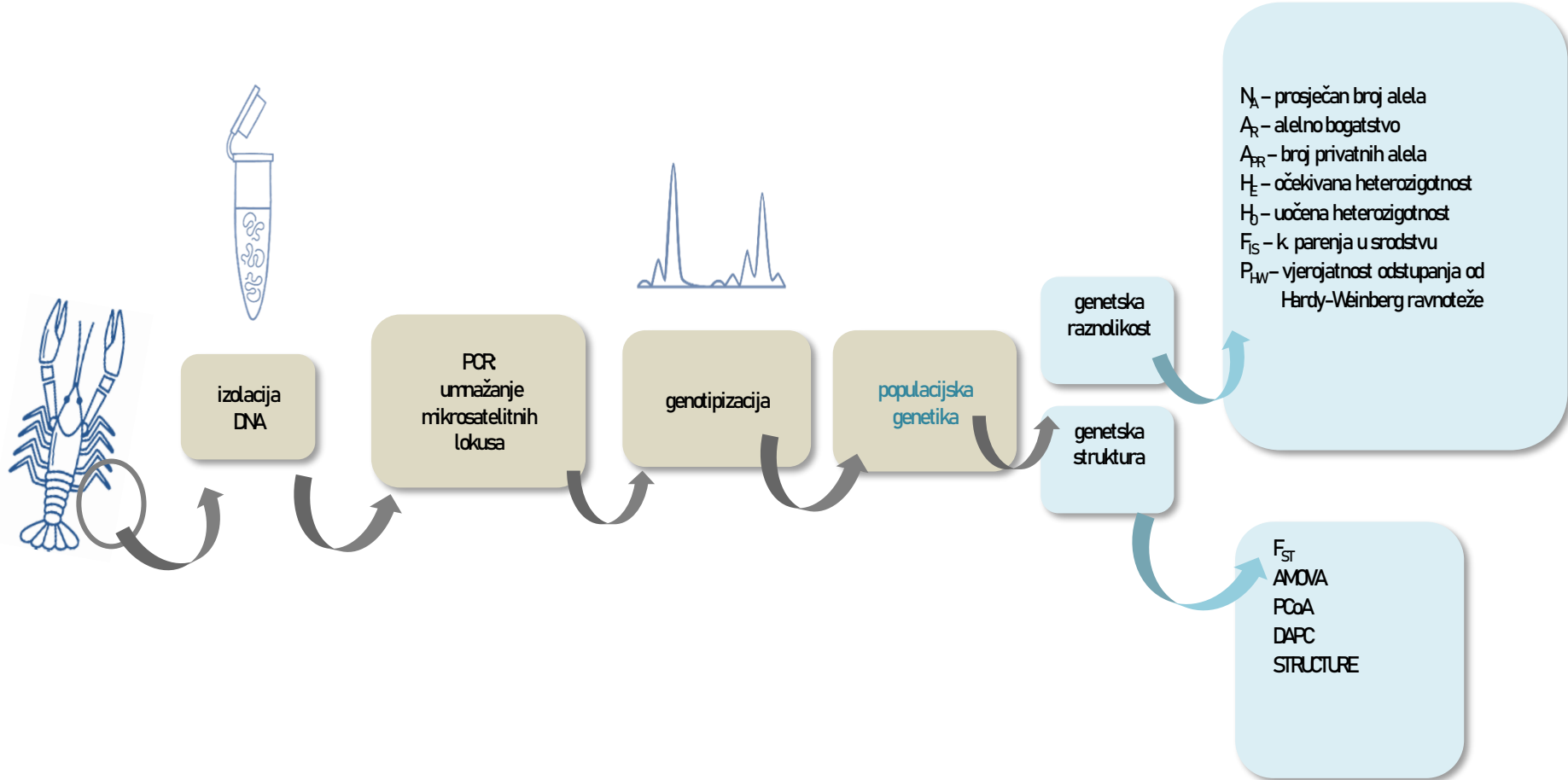
Filogenija, filogeografija i populacijska genetika & budućnost



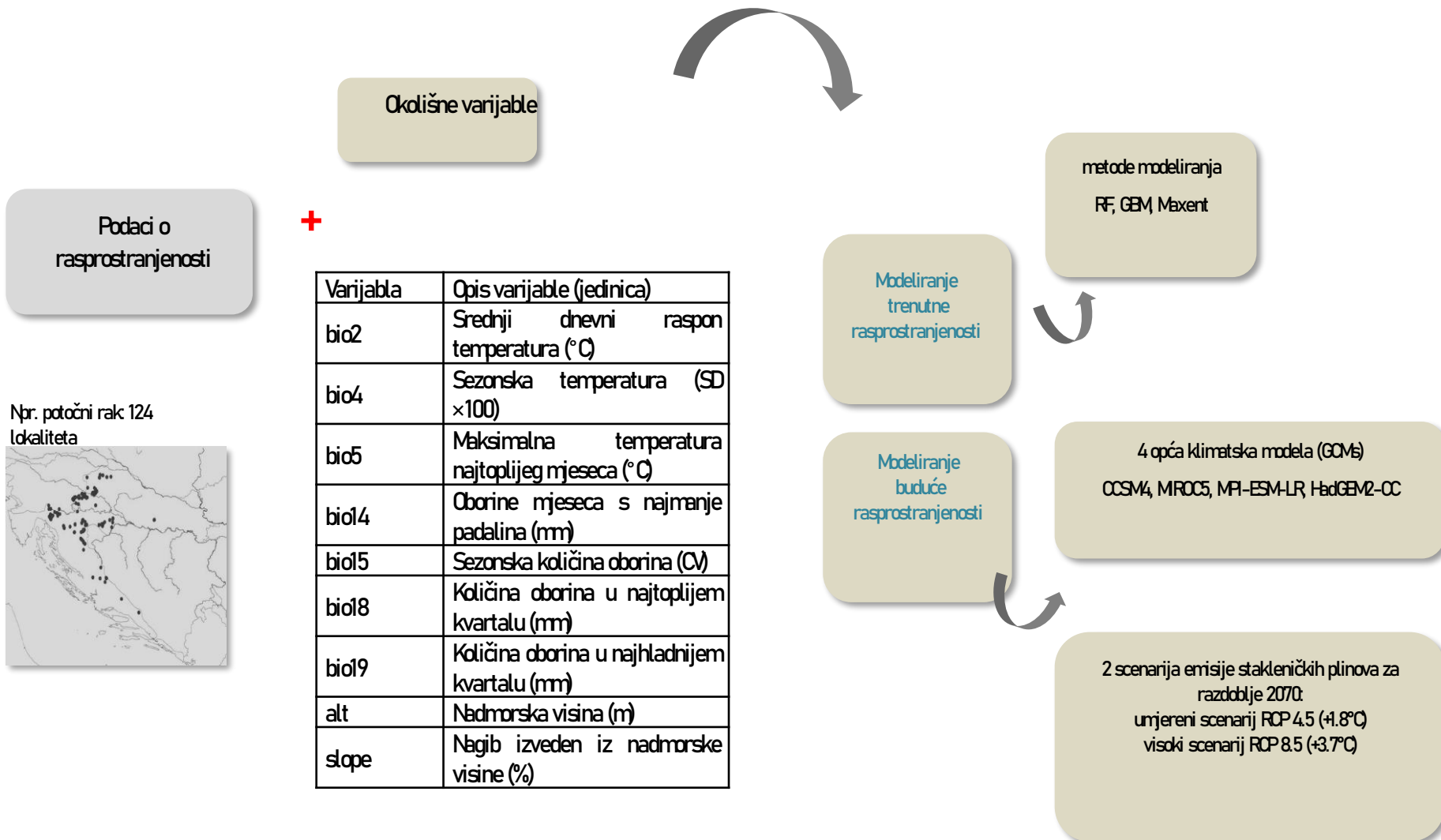
Molekularna filogenija



Populacijska genetika



Modeli povodnosti staništa

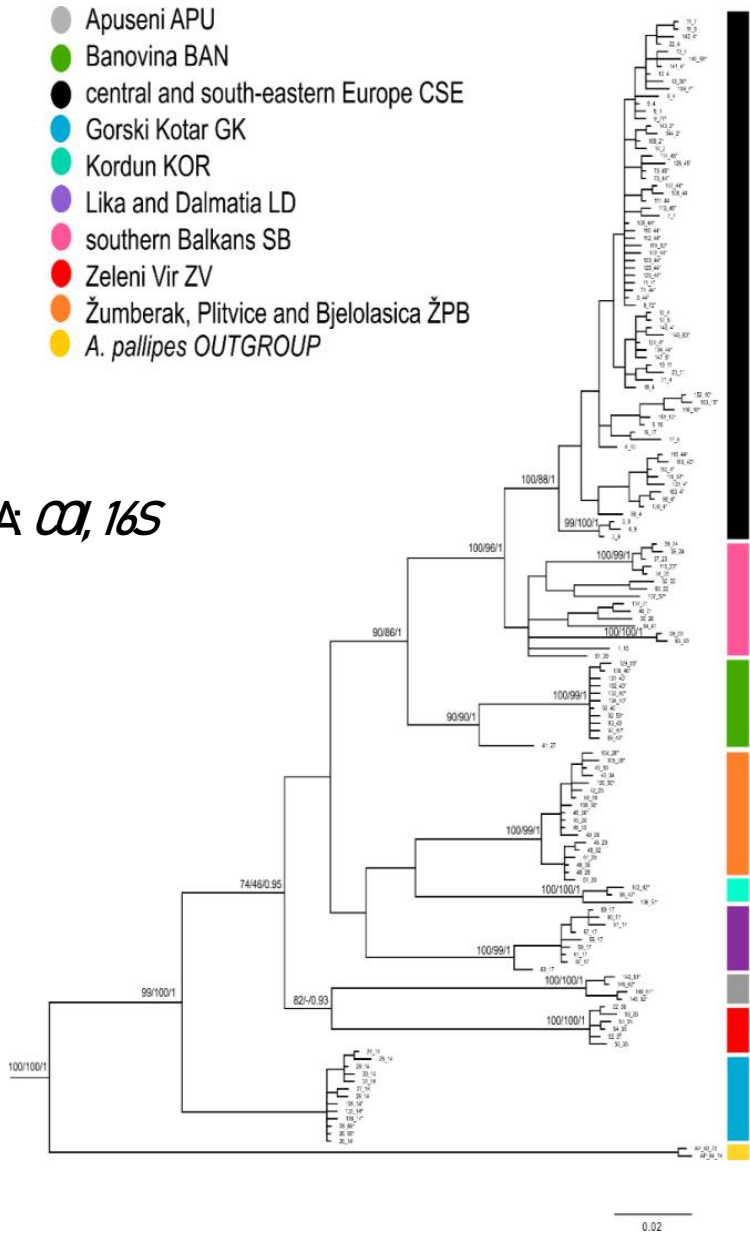


Rekonstrukcija filogenetskih odnosa

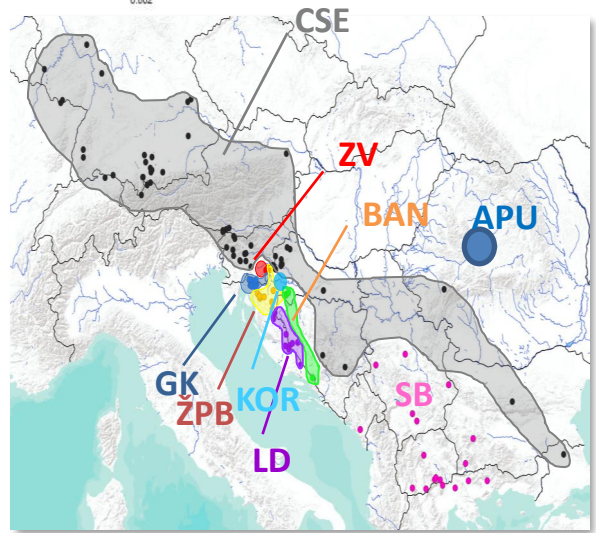
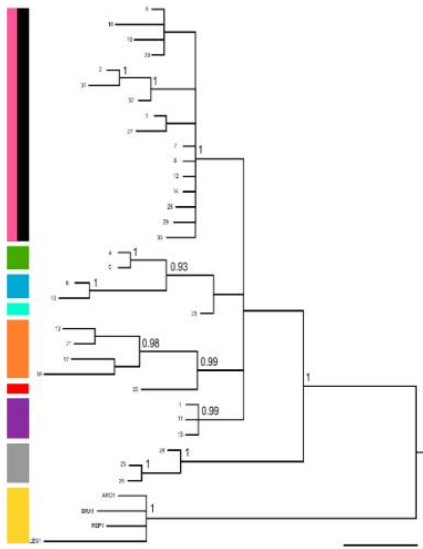
(I) filogenetsko stablo: BA, ML, MP

- Apuseni APU
- Banovina BAN
- central and south-eastern Europe CSE
- Gorski Kotar GK
- Kordun KOR
- Lika and Dalmatia LD
- southern Balkans SB
- Zeleni Vir ZV
- Žumberak, Plitvice and Bjelolasica ŽPB
- *A. pallipes* OUTGROUP

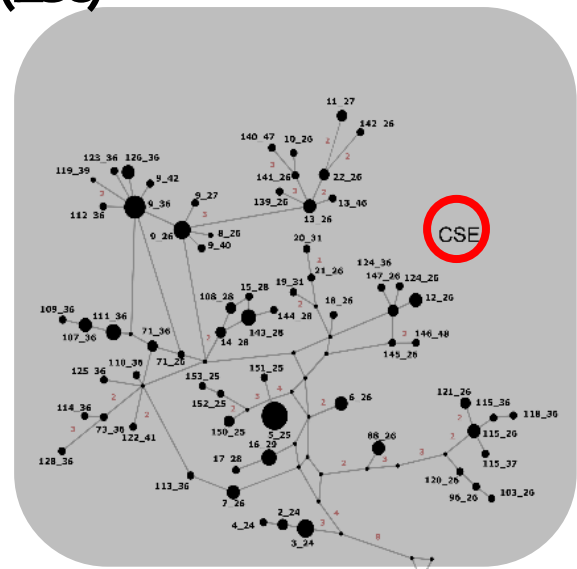
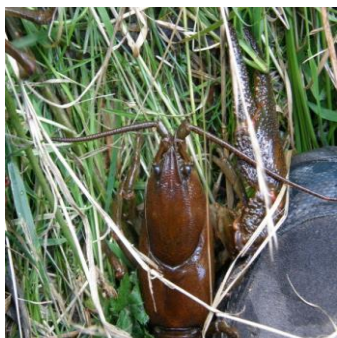
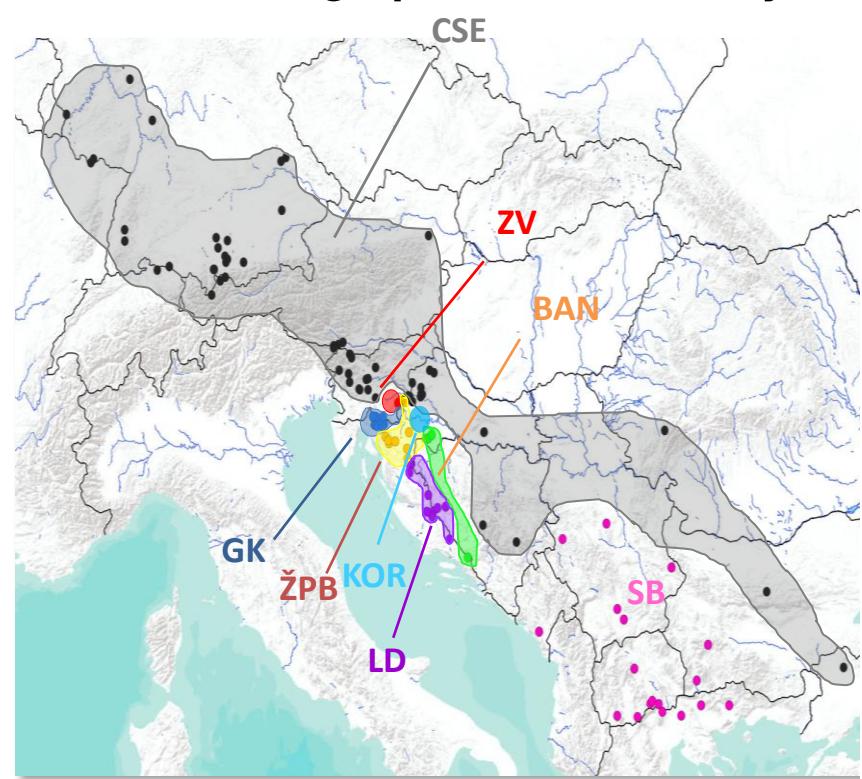
mtDNA: *cyt b*, *16S*



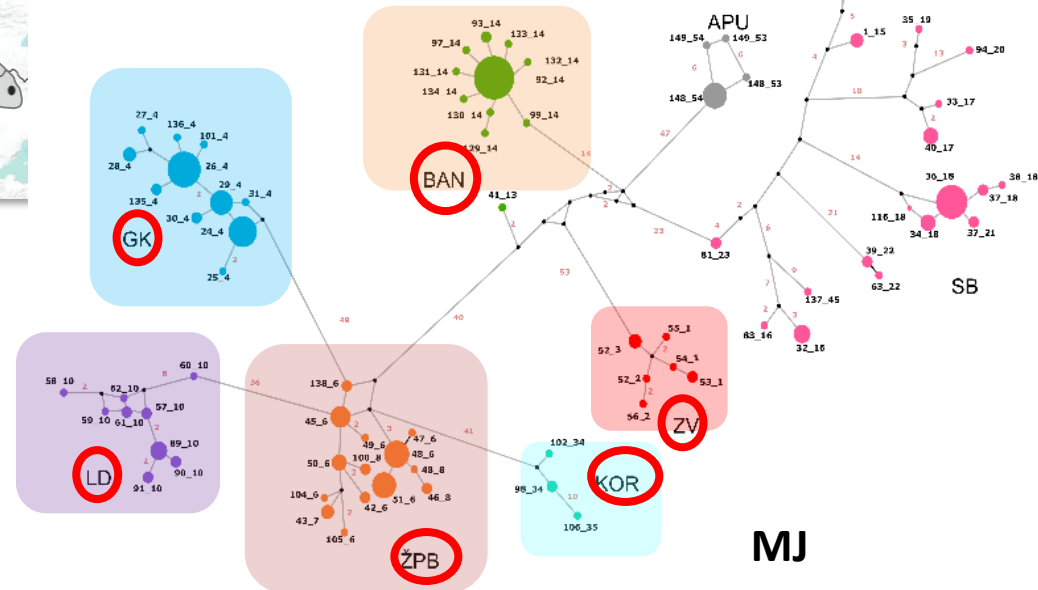
nuDNA: *ITS2*



Hrvatska: 7 filogrupa → 7 evolucijski značajnih jedinica (ESU)

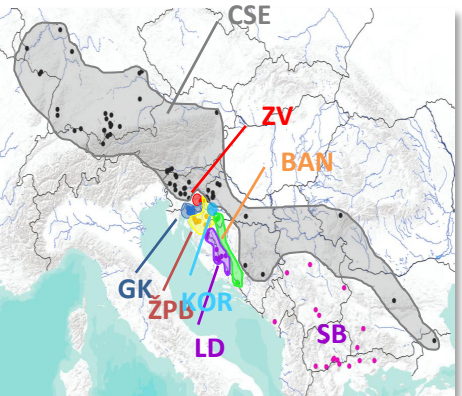
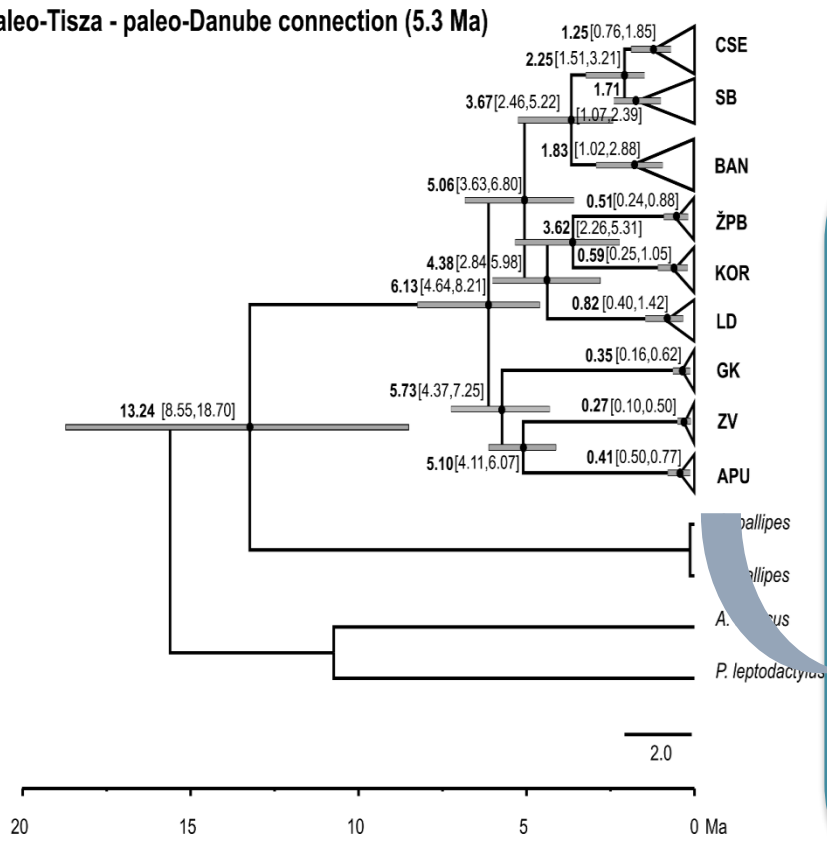


- Najveća raznolikost u Alpinskoj biogeo. regiji (dinaridski krš)

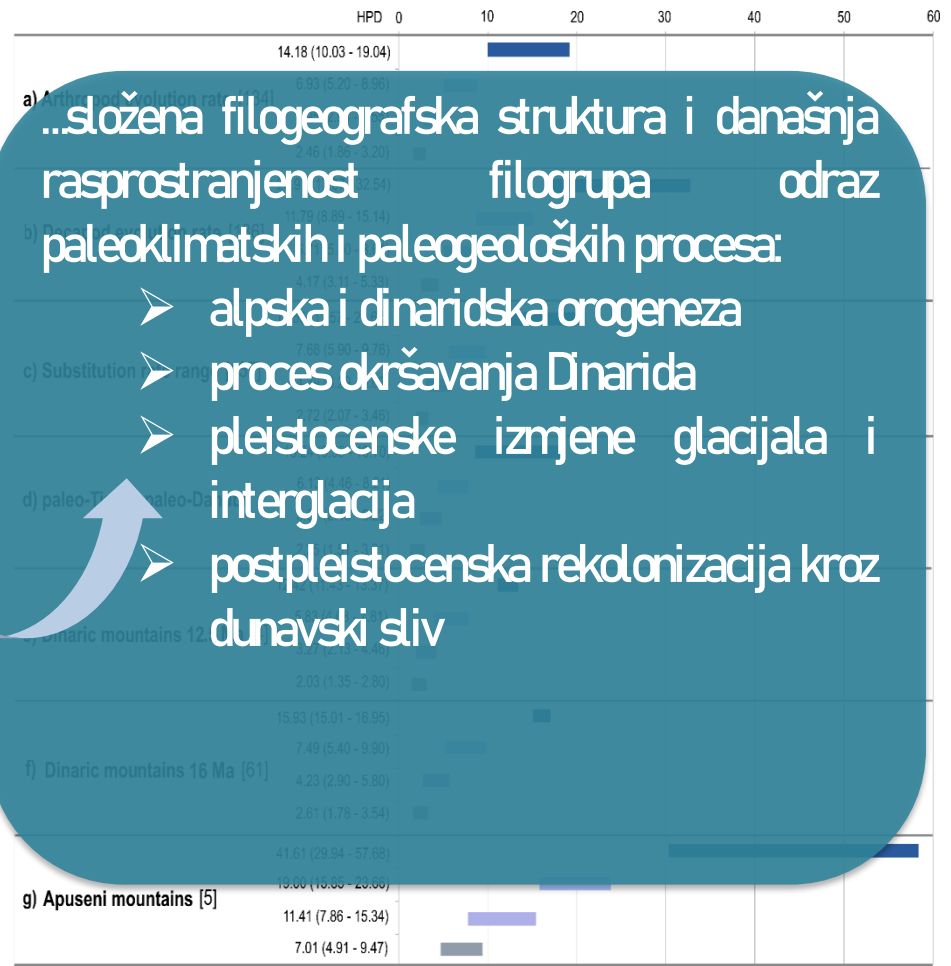


Procjena vremena odvajanja filogrupa

paleo-Tisza - paleo-Danube connection (5.3 Ma)

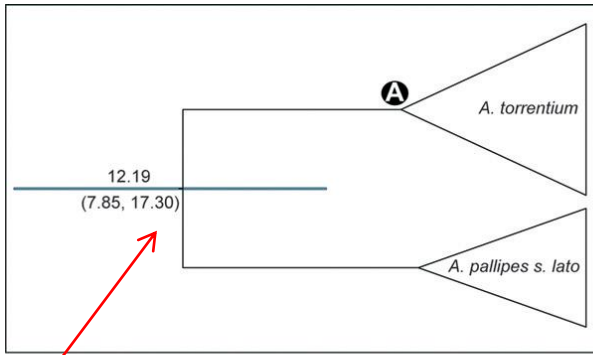


HPD for *A. torrentium* - *A. pallipes* divergence
HPD for NCD+APU - BAN+SB+CSE divergence
HPD for BAN - SB+CSE divergence
HPD for SB - CSE divergence



...složena filogeografska struktura i današnja rasprostranjenost filogrupa odraz paleoklimatskih i paleogeoloških procesa:

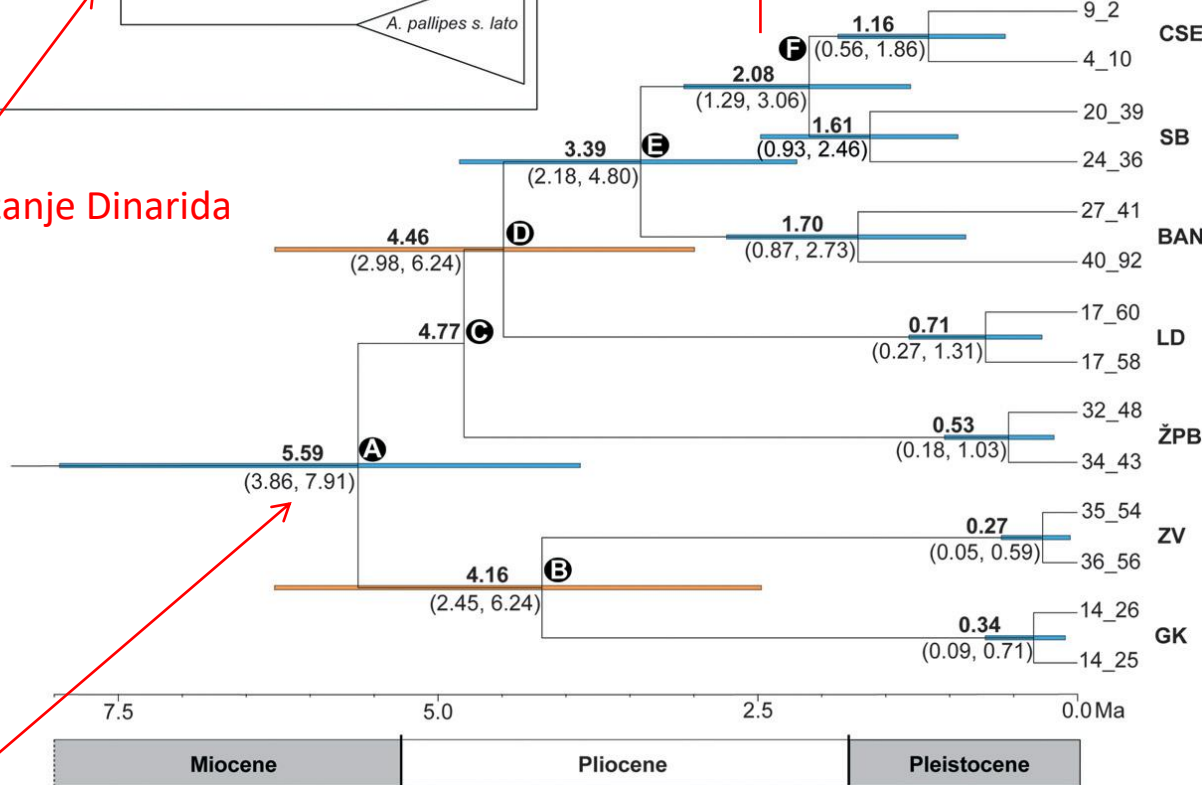
- alpska i dinaridska orogeneza
- proces okršavanja Dinarida
- pleistocenske izmjene glacijala i interglacija
- postpleistocenska rekolonizacija kroz dunavski sliv



Formiranje Dunava – pre-
pleistocensko širanje na jug
(SB) i post-glacijalno širenje na
sjever (CSE)



Uzdizanje Dinarida



3-5 Ma intenzivna
karstifikacija –
fragemntirana
paleohidrografija
(slatkovodni otoci u
kršu) – alopatrijska
specijacija

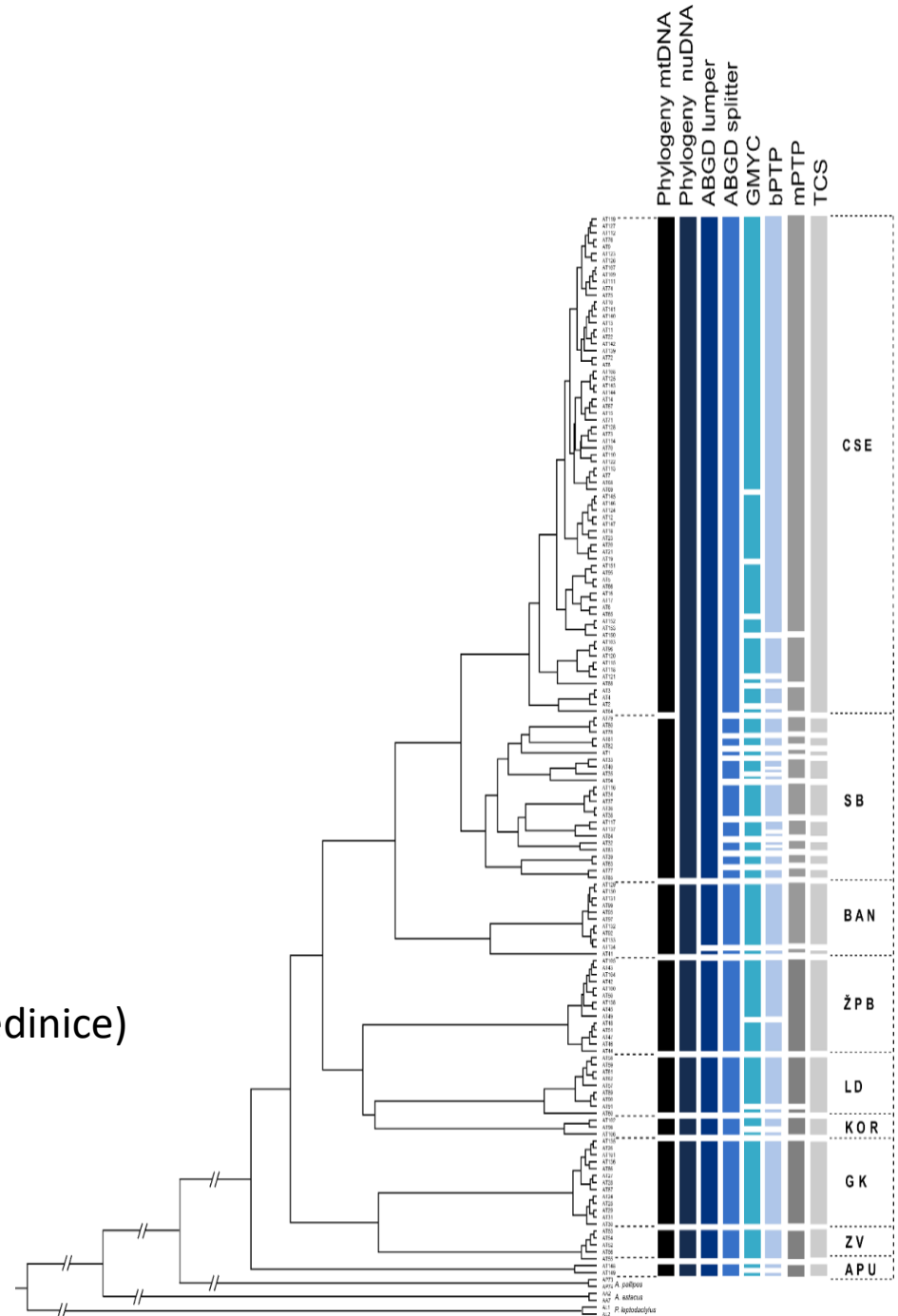
NCD

Panonsko jezero (bočato) (NCD izoliran s juga Dinaridima, sa sjevera brakičnom vodom)

Metode razgraničavanja potencijalnih vrsta

- rješavanje taksonomskog statusa filogrupa
- molekularne: ABGD, GMYC, bPTP, mPTP, TCS
 - nekongruetni rezultati
 - nerealno velik broj potencijalnih vrsta
- morfološke: GM, TM, meristika
 - Velika morfološka varijabilnost
 - ne postoji determinacijska značajka koja bi pomogla razlikovanju filogrupa i omogućila opis novih vrsta

VRSTE U NASTANKU – ESU (evol.signif.jedinice)



Često se **uspoređuje zabilježeni stupanj heterozigotnosti (H_o) s očekivanim (H_e)** (prema Hardy-Weinbergovoj ravnoteži - 1 gen, 2 alela A i a (učestalosti $p + q = 1$); Genotipovi: AA Aa aa; $p^2 + 2pq + q^2 = 1$)

- ako je **H_o manji** od **H_e** – možemo pripisati srođivanju (inbreeding)/gubitak raznolikosti/veći udio homozigota – **pozitivne vrijednosti F_{is}**
- ako je **H_o veća** od **H_e** – možemo pripisati miješanju dvije prethodno izol. pop./više heterozigota – **negativne vrijednosti F_{is}**

Population code	N	No. of polymorphic						F_{is}
		loci	N_a	N_{ar}	N_{pr}	H_e	H_o	
KOZ	30	6	2.44	1.89	0.44	0.15	0.16	-0.04
TOL	29	2	1.22	1.09	0.11	0.01	0.02	-0.03
GLI	30	8	2.56	2.12	0	0.34	0.33	0.02
REK	29	8	2.22	2.09	0.11	0.36	0.34	0.08
RJE	30	8	3.00	2.44	0.22	0.44	0.42	0.06
SKO	30	8	4.00	3.01	0.33	0.50	0.48	0.06
ARG	30	7	2.00	1.91	0	0.29	0.24	0.17
BRA	39	8	4.89	3.44	0.56	0.53	0.51	0.05
PIV	26	5	1.67	1.60	0	0.18	0.21	-0.14
RAS	25	9	3.89	3.05	0.33	0.46	0.45	0.05

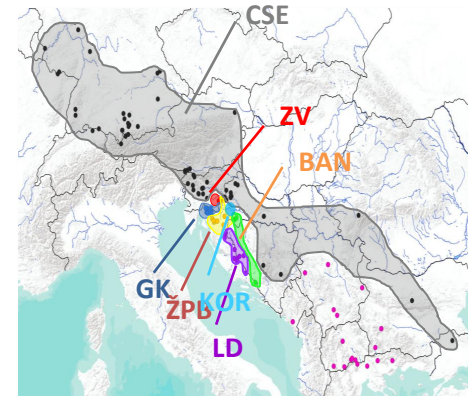
Reported values for intrapopulation measures of genetic variability. N – number of analysed crayfish, N_a – mean number of alleles per locus, N_{ar} – allelic richness, N_{pr} – mean number of private alleles per locus, H_e – expected heterozygosity, H_o – observed heterozygosity, F_{is} – F_{is} estimate across all loci (inbreeding coefficient). Minimum and maximum are shown in red. NA – not analysed

F_{is} – koeficijent križanja u bliskom srodstvu - pozitivan ako u populaciji postoji manje heterozigota, a negativan ako se radi o velikom udjelu heterozigota

Genetska razndikost populacija (mikrosateliti)

Pop.	Abb.	ESU Abb.	N	P	N _A	A _R	A _{PR}	uH _E	H _O	F _{IS}	P _{HWE}
Bručina	BRU	BAN	31	1.00	4.75	3.62	1 (0.40)	0.551	0.473	0.144	ns
Maja	MAJ	BAN	30	1.00	4.13	3.19	1 (1.12)	0.456	0.313	0.317*	*
BAN average				1.00	4.44	3.41	1 (0.76)	0.504	0.393	0.231	
Bliznec	BLI	CSE	29	1.00	4.13	3.48	5 (2.72)	0.524	0.431	0.180*	ns
Jarak	JAS	CSE	21	1.00	3.88	2.90	3 (1.12)	0.362	0.351	0.032	ns
Okićnica	OKI	CSE	32	1.00	5.00	3.84	5 (2.88)	0.543	0.440	0.193*	*
Dolje	DOLJ	CSE	31	1.00	4.50	3.86	2 (2.08)	0.595	0.465	0.221*	*
CSE average				1.00	4.38	3.52	4 (2.24)	0.506	0.422	0.157	
Delnički	DEL	GK	29	0.75	2.75	2.50	0 (0.64)	0.393	0.349	0.113	*
V. Vode	VEL	GK	31	0.88	3.13	2.49	0 (0.24)	0.344	0.363	-0.055	ns
GK average				0.81	2.94	2.49	0 (0.44)	0.369	0.356	0.029	
Žrnica	ŽRN	KOR	11	0.88	3.88	3.79	3 (2.80)	0.585	0.455	0.232*	ns
Krasulja	KRA	LD	30	0.88	3.13	2.72	0 (0.64)	0.454	0.434	0.045	ns
Orašnica	ORA	LD	33	0.88	3.25	2.53	0 (0.80)	0.307	0.227	0.262*	*
Prijeboj	PRI	LD	24	1.00	3.50	3.11	0 (0.08)	0.532	0.485	0.090	*
LD average				0.92	3.29	2.79	0 (0.51)	0.431	0.382	0.132	
				10							*
Zeleni Vir	ZV	ZV average	29	1.00	4.50	3.89	(8.00)	0.584	0.402	0.316*	*
Jarak	JAR	ŽPB	10	0.75	2.38	2.32	0 (0.08)	0.307	0.325	-0.061	ns
Sartuk	SAR	ŽPB	27	0.88	2.88	2.60	1 (1.52)	0.457	0.315	0.315*	*
Sopotski	SOP	ŽPB	24	0.75	2.63	2.18	2 (0.88)	0.262	0.058	0.782*	*
ŽPB average				0.79	2.63	2.37	1 (0.83)	0.342	0.233	0.345	

N_A – prosječan broj alela; A_R – alelno bogatstvo; A_{PR} – broj privatnih alela; H_E – očekivana heterozigotnost; H_O – uočena heterozigotnost; F_{IS} – k parenja u srodstvu; P_{HWE} – vjerojatnost odstupanja od Hardy-Weinberg ravnoteže



➤ Unjerena genetska razndikost (na temelju svih parametara)

↑ visoka genetska razndikost

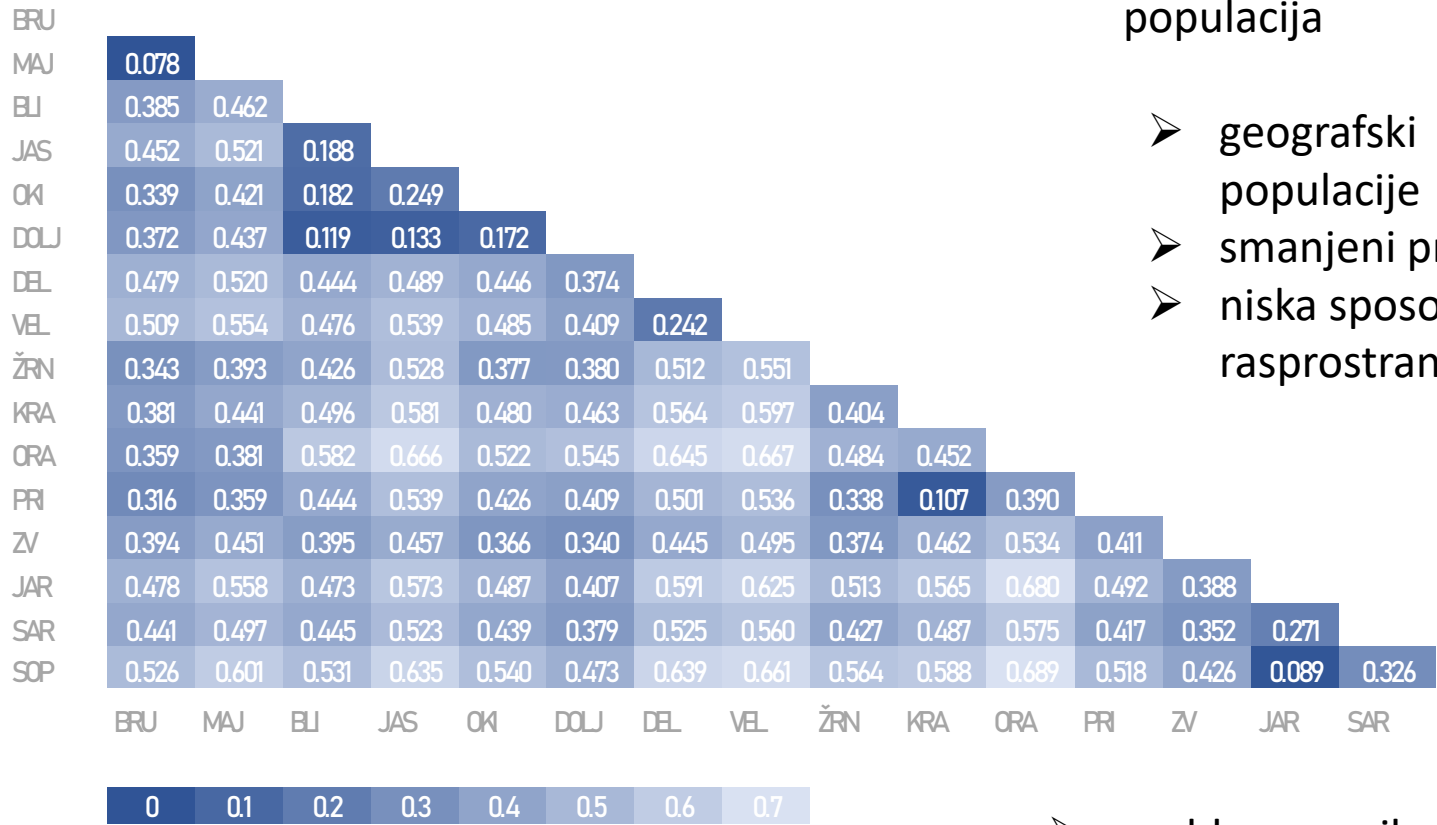
↑ ESU

↓ niska genetska razndikost

↓ ESU

➤ visoka vrijednost F_{IS} ukazuje na višak homozigota u većini populacija

Genetska diferencijacija populacija



- visoka razina diferencijacije između populacija
- geografski i genetski izolirane populacije
- smanjeni protok gena
- niska sposobnost rasprostranjivanja

average $F_{ST} = 0.463$

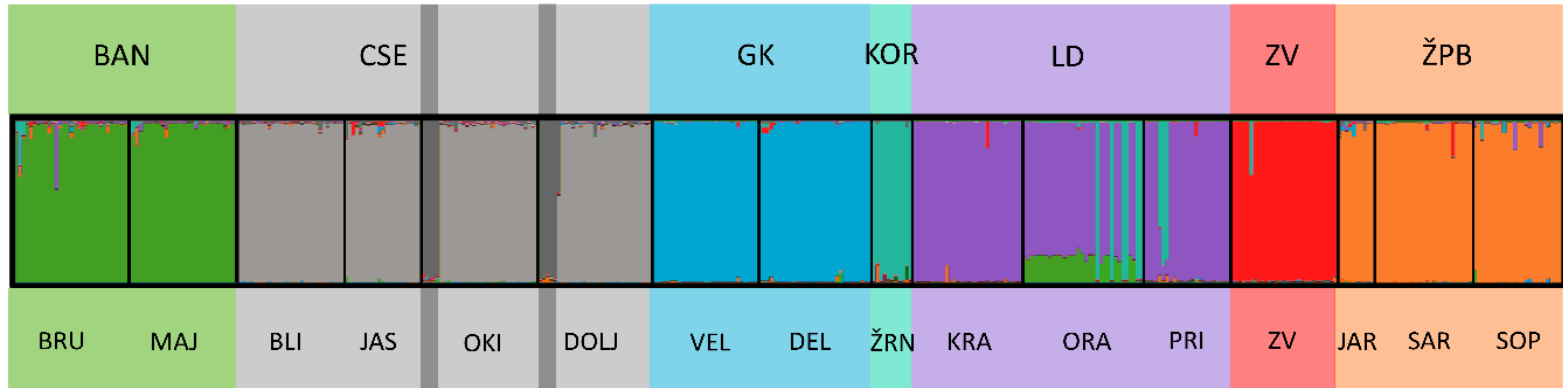
- Vrijednosti fiksacijskih indeksa (F_{ST}) – što su manje- povezanost kroz parenje; što su veće- manja povezanost kroz parenje

- problem u prilagođavanju klimatskim promjenama
 - limitirana mogućnost migriranja i pomicanja rasprostranjenosti prema klimatski povoljnijim staništima

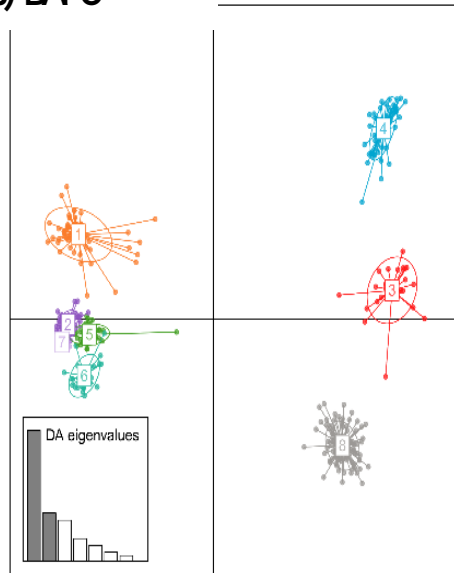
Genetska struktura populacija

(a) STRUCTURE

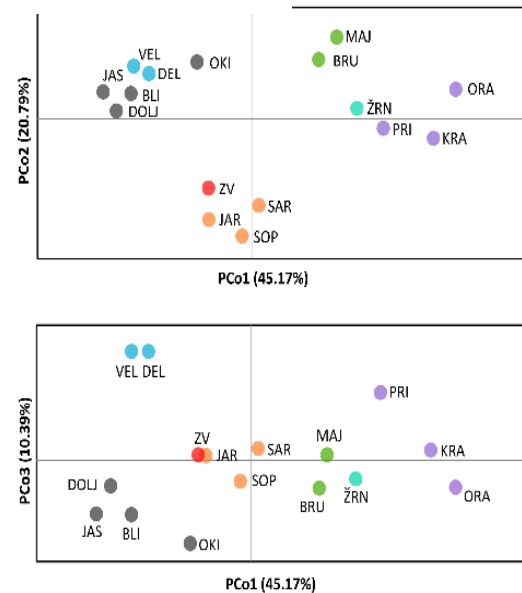
(a)



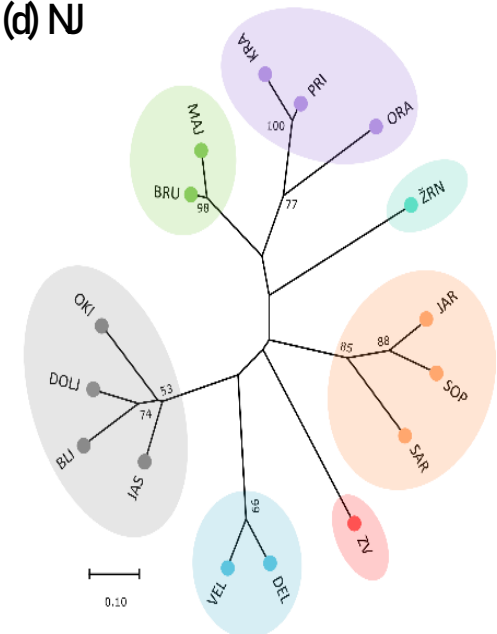
(b) DAPC



(c) PCoA

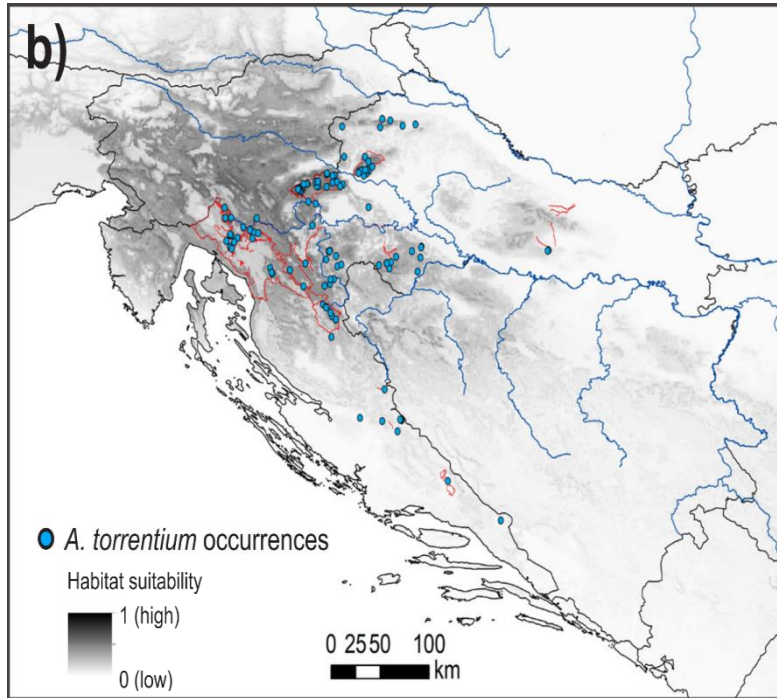


(d) NJ

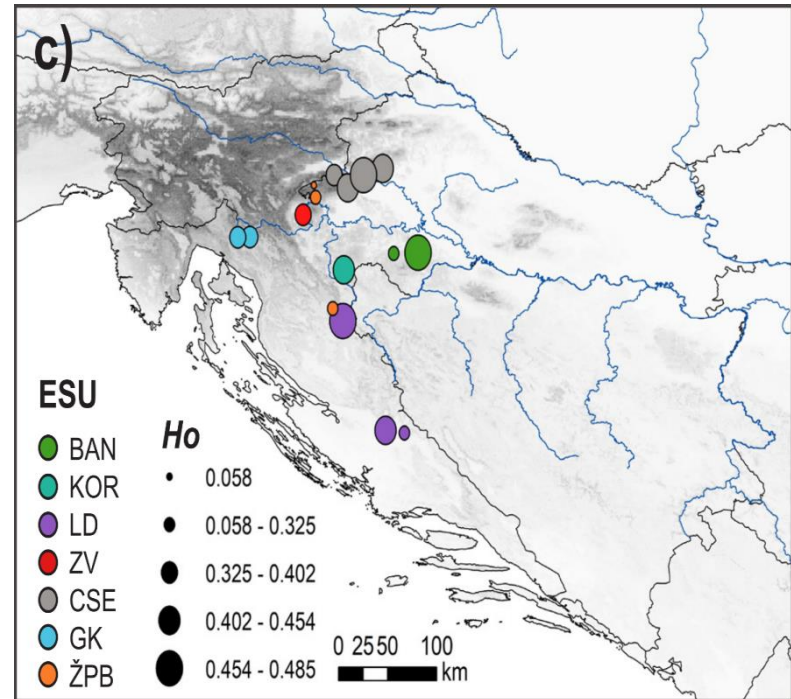


Potencijalna buduća (2070) rasprostranjenost (2 klim.scenarija)

2070 (+1.8°C)

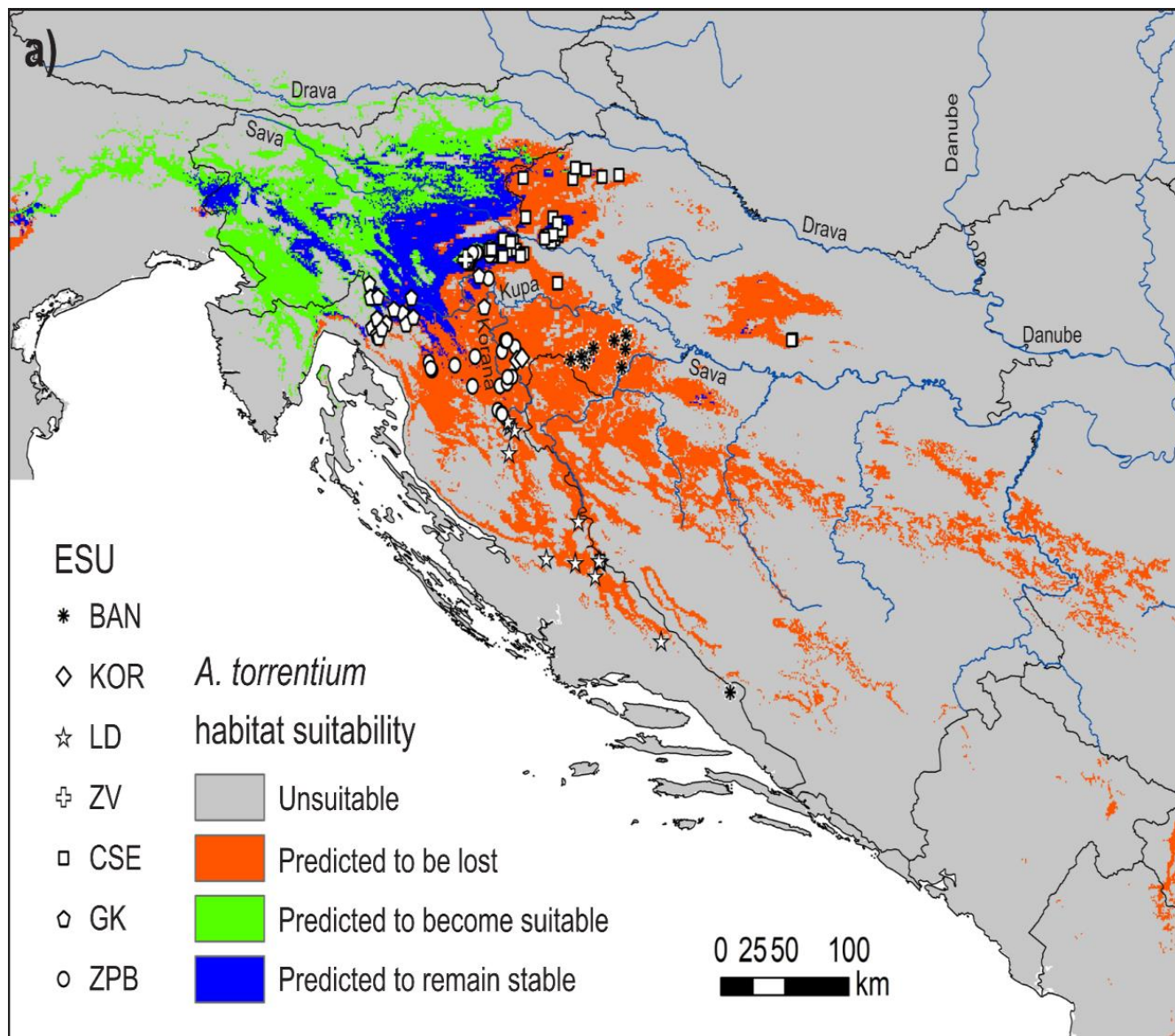


2070 (+3.7°C)



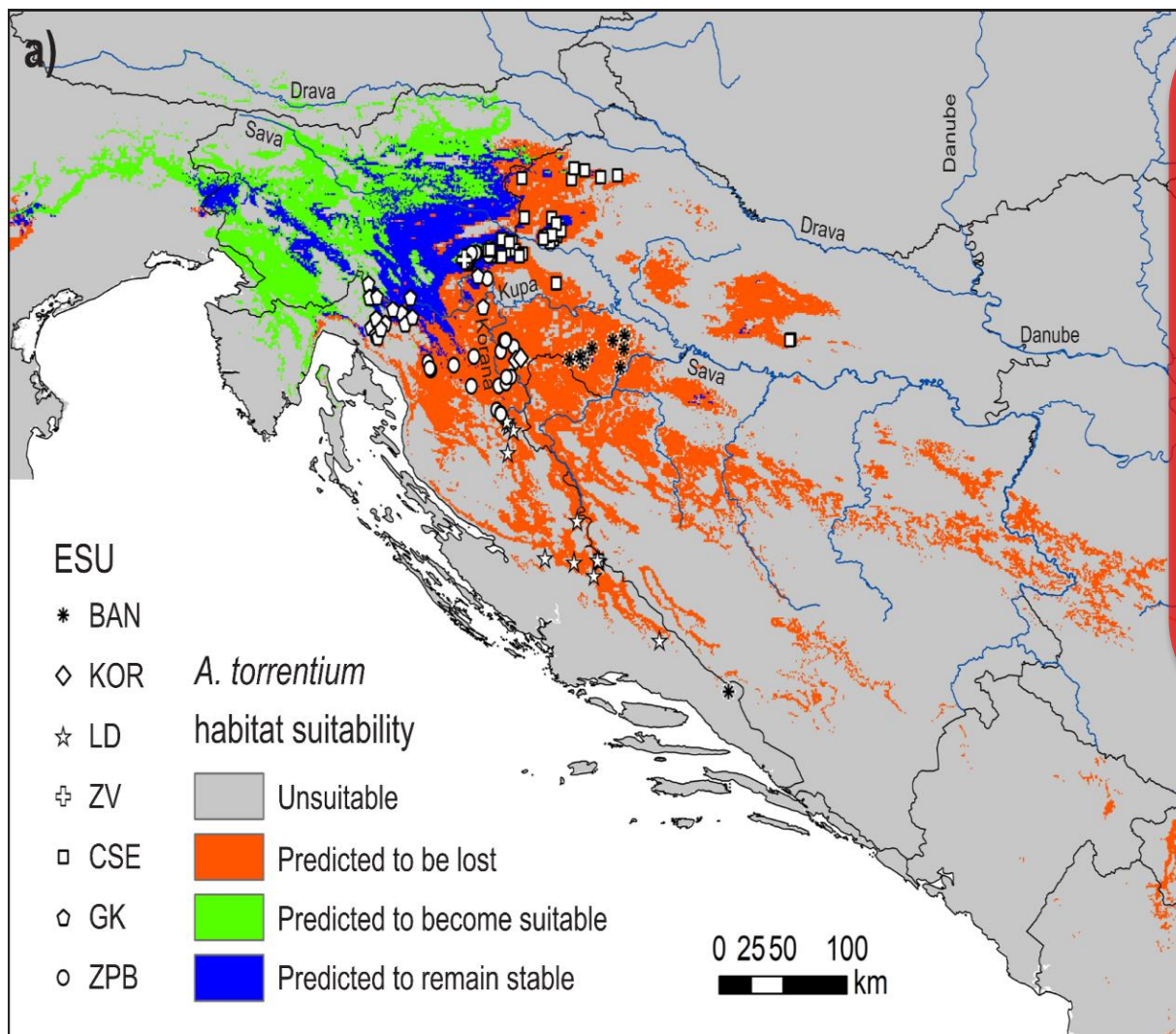
- značajno smanjenje povoljnih staništa zbog klimatskih promjena
- pomicanje potencijalne buduće rasprostranjenosti prema SZ

Preklapanje podataka o potencijalnoj trenutnoj i budućoj rasprostranjenosti



...gubitak 80%
trenutno povoljnih
staništa za potočnog
raka do 2070
(+3.7°C)

Preklapanje potencijalne buduće rasprostranjenosti i genetske raznolikosti

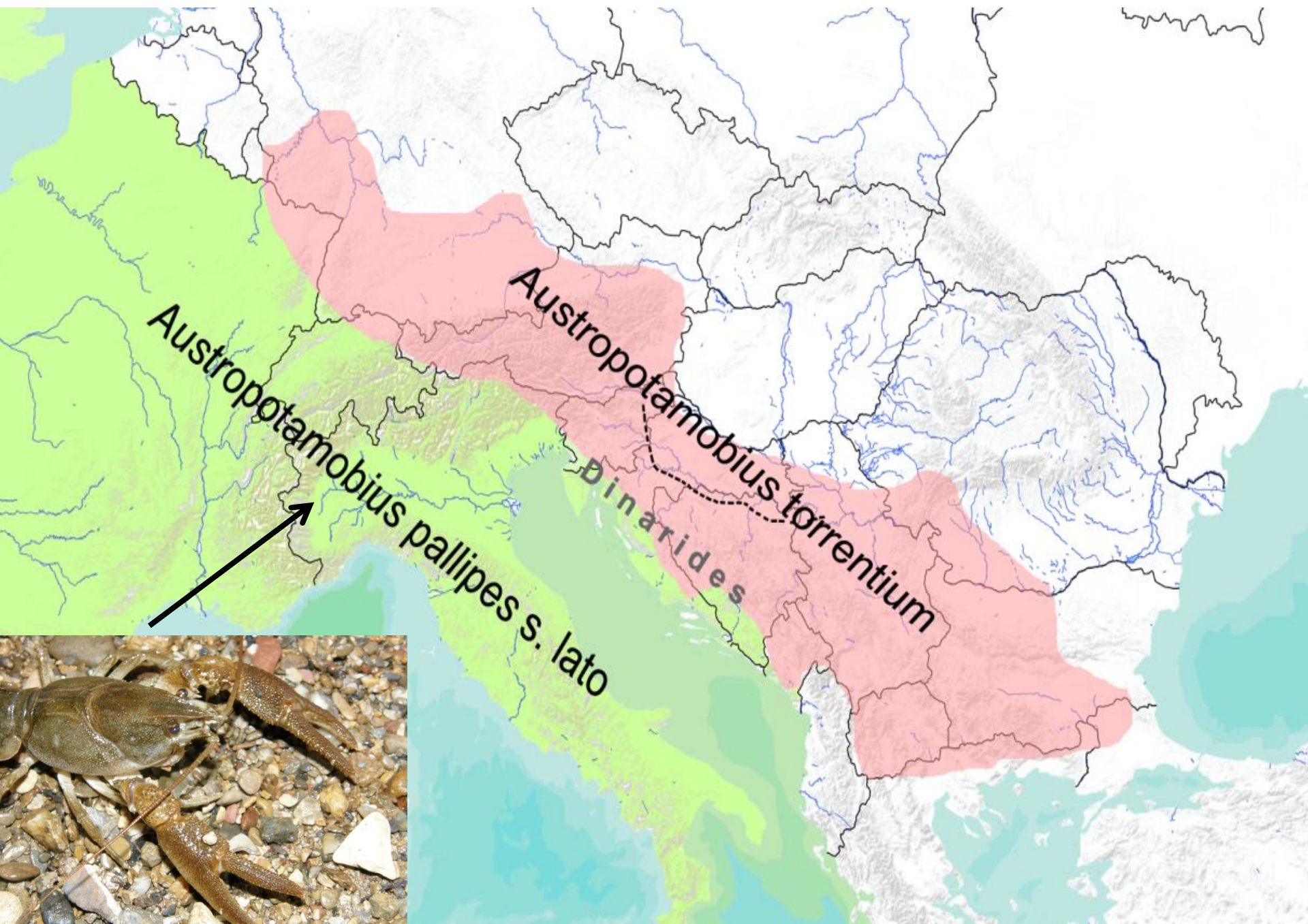


...**44%** populacija s visokom ili jedinstvenom genetskom raznolikosti smještene u područjima koja su predviđena kao nepovoljna u budućnosti, stoga potencijalno izgubljena

... uključujući
3 evolucijski značajne jedinice (LD, BAN, KOR)

Potencijalni klimatski refugiji

- potencijalni gubitak velikog dijela genetske raznolikosti potočnog raka zbog klimatskih promjena
 - populacije s najvećom i jedinstvenom genetskom raznolikosti smještene u područjima koja su predviđena kao nepovoljna u budućnosti
- predloženi klimatski refugiji za potočnog raka uz sjeverozapadnu granicu i prema staništima na višim nadmorskim visinama
 - nedostupni zbog prirodnih granica širenja
 - programi repopulacije i reintrodukcije
 - prekogranična suradnja u konzervaciji



***Austropotamobius pallipes* s. lato**



- Heterogen (genetski i morfološki)
- Prethodna istraživanja (Grandjean & Souty-Grosset, 2000; Fratini et al., 2005; Cataudella et al., 2010; Pedraza-Lara et al., 2010) ***Austropotamobius pallipes* s. lato** – dvij vrste – ***A. pallipes*** and ***A. italicus***
- Unutar *A. italicus* – 4 podvrste (Fratini et al., 2005) - ***A. i. italicus***
 - ***A. i. carinthiacus***
 - ***A. i. carsicus***
 - ***A. i. meridionalis***
- Cilj: smjestiti populacije iz Hrvatske u filogenetsko stablo *A. pallipes* s. lato

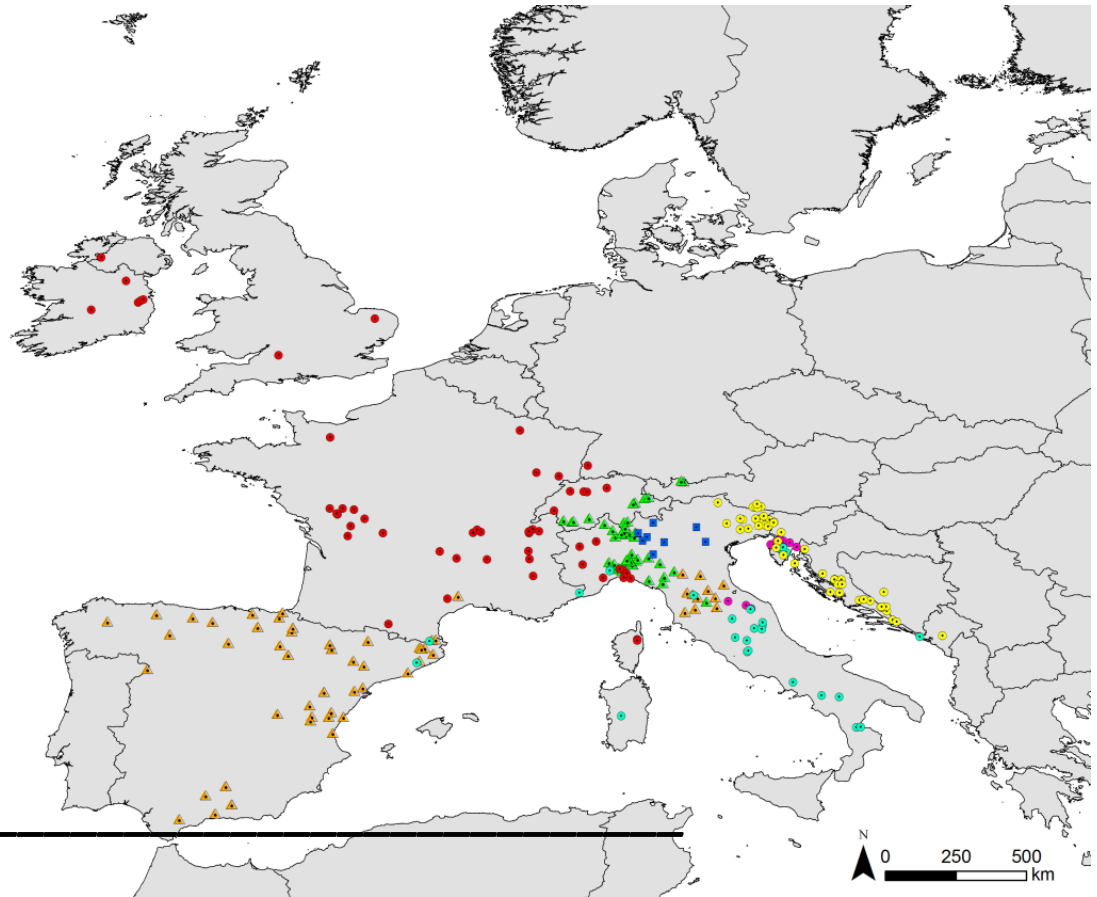
1. sekvence

721 jedinki - 160 lokacija (34 uzduž obale Jadrana, od Istre do Crne Gore)

DNA izolacija

- mtDNA: **16S rRNA** , **COI**

- *sekvenciranje*



sekvence: 72 jedinstvena *COI* haplotipa + 45 jedinstvenih 16S haplotipova = 102 kombinirana 16S/*COI* haplotipa

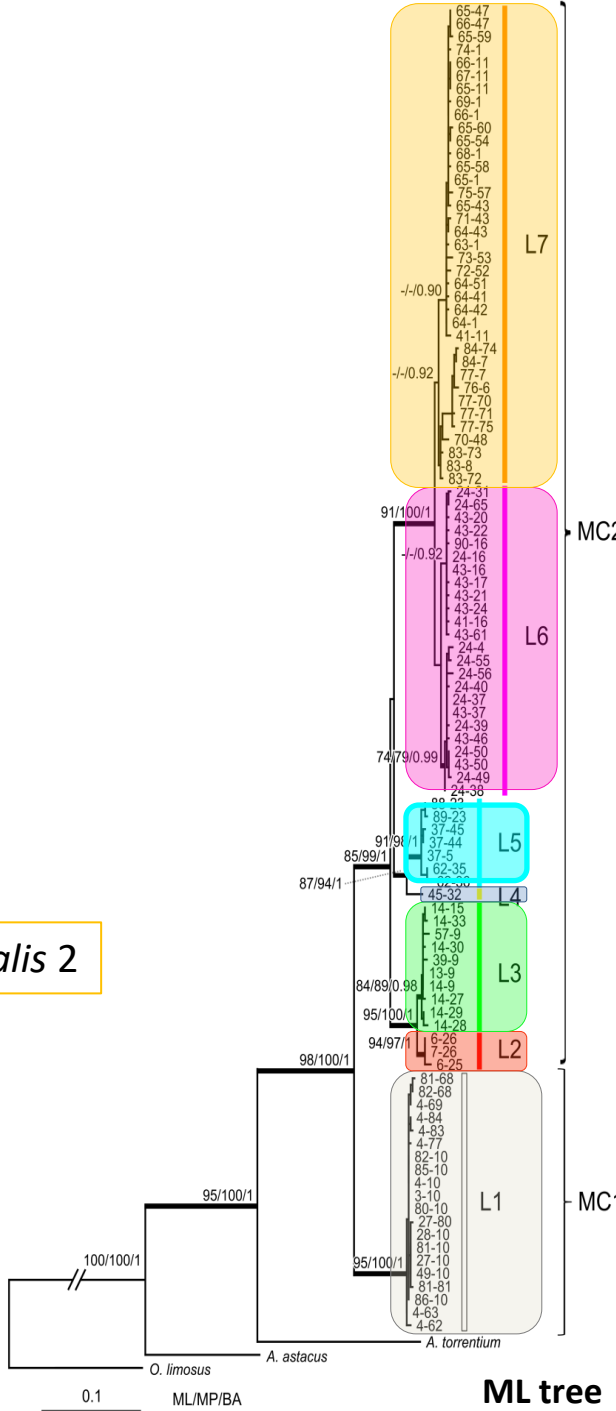
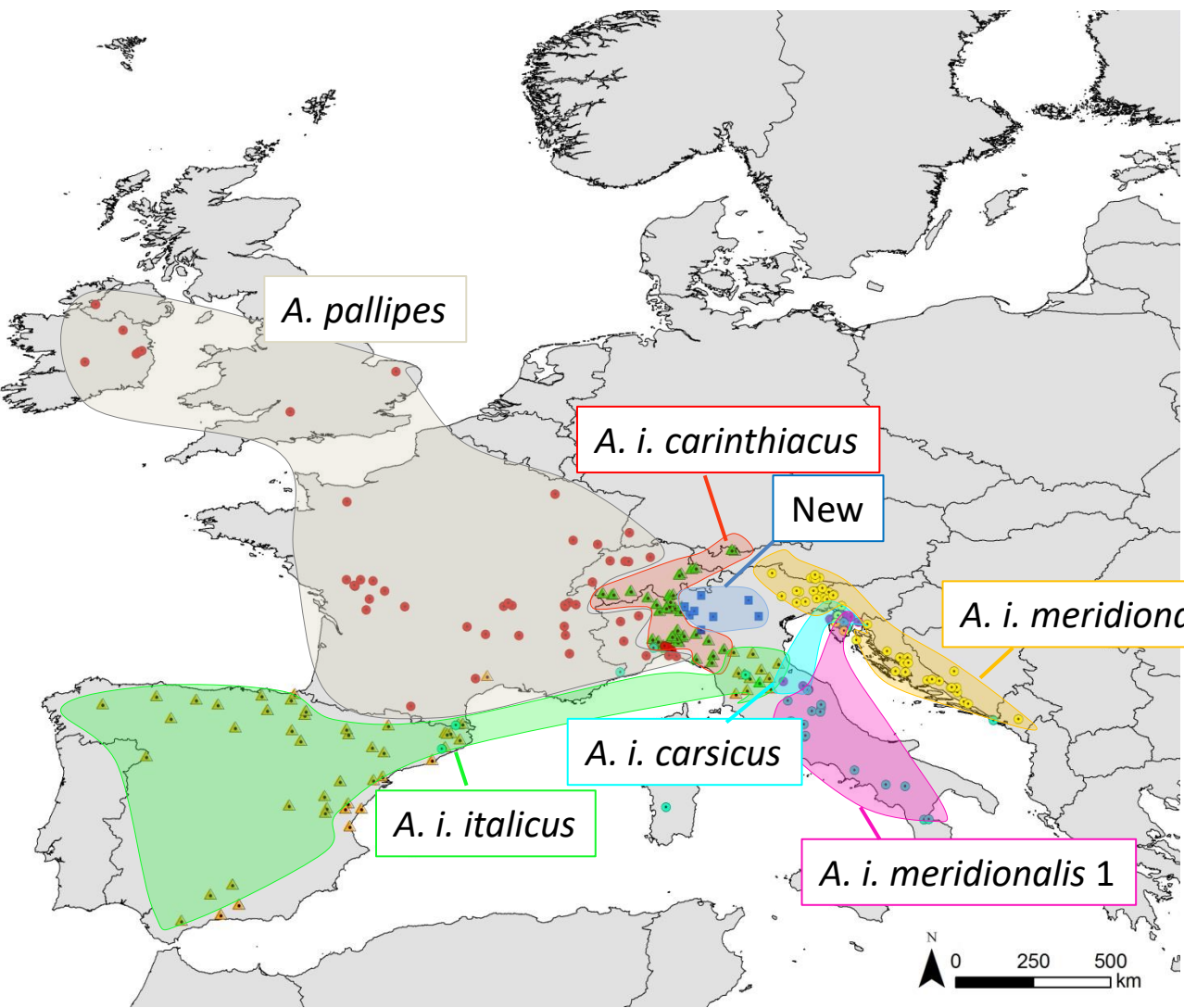
2. *Filogenetske analize*

Filogenetski odnosi između haplotipova



- Filogenetski odnosi - **Bayesian analysis, Maximum likelihood, Maximum Parsimony**
- Vrijeme divergencije **BEAST** (Bayesian analysis of molecular sequences related by an evolutionary tree)

• 2 glavne grupe (MC) - 7 linija (L)

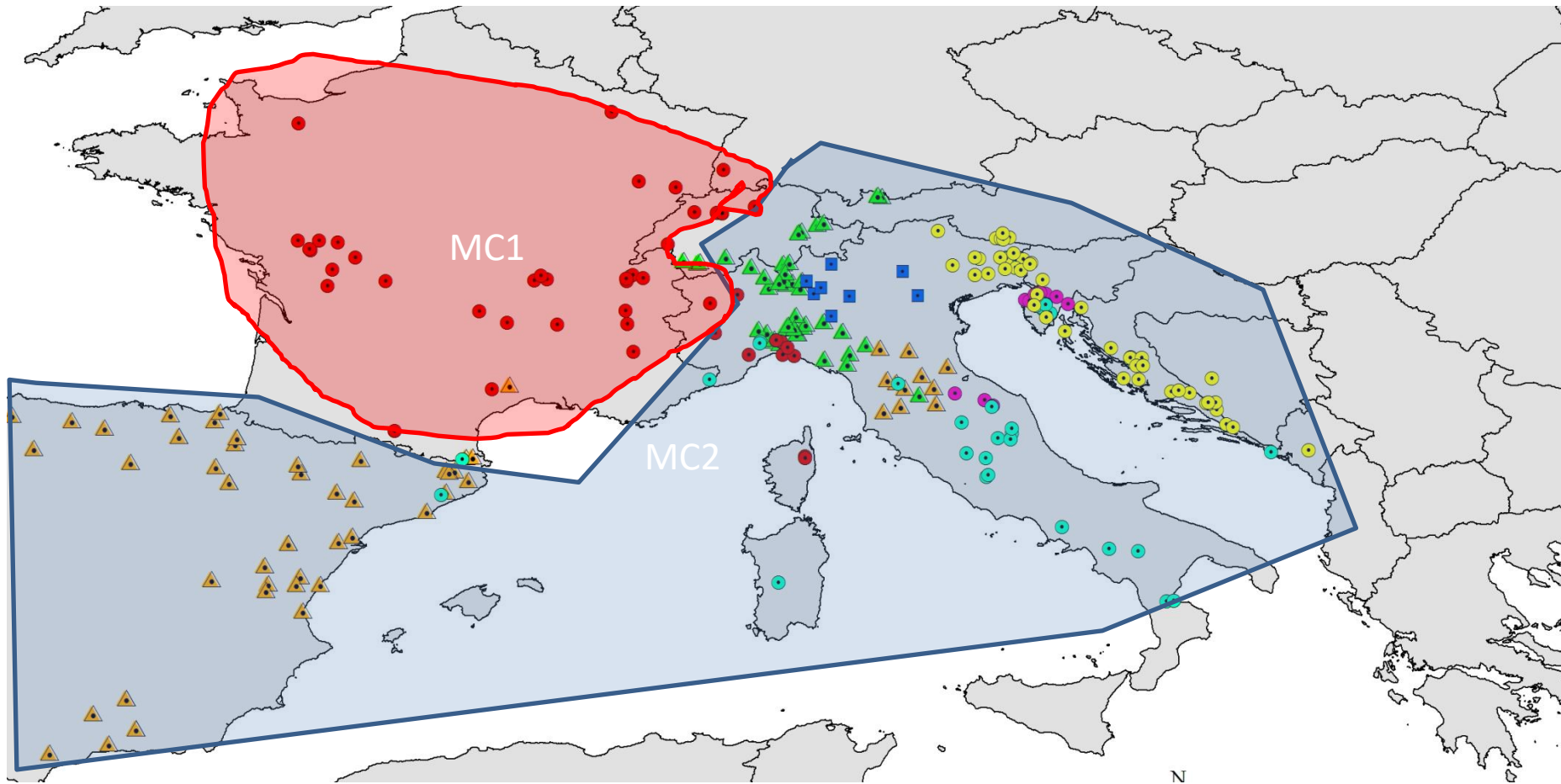


Genetska raznolikost

- genetske udaljenosti (p-distance)

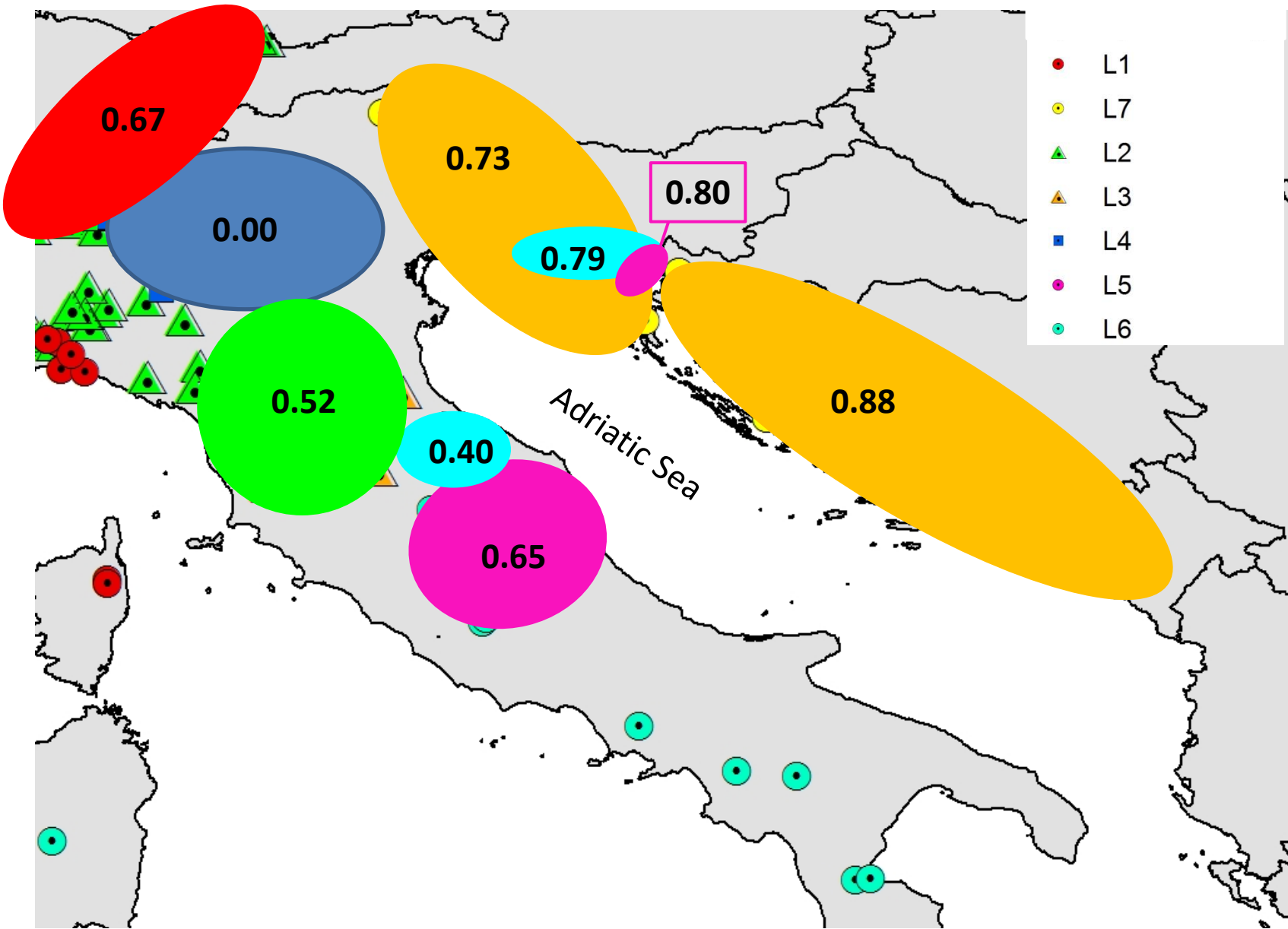
MC1 (*A. pallipes*) - MC2 (*A. italicus*) 5.1 – 5.6%

Između linija u MC2 (*A. italicus*) 1 – 4.2%



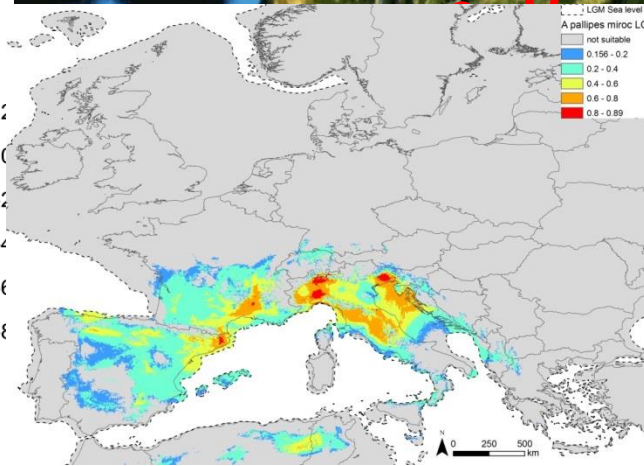
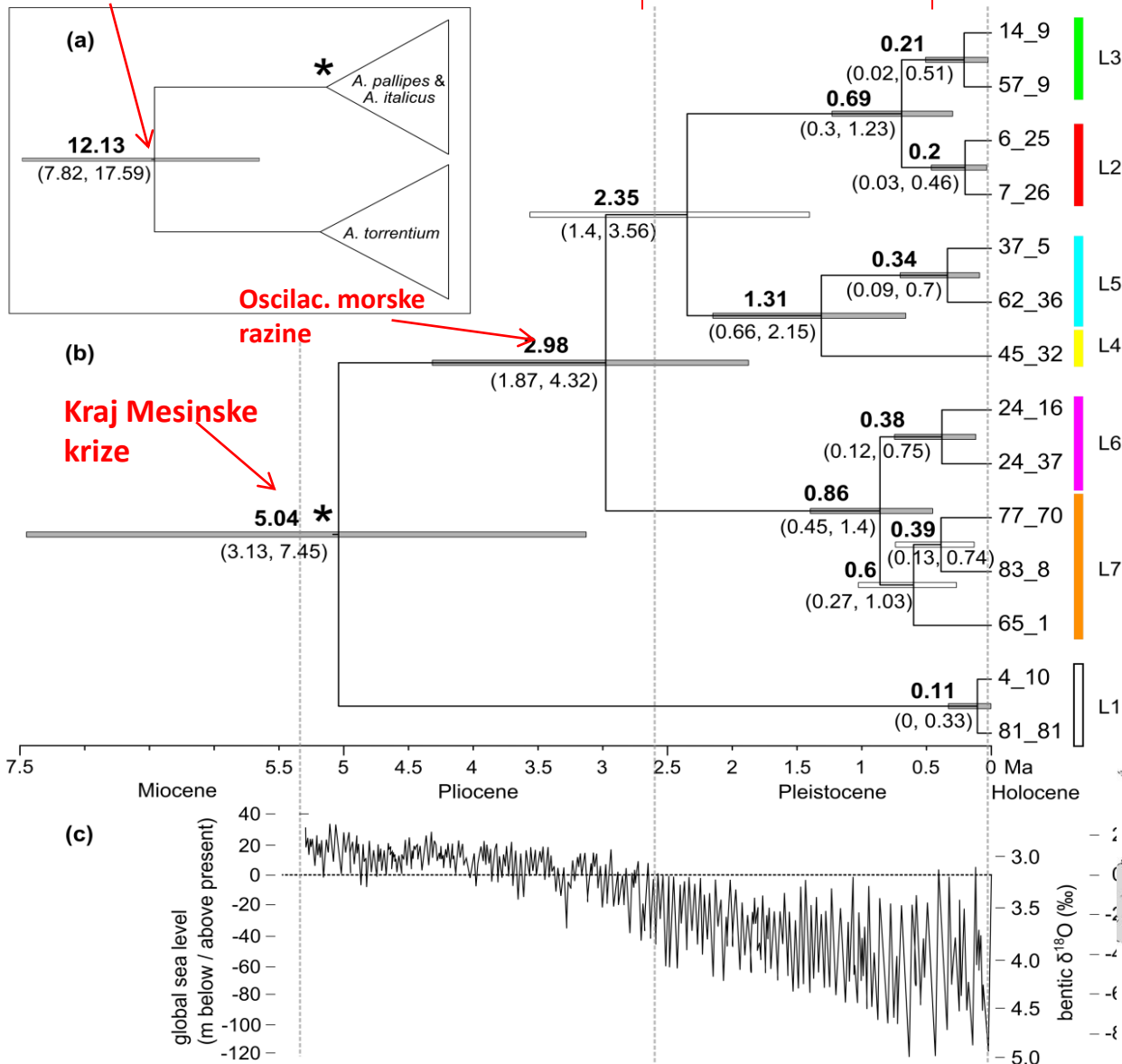
Genetska raznolikost

- Raznolikost haplotipova – populacije oko Jadrana



Uzdizanje Dinarida

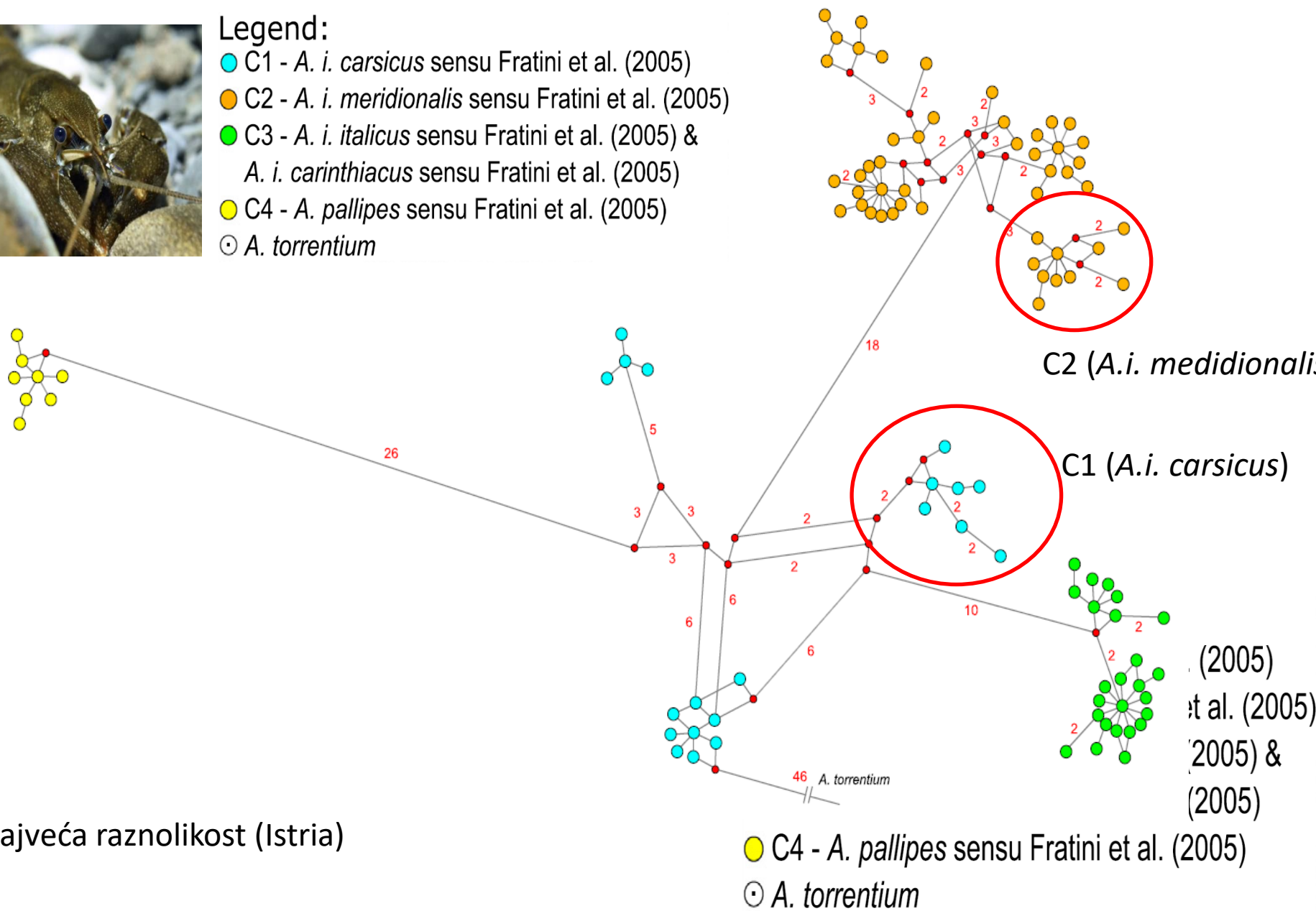
glacijacije + micanje obale + mreža novih vodotokova





Legend:

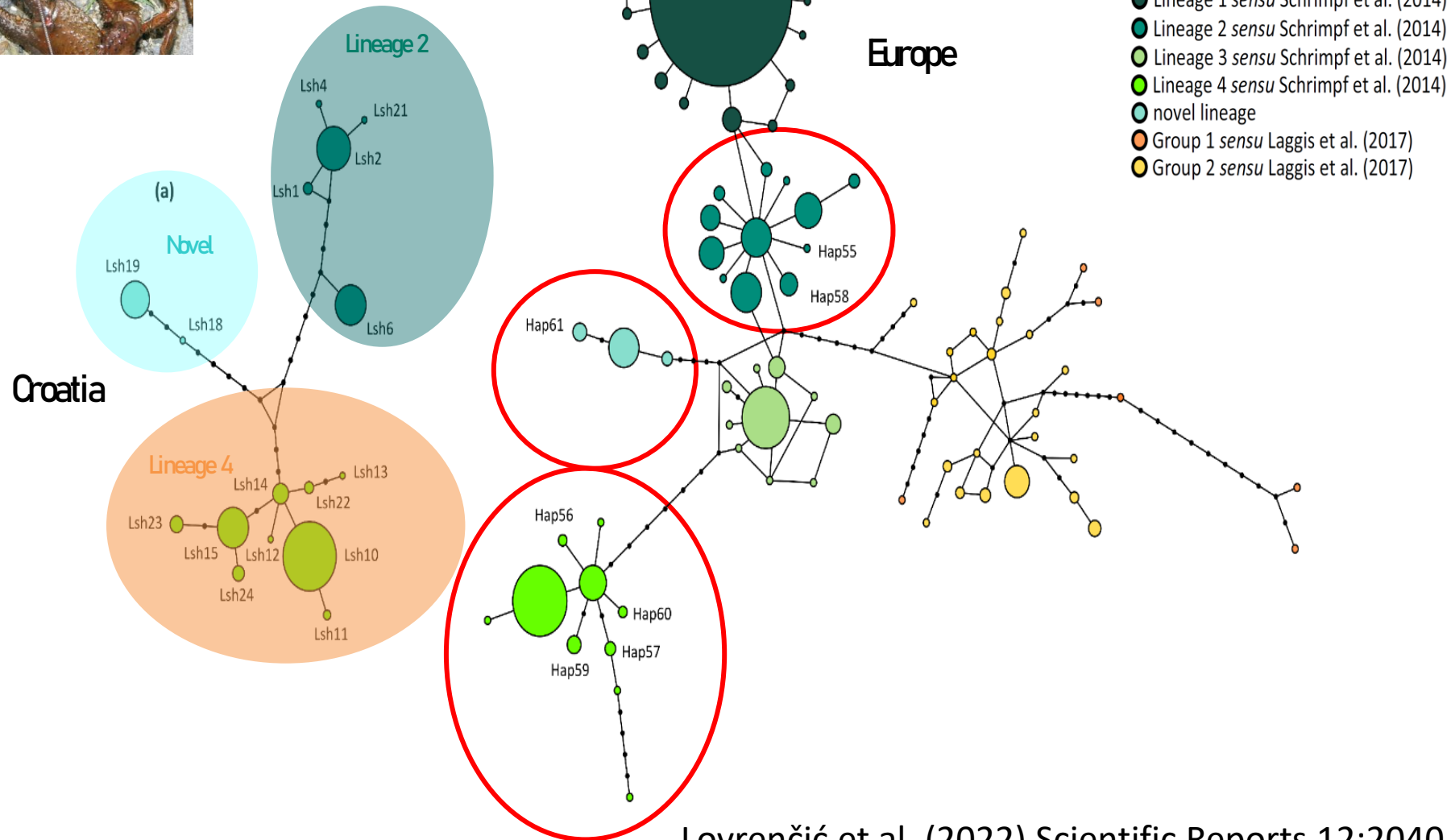
- C1 - *A. i. carsicus* sensu Fratini et al. (2005)
- C2 - *A. i. meridionalis* sensu Fratini et al. (2005)
- C3 - *A. i. italicus* sensu Fratini et al. (2005) & *A. i. carinthiacus* sensu Fratini et al. (2005)
- C4 - *A. pallipes* sensu Fratini et al. (2005)
- ⊙ *A. torrentium*



Molekularna filogenija (*mtDNA: COI, 16S*) – plemeniti rak

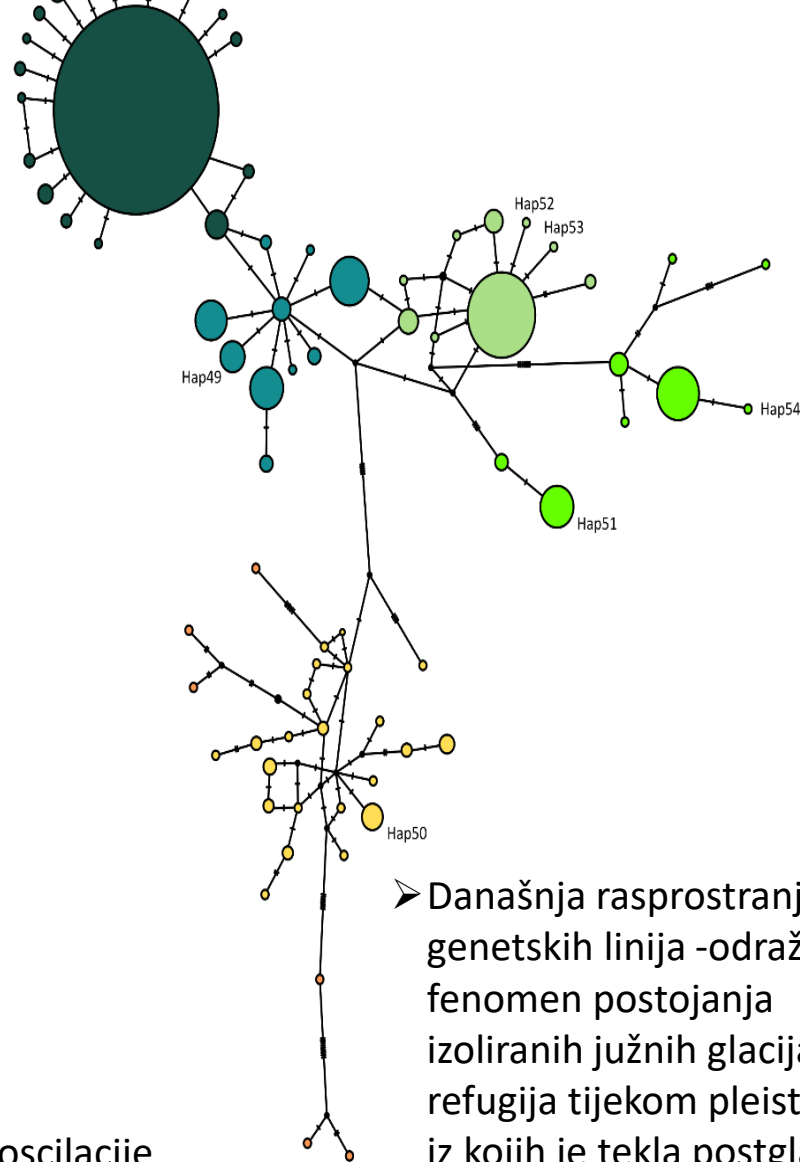
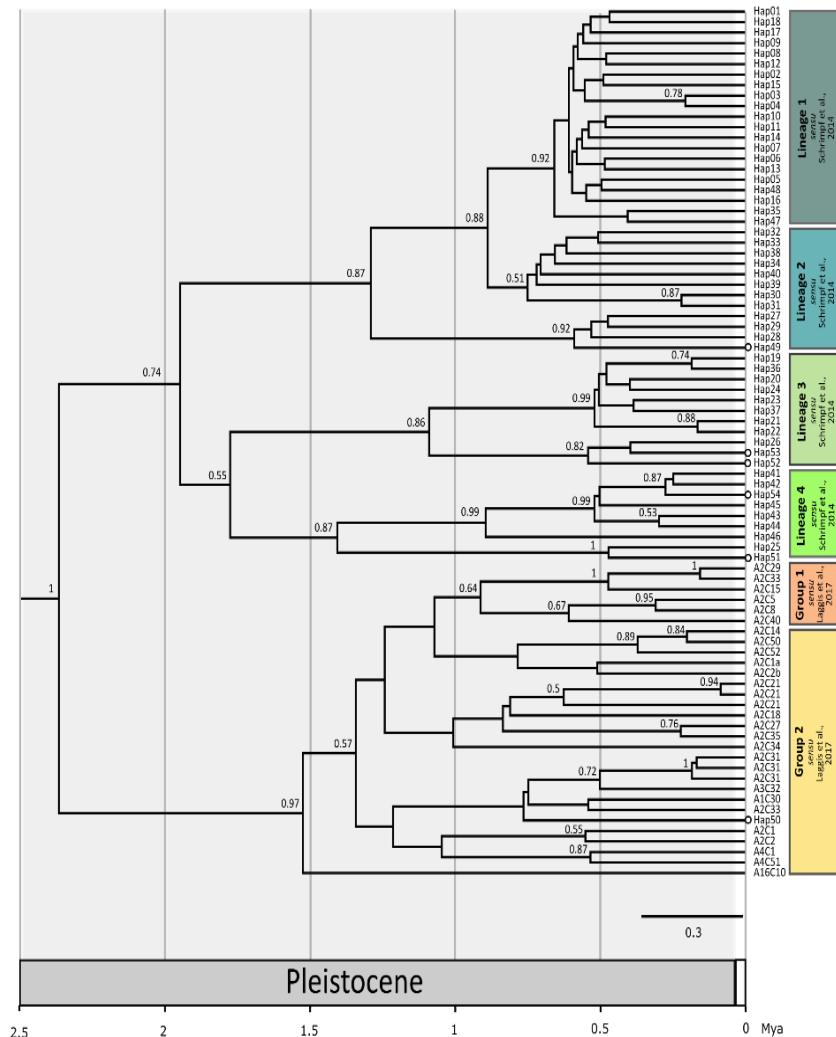


Njaveća raznolikost u kontinentalnoj Hr



Procjena vremena odvajanja evolucijskih linija

(A) (B)

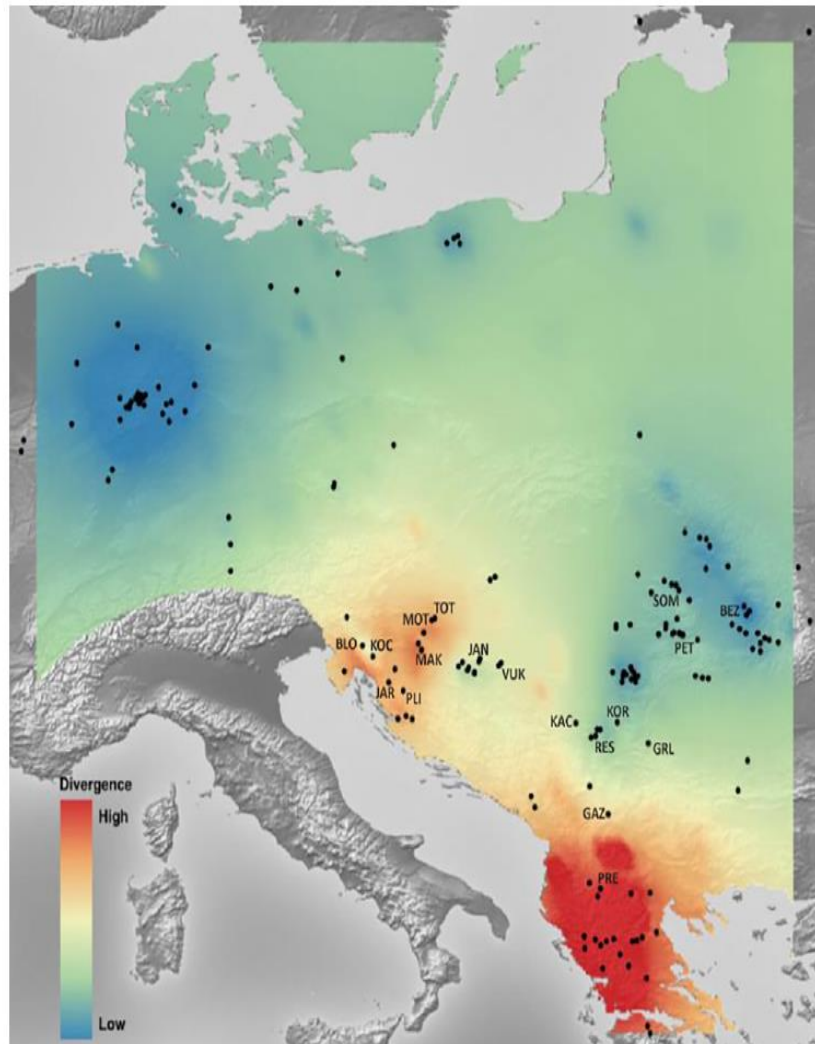


➤ Današnja rasprostranjenost genetskih linija -odražava fenomen postojanja izoliranih južnih glacialnih refugija tijekom pleistocena iz kojih je tekla postglacijalna rekolonizacija ostatka Europe

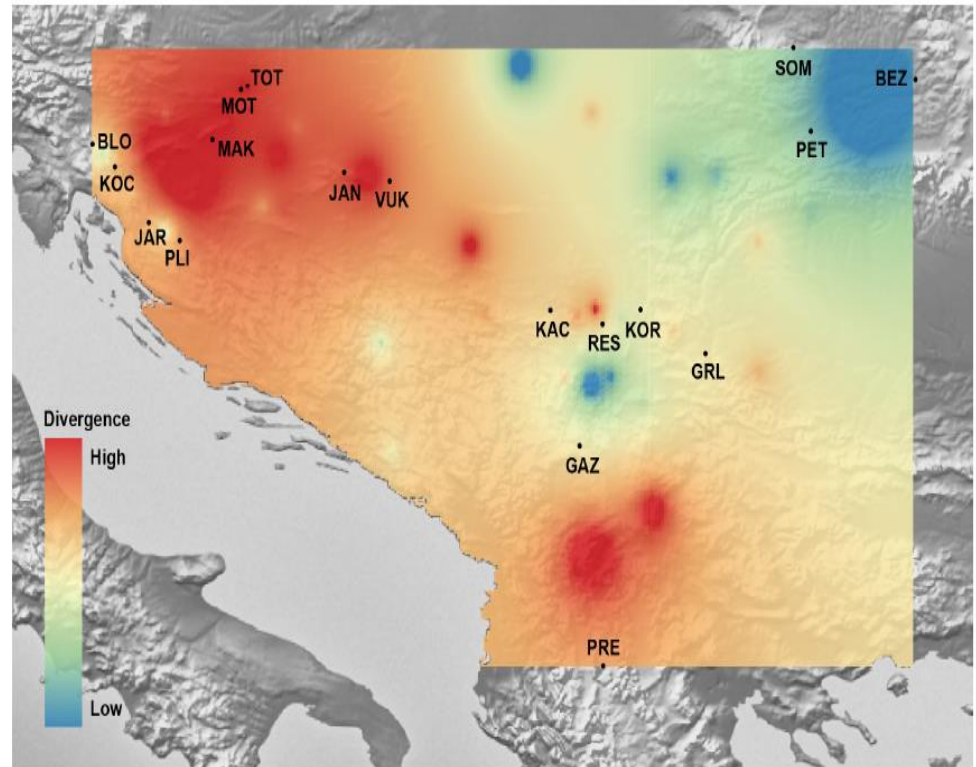
➤ divergencije evolucijskih linija u pleistocenu - snažne oscilacije klimatskih i ekoloških uvjeta za vrijeme izmjene glacijala i interglacijala

Karta rasprostranjenosti genetske raznolikosti

(a) mtDNA (*cyt b*)



(b) nuDNA (mikrosateliti)



Genetska raznolikost populacija

Population	Abbr.	N	P	N _A	A _R	A _{PR}	H _E	H _O	F _{IS}	P _{HWE}
Motičnjak	MOT	21	1.00	3.73	3.33	2.70	0.580	0.562	0.032	ns
Breznica	BRE	14	1.00	3.67	3.20	2.10	0.541	0.495	0.087	*
Burgeti	BUR	19	1.00	3.33	2.94	0.15	0.450	0.453	-0.005	ns
Ilova	ILO	24	1.00	5.20	4.19	1.95	0.684	0.630	0.081	ns
Otuča	OTU	9	1.00	3.47	3.41	1.50	0.573	0.511	0.114	ns
Bijela	BIJ	21	1.00	4.47	3.72	3.30	0.590	0.568	0.037	ns
Glogovica	GLO	28	1.00	5.20	3.95	0.90	0.638	0.569	0.109	ns
Kikovac	KIK	30	1.00	4.00	3.42	0.60	0.554	0.566	-0.021	ns
Sloboština	SLO	27	0.93	4.07	3.32	2.70	0.565	0.455	0.198*	*
Bednja	BED	30	1.00	6.00	4.18	2.25	0.624	0.582	0.069	ns
Kutjevačka	KUT	16	1.00	4.93	4.23	3.30	0.674	0.586	0.133	*
Veličanka	VEL	30	1.00	5.27	4.07	3.90	0.600	0.515	0.145*	ns
Jaruga	JAR	23	0.93	3.47	3.05	2.10	0.562	0.577	-0.027	ns
Maksimir	MAK	30	0.93	2.93	2.39	3.30	0.355	0.350	0.013	ns
Totovec	TOT	30	1.00	3.27	3.09	1.35	0.577	0.557	0.036	ns
Jankovac	JAN	30	1.00	4.13	3.26	0.30	0.557	0.529	0.051	*
Vuka	VUK	31	0.87	2.67	2.33	0.15	0.404	0.411	-0.017	ns

- visoka genetska raznolikost
- visoke vrijednosti N_A, P, A_R, A_{PR}, H_O

↑ visoka genetska raznolikost

↓ niska genetska raznolikost

- SLO & VEL → višak homozigota parenje u bliskom srodstvu → smanjenje genetske raznolikosti

- JAN & TOT → usko grlo → smanjenje efektivne veličine, fitnesa i adaptivnog potencijala

N_A – prosječan broj alela; A_R – alelna bogatstva; A_{PR} – broj privatnih alela; H_E – očekivana heterozigotnost;

H_O – uočena heterozigotnost; F_{IS} – k parenja u srodstvu

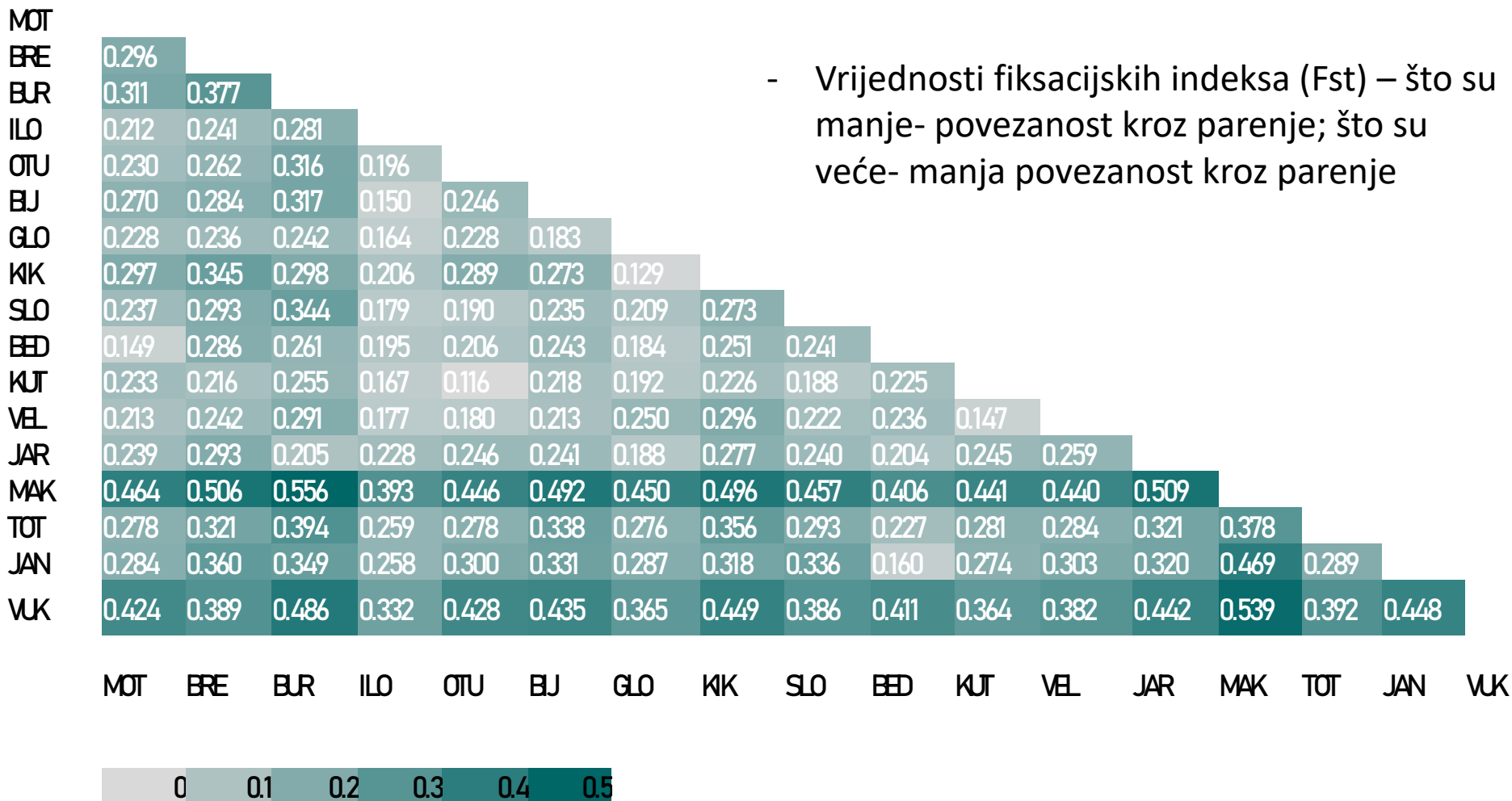
P_{HWE} – vjerojatnost odstupanja od Hardy-Weinberg ravnoteže

Genetska diferencijacija populacija

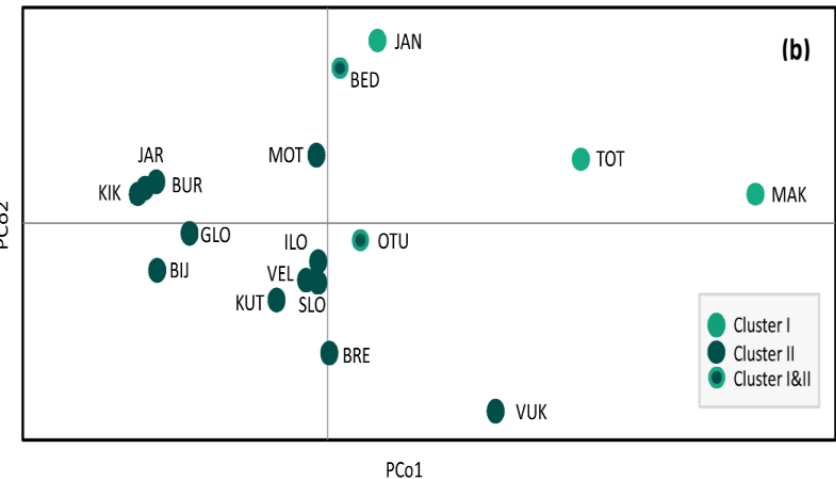
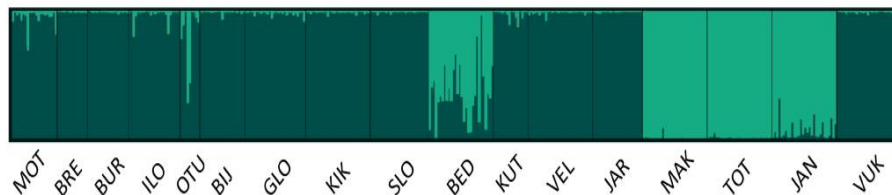
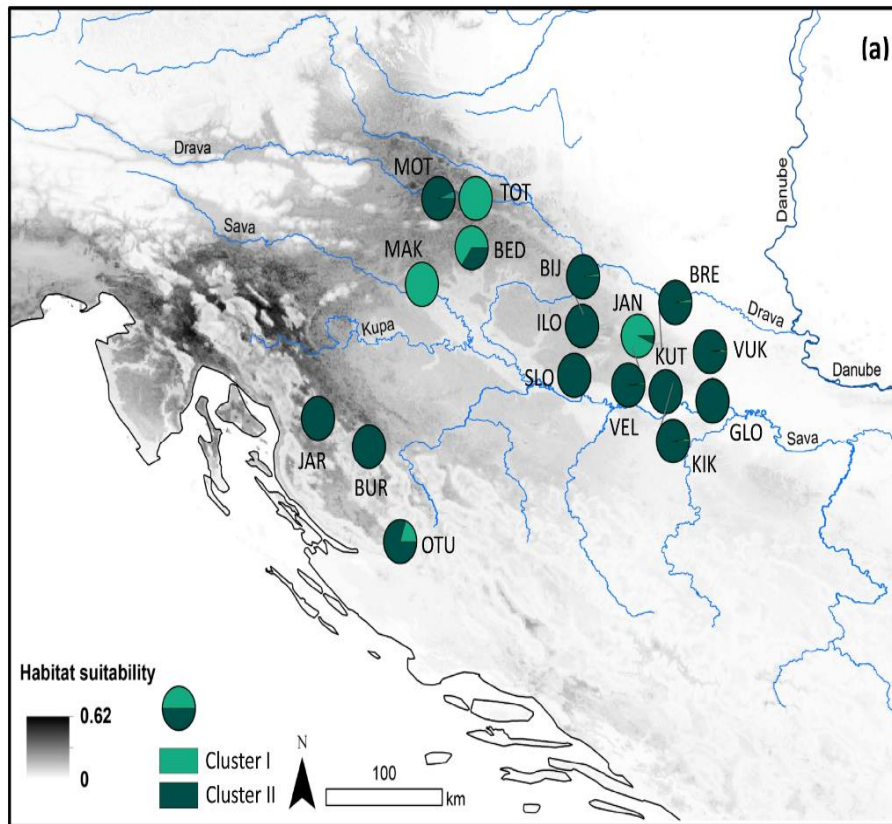
average F_{ST} = 0.295

A. torrentium average F_{ST} = 0.463

- Vrijednosti fiksacijskih indeksa (F_{ST}) – što su manje- povezanost kroz parenje; što su veće- manja povezanost kroz parenje



Genetska struktura populacija

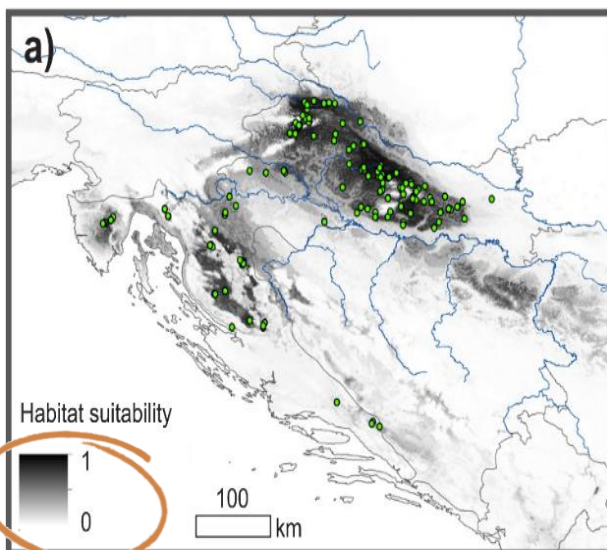


programa STRUCTURE -populacije u Hrvatskoj grupiraju u dvije genetske grupe

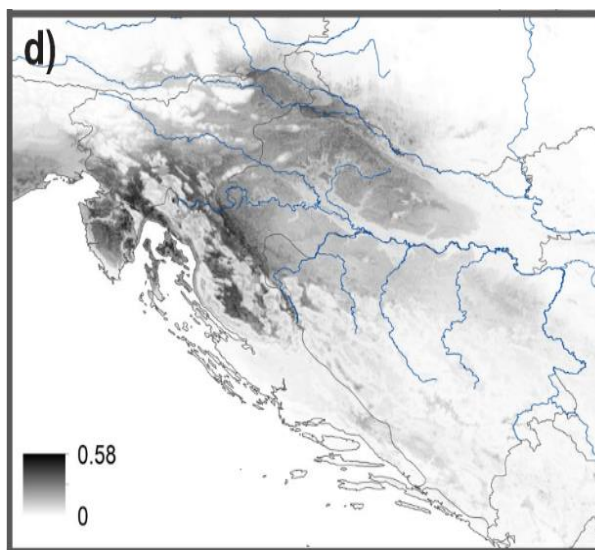
populacije koje sadrže jedinke iz obje grupe što odražava pripadnost zajedničkoj ancestralnoj grupi ili je posljedica antropogenih translokacija

Potencijalna rasprostranjenost plemenitog raka sada (2022) i u budućnosti (2070)

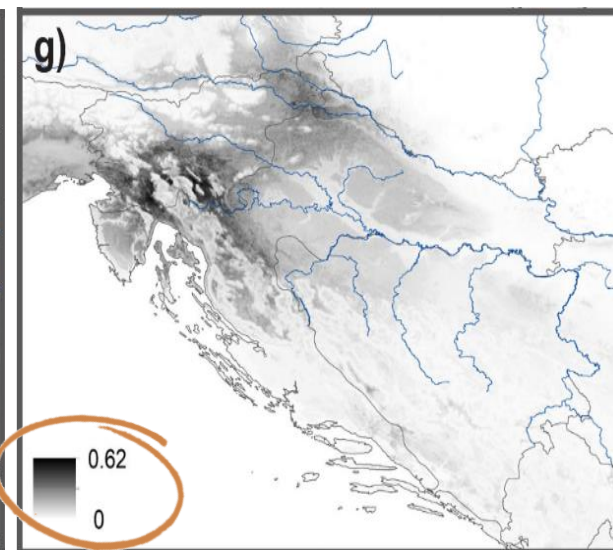
2022



2070: +1.8°C

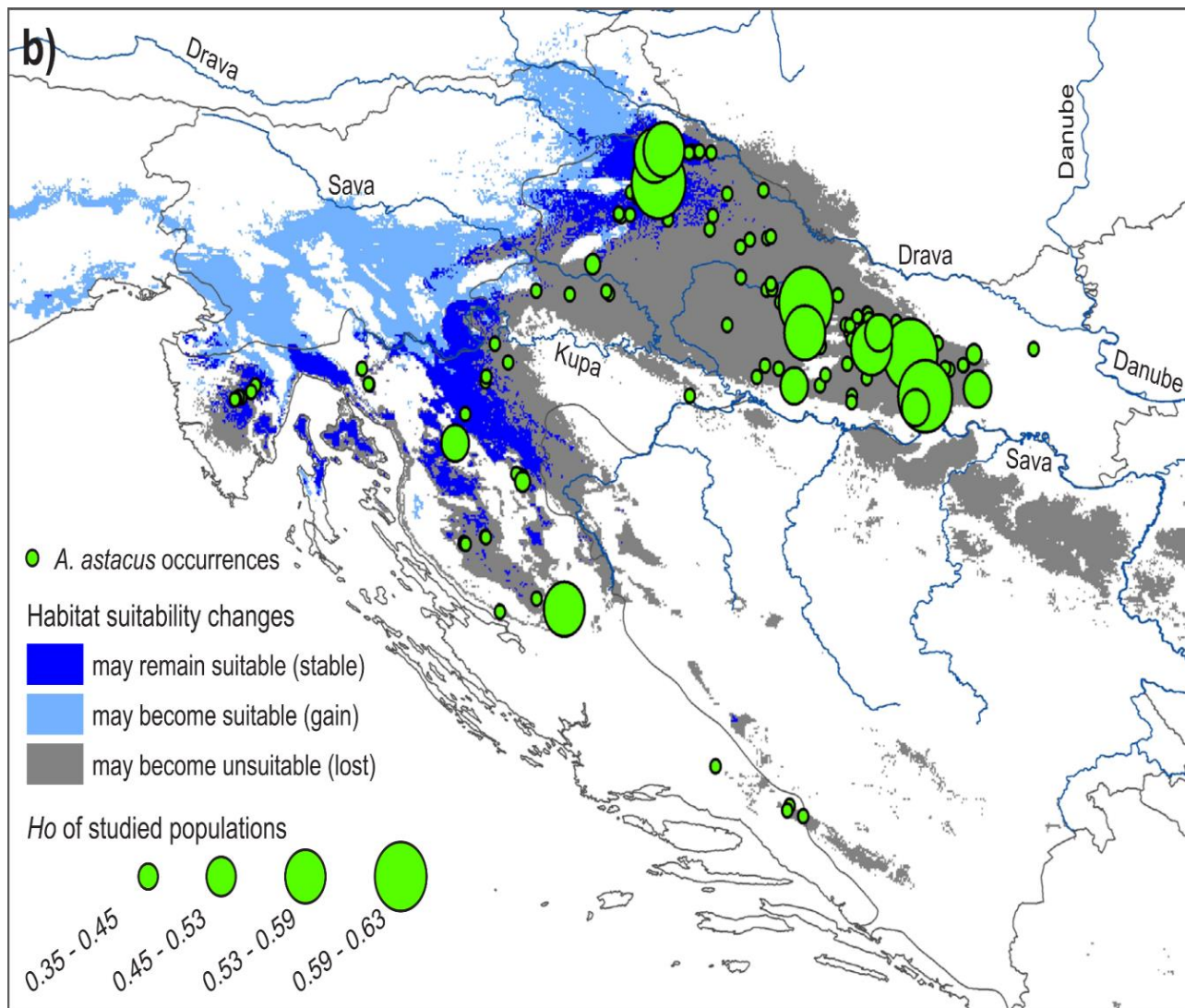


2070: +3.7°C



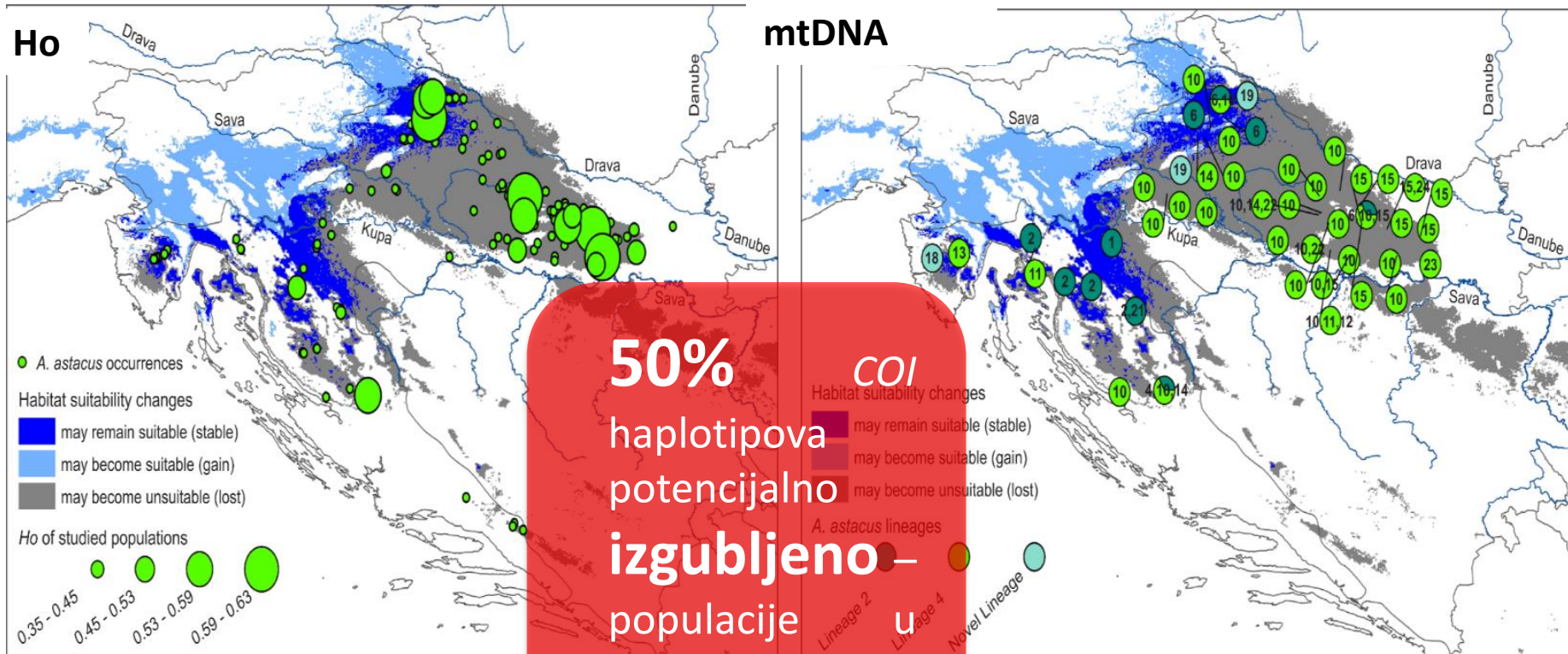
- negativni utjecaj klimatskih promjena
- značajno smanjenje povoljnih staništa do 2070. godine
- pomicanje potencijalne rasprostranjenosti prema SZ i Sloveniji

Promjene u povoljnosti staništa



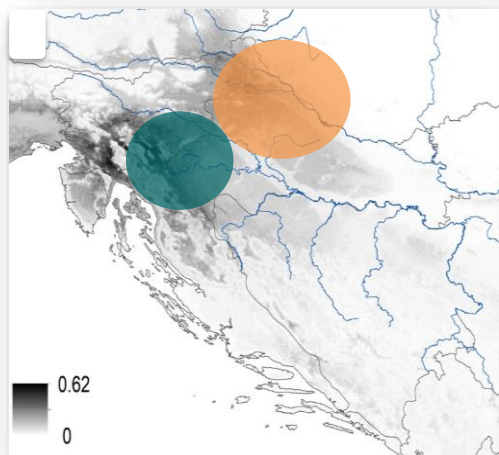
...gubitak oko **87%**
trenutno povoljnih
staništa za plemenitog
raka do 2070 (+3.7°C)

Preklapanje potencijalne buduće rasprostranjenosti plemenitog raka i genetske raznolikosti



- potencijalni gubitak velikog dijela genetske raznolikosti plemenitog raka zbog klimatskih promjena
 - populacije s najvećom i jedinstvenom genetskom raznolikosti smještene u područjima koja su predviđena kao nepovoljna u budućnosti

Potencijalni klimatski refugiji



- područja s najvećom genetskom raznolikošću i klimatski povoljnim staništima
 - rijeke i umjetna jezera na nižim nadmorskim visinama u alpskoj regiji
 - mtDNA Linija 2 i/ili Genetska grupa II
 - šljunčare i mrtvaje uz rijeke Dravu i Savu u sjeverozapadnom dijelu kontinentalne Hrvatske
 - mtDNA Linija 4 i/ili Genetska grupa I
- nedostupna zbog prirodnih barijera širenja → asistirana migracija i repopulacija
- donorske populacije za buduće repopulacije i reintrodukcije
 - populacije ILQ, KUT, VEL, BAČ i BIJ
 - visoka i jedinstvena genetska raznolikost na razini mtDNA i nuDNA
 - potencijalno izgubljene zbog nepovoljnih staništa u budućnosti



Zaključak

- Hrvatske populacije čuvaju značajnu genetsku raznolikost slatkovodnih rakova – rezervoar na europskom nivou
- Najveća raznolikost potočnog raka – Alpinska biogeografska regija
- Najveća raznolikost riječnog raka – Kontinentalna biogeo. regija
- Najveća raznolikost bjelonogog raka – Mediteranska biogeo. regija
- **Filogenija + filogeografija + populacijska genetika + SDM – neophodni za izradu konzervacijskih planova za ove ugrožene/osjetljive native vrste**