



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ**  
**ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ**

**Симона Р. Ђуретановић**

**Филогенија, филогеографија и конзервација**  
**врсте *Astacus astacus* (Decapoda, Astacidae) на**  
**подручју Балканског полуострва**

**Докторска дисертација**

**Крагујевац, 2019. година**



<i>I Аутор</i>
Име и презиме: <b>Симона Р. Буретановић</b>
Датум и место рођења: <b>14. 04. 1982. године, Крагујевац</b>
Садашње запослење: <b>Универзитет у Крагујевцу, Природно-математички факултет, Институт за биологију и екологију, звање истраживач-сарадник</b>
<i>II Докторска дисертација</i>
Наслов: <b>Филогенија, филогеографија и конзервација врсте <i>Astacus astacus</i> (Decapoda, Astacidae) на подручју Балканског полуострва</b>
Број страница: <b>118</b>
Број слика: <b>16 табела, 15 слика</b>
Број библиографских података: <b>232</b>
Установа и место где је рад израђен: <b>Универзитет у Крагујевцу, Природно-математички факултет</b>
Научна област (УДК): <b>595.384:574.1(4-497) 595.384 Decapoda 574. Општа екологија и биодиверзитет укључујући: Биоценологија, Хидробиологија, Биогеографија. 574.1 Конзервациона биологија. 4-497 Подручје Балканског полуострва.</b>
Ментор: <b>Проф. др Ивана Мегвајер (hrv. Ivana Maguire), Свеучилиште у Загребу, Природословно-математички факултет</b>
<i>III Оцена и одбрана</i>
Датум пријаве теме: <b>12. 04. 2017. године</b>
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:
Комисија за оцену подобности теме и кандидата:
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. др Ивана Мегвајер, редовни професор Природословно-математичког факултета у Загребу, ужа научна област: Биологија-зоологија;</li> <li>2. др Владица Симић, редовни професор Природно-математичког факултета у Крагујевцу, ужа научна област: Екологија, биогеографија и заштита животне средине;</li> <li>3. др Момир Пауновић, научни саветник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић”, ужа научна област: Хидробиологија.</li> </ol>
Комисија за преглед и одбрану докторске дисертације:
<hr/> <p>др Владица Симић, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област: Екологија, биогеографија и заштита животне средине, председник Комисије</p> <hr/>
<p>др Момир Пауновић, научни саветник, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић”, научна област: Биологија, ужа научна област: Хидробиологија</p> <hr/>
<p>др Ана Петровић, доцент, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област: Екологија, биогеографија и заштита животне средине</p>
Датум одбране докторске дисертације:

*Мојим родитељима*

## Захвалница

Ова дисертација представља резултат вишегодишњег рада, па желим да се искрено захвалим свима који су ми помогли, бодрили ме и веровали у мене.

Велику захвалност дугујем ментору др *Ивани Мегвајер* за помоћ и подршку током израде докторске дисертације, за бодрење и подстрек и за свако изречено „*ти то можеш*” и „*поносна сам на тебе*”.

Мом неформалном ментору, др *Владици Симићу*, хвала на поверењу које ми је указао, на стрпљивом усмеравању и несебичној помоћи у раду.

Захваљујем се члановима Комисије, др *Момиру Пауновићу* и др *Ани Петровић*, на корисним сугестијама, предлозима и корекцијама које су унапредиле изглед овог рада. Драгој колегиници *Ани* се захваљујем и на дугогодишњој лепој сарадњи, на подршци и корисним саветима.

Професорки др *Снежани Симић* хвала на пруженој шанси, интересовању за мој рад и лепој сарадњи.

Велику захвалност дугујем мојој пријатељици *Андреји Луцић* и њеној породици који су ми отворили врата свог дома кад год је било потребно. Велико хвала колеги и колегиницама са Природословно-математичког факултета у Загребу, *Мишелу* и *Ивани* на знању које су поделили са мном, на помоћи у лабораторијском раду, на стрпљењу и осмеху уз који смо све радили, а *Леони* на великој помоћи око филогенетичких анализа. Хвала и колегиници *Мартини Јаклич* за помоћ при прикупљању узорака у Словенији. Колегама са Института за ветеринарску медицину Универзитета природних наука у Тартуу, у Естонији, захваљујем што су омогућили да се део лабораторијских анализа уради у Департману за Аквакултуру.

Драгим колегиницама и колегама са Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић” захваљујем на лепој сарадњи и подршци.

Мојим драгим колегиницама и колегама, *Александри*, *Наташи*, *Милени*, *Тијани*, *Марији*, *Маријани*, *Невени*, *Марку*, *Вити*, *Бојану*, *Зорану*, *Милошу* и *Мирославу*, хвала на лепој сарадњи, позитивној атмосфери и дивним успоменама. *Тијана*, посебно хвала на конструктивним дијалозима и великој помоћи око

програмских анализа микросателитских локуса. Драге моје *Александра, Наташа* и *Милена* хвала вам на пријатељској помоћи и подршци током свих ових година, задовољство је радити са вама и имати вас за пријатеље.

Неизмерну захвалност дугујем *мојим родитељима* и *брату* на безусловној љубави, разумевању и подршци свих ових година. Мом *Жарку* и *Сари*, хвала што сте мој ослонац, моја оази мира и неисцрпни извор радости.

*Симона Р. Ђуретановић*

## **Филогенија, филогеографија и конзервација врсте *Astacus astacus* (Decapoda, Astacidae) на подручју Балканског полуострва**

Резиме:

Нестанак врста и смањење биодиверзитета представљају најозбиљније глобалне последице угрожавања животне средине. Акватични екосистеми су под интензивним антропогеним утицајем у смислу загађења, прекомерне експлоатације, модификације водотокова, деградације станишта и уноса инвазивних врста. Пад биодиверзитета је далеко већи у слатководним екосистемима него у најугроженијим терестичним екосистемима, а најугроженији су инвертебрати, попут шкољки и слатководних ракова. Чак једној трећини слатководних ракова широм света прети ризик од изумирања.

Ракови су највећи покретни, слатководни бескичмењаци и индикатори су доброг квалитета вода. Познати су као значајне компоненте биодиверзитета, са важном еколошком улогом у правилном функционисању слатководних екосистема и кључном улогом у ланцима исхране.

Речни рак има комплексан историјски и генетички статус који је обликован геолошким догађајима, губитком станишта и загађењем, али је и последица транслокација и реинтродукција, како аутохтоних, тако и алохтоних врста ракова, које су довеле до разбијања природне генетичке структуре врсте, до мешања и губитка популација широм Европе. Широм ареала распрострањења забележено је опадање његових природних популација за 50–70%, па се нашао и на Црвеној листи угрожених врста Међународне уније за очување природе где је класификован као „рањива врста” са трендом смањења броја популација и субпопулација и смањења ареала распрострањења.

Циљеви овог истраживања били су: анализа морфолошке варијабилности популација врсте *Astacus astacus* на истраживаном подручју Балканског полуострва применом методе класичне морфометрије; филогенетичко истраживање популација анализом *16S rRNA* и *COI* гена митохондријалне ДНК; процена нивоа диференцијације популација и стање истраживаних популација анализом нуклеарних маркера – микросателита; процена ризика изумирања применом ESHIPPO crayfish модела

(Simić *et al.*, 2015) и одређивање приоритета заштите на истраживаном подручју и дефинисање еволуционо значајних јединица (ESUs) и јединица управљања (MUs).

Анализа 22 морфолошка карактера показала је да постоји диференцијација јединки по локалитетима. Мужјаци су се разликовали у више карактера од женки. Мере карапакса (HEW, ROW, CGW, CPW, CEW) значајно су допринеле дискриминацији између популација мужјака и између популација женки. Мултиваријантна статистичка анализа морфометријских карактера се још једном показала као корисна за квантификацију величине и облика организама и као добра техника за истраживање географских варијација истих.

Према резултатима филогенетске анализе детектовано је шест хаплотипова у оквиру 15 истраживаних популација. У истраживаним популацијама са територије Србије детектована су четири хаплотипа Нар26, Нар47, Нар48 и Нар49. Нар50 детектован је код популације из Албаније, а Нар51 код истраживаних популација из Словеније. Детектована је висока вредност диверзитета хаплотипова за читав скуп узорака ( $H_d = 0,665$ ).

Највеће вредности очекиване ( $H_e = 0,525$ ) и детектоване хетерозиготности ( $H_o = 0,539$ ) констатоване су у популацији из реке Качер, што указује на велику унутарпопулациону варијабилност. Најнижа генетичка варијабилност детектована је у популацији из акумулације Газиводе ( $H_e = 0,118$ ) и у популацији из акумулације Грлиште ( $H_e = 0,135$ ). Вредности коефицијента инбридинга ( $F_{is}$ ) у популацијама из акумулације Блоке, Преспанског језера и акумулације Кореница незнатно су веће од нуле па се може закључити да инбридинг постоји, али још увек није значајно заступљен, тако да је варијабилност на унутарпопулационом нивоу и даље значајна. Највећи број приватних алела по локусу детектован је у популацији из Преспанског језера. Највеће вредности генетичке удаљености између парова популација ( $F_{st}$ ) детектоване су између популација из акумулације Грлиште и акумулације Газиводе ( $F_{st} = 0,826$ ) и између популација из Преспанског језера и акумулације Газиводе ( $F_{st} = 0,808$ ). Најнижа вредност генетичке удаљености је детектована између популација из Ресничког потока и реке Качер ( $F_{st} = 0,328$ ). STRUCTURE анализа је показала јасну структурираност анализираних популација.

Применом ESHIPPO crayfish модела утврђен је први степен приоритета заштите за популације из Преспанског језера и акумулације Газиводе. Други степен приоритета



заштите утврђен је за популације из акумулација Блоке, Кореница и Грлиште и популацију из Кочевске реке. Дефинисане су четири еволуционо значајне јединице (ESUs) и шест јединица управљања (MUs) према Moritz (1994) применом резултата анализе главних координата (PCoA), STRUCTURE анализе и урађених филогенетичких и популационих анализа.

Процењено стање популација речног рака на истраживаном подручју Балканског полуострва указује на постојање потребе за конзервацијом генофонда применом адекватних мера.

## **Phylogeny, phylogeography and conservation of species *Astacus astacus* (Decapoda, Astacidae) in the area of the Balkan Peninsula**

Summary:

The disappearance of species and the decline of biodiversity are the most serious global consequences of environmental threats. Aquatic ecosystems are under intense anthropogenic influence in terms of pollution, overexploitation, water course modification, habitat degradation and introduction of invasive species. The decline of biodiversity is far greater in freshwater ecosystems than in the most threatened terrestrial ecosystems, and the most vulnerable are invertebrates, such as freshwater crayfish. Even one-third of freshwater crayfish worldwide are at risk of extinction.

Crayfish are the largest mobile, freshwater invertebrates and indicators of good water quality. They are known as significant components of biodiversity, with an important ecological role in the proper functioning of freshwater ecosystems and the key role in food chains.

The noble crayfish has a complex historical and genetic status shaped by geological events, habitat loss and pollution, but is also a consequence of translocations and reintroduction of both autochthonous and allochthonous species of crayfish that led to the disruption of the species genetic structure, mixing and loss of populations across Europe. Natural subpopulations of the noble crayfish have been declining across Europe for 50-70% and it is classified as a "vulnerable species" in the IUCN Red List of Threatened Species with a decreasing trend of populations and subpopulations and decreasing distribution areas.

The objectives of this study were: to analyze the morphological variability of populations of the species *A. astacus* in the study area of the Balkan Peninsula by using the classical morphometry method; phylogenetic study of populations by analysis of *16S rRNA* and *COI* genes of mitochondrial DNA; evaluation of the differentiation and status of the studied populations by microsatellite markers; assessment of extinction risk by using the ESHIPPO crayfish model (Simić *et al.*, 2015) and defining conservation priorities in the study area and identifying evolutionarily significant units (ESUs) and management units (MUs).

Analysis of twenty-two morphometric characters showed differentiation of individuals by localities. Males differed in more characters than females. Measures of carapax (HEW, ROW, CGW, CPW, CEW) contributed significantly to discrimination between male populations and between female populations. Once again multivariate analysis of morphometric characters has proved to be useful for quantifying the size and shape of organisms and as a good technique for exploring their geographical variations.

According to the results of phylogenetic analysis, six haplotypes were detected within the 15 studied populations. In the studied populations from Serbia, four haplotypes Hap26, Hap47, Hap48 and Hap49 were detected. Hap50 was detected in the Albanian population and Hap51 in populations from Slovenia. Haplotype diversity for the entire sample set ( $H_d = 0,665$ ) was high.

The highest values of expected ( $H_e = 0,525$ ) and observed heterozygosity ( $H_o = 0,539$ ) were reported in the population from the Kačer River, indicating a large intra-population variability. The lowest genetic variability was detected in the population from the Gazivode Reservoir ( $H_e = 0,118$ ) and in population from the Grlište Reservoir ( $H_e = 0,135$ ).

The values of the inbreeding coefficient ( $F_{is}$ ) in populations from the Bloke Reservoir, Lake Prespa and Korenica Reservoir are slightly higher than zero, so it can be concluded that inbreeding exists but is not yet significantly represented, so variability at the intra-population level is still significant. The largest number of private alleles per locus was detected in the population from the Lake Prespa. The highest values of genetic distance between pairs of populations ( $F_{st}$ ) were detected between populations from the Grlište Reservoir and the Gazivode Reservoir ( $F_{st} = 0,826$ ) and between populations from the Lake Prespa and the Gazivode Reservoir ( $F_{st} = 0,808$ ). The lowest genetic distance was detected between populations from the Resnik Creek and the Kačer River ( $F_{st} = 0,328$ ). STRUCTURE analysis showed a clear differentiation of the analyzed populations.

The first level of protection priority was established by using the ESHIPPO crayfish model for populations from the Lake Prespa and Gazivode Reservoir. The second level of protection priority has been established for populations from the Bloke, Korenica and Grlište Reservoirs and population from the Kočevska River. Four evolutionarily significant units (ESUs) and six management units (MUs) were defined according to Moritz (1994) by using the results of Principal Coordinate Analysis (PCoA), STRUCTURE analysis and phylogenetic and population analysis.

The estimated status of the noble crayfish populations in the study area of the Balkan Peninsula indicates a need for gene pool conservation by applying appropriate measures.

# Садржај

<b>1. Увод</b> .....	1
1.1 О слатководним раковима .....	4
1.2 Племенити рак <i>Astacus astacus</i> (Linnaeus, 1758) .....	9
1.3 Преглед литературе .....	11
1.3.1 Преглед литературе истраживаног подручја.....	14
<b>2. Циљеви истраживања</b> .....	16
<b>3. Материјал и методе</b> .....	18
3.1 Истраживано подручје и његове карактеристике .....	19
3.1.1 Река Лепеница и њене притоке, Петровачка река и Реснички поток.....	20
3.1.2 Река Качер и Козељска река .....	20
3.1.3 Акумулација Гружа .....	20
3.1.4 Акумулације Бусур и Кореница .....	21
3.1.5 Акумулација Грлиште .....	21
3.1.6 Акумулација Газиводе.....	21
3.1.7 Језеро Блед и вештачко језеро Блоке .....	22
3.1.8 Преспанско језеро .....	22
3.2 Узорковање .....	24
3.3 Морфометријске анализе .....	26
3.3.1 Статистичка анализа морфометријских података .....	28
3.4 Генетичке методе.....	28
3.4.1 Изолација геномске ДНК, PCR амплификација, гел електрофореза, секвенцирање гена мтДНК и микросателитска генотипизација .....	28
3.4.2 Програмска анализа гена мтДНК.....	33
3.4.3 Програмске анализе микросателитских локуса .....	34
3.5 Процена ризика изумирања и приоритета конзервације истраживаних популација речног рака применом модификованог модела ESHIPPO crayfish .....	36
<b>4. Резултати</b> .....	41
4.1 Резултати морфометријских анализа.....	42
4.2 Генетичка варијабилност секвенци .....	48
4.3 Генетичка структура балканских популација.....	55
4.4 Процена ризика изумирања и приоритета конзервације истраживаних популација речног рака применом модификованог модела ESHIPPO crayfish .....	63
<b>5. Дискусија</b> .....	67

5.1. Морфометријске анализе балканских популација речног рака .....	70
5.2 Филогенетичке и популационе анализе балканских популација речног рака ..	73
5.3 Процена ризика изумирања и могуће конзервационе мере .....	78
<b>6. Закључци</b> .....	<b>82</b>
<b>7. Литература</b> .....	<b>86</b>
<b>8. Прилози</b> .....	<b>111</b>

## Листа табела

**Табела 1.** Списак истраживаних локалитета

**Табела 2.** Истраживани локалитети и број јединки (женке ( $N_f$ ) и мужјаци ( $N_m$ )) по популацији

**Табела 3.** Карактеризација тетрануклеотидних микросателитских локуса (преузето од Gross *et al.*, 2016)

**Табела 4.** Протокол ESHIPPO модела са параметрима за процену еколошке специјализације (ES) и утицаја HIPPO фактора, преузето и прилагођено према Simić *et al.*, (2007)

**Табела 5.** Индекс локалне прилагођености популација ракова (ILAP), параметри и бодовна скала, преузето и прилагођено према Simić *et al.*, (2015)

**Табела 6.** Бодовна скала ESHIPPO crayfish модела, преузето и прилагођено према Simić *et al.*, (2015)

**Табела 7.** Стандардизовани коефицијенти каноничке дискриминативне функције за морфометријске карактере мужјака и женки. Приказане су и сопствене вредности (Eigenvalue), проценат варијансе (% of Variance), кумулативни проценат варијансе (Cumulative%) и канонске корелације (Canonical R)

**Табела 8.** Основни параметри генетичког диверзитета популација речног рака

**Табела 9.** Списак локалитета, детектованих хаплотипова и припадност до сада описаним линијама/групама према Schrimpf *et al.* (2014) и Laggis *et al.* (2017)

**Табела 10.** Процене еволутивне дивергенције над паровима секвенци. Просечне вредности некоригованих  $p$ -дистанци унутар и између линија *A. astacus* за спојени сет секвенци (*COI* и *16S rRNA*)

**Табела 11.** Процене еволутивне дивергенције над паровима секвенци. Вредности опсега (минимум и максимум) некоригованих  $p$ -дистанци унутар и између линија *A. astacus* за спојени сет података (*COI* и *16S rRNA*)

**Табела 12.** Укупан број алела по локусу по популацији

**Табела 13.** Вредности интрапопулационе генетичке варијабилности. Плавом бојом су означене највише вредности, а црвеном бојом најниже.

**Табела 14.** Анализа молекуларне варијансе (AMOVA) преко матрица дистанци. Степен слободе (df), сума квадрата (SS), средњи квадрат (MS) и статистичка значајност ( $p$ )

**Табела 15.** Вредности генетичке удаљености ( $F_{st}$ ) за парове субпопулација, дијагонално лево и процењене вредности протока гена ( $N_m$ ), дијагонално десно. Плавом бојом су означене највише вредности, а црвеном бојом најниже.

**Табела 16.** Приказ бодовања елемената модела ESHIPPO crayfish за процену ризика изумирања и приоритета конзервације истраживаних популација речног рака



## Листа слика

**Слика 1.** Минијатура из друге половине XIV века која представља гозбу раковима тзв. „crayfish party” (преузето из Gherardi, 2011)

**Слика 2.** Речни рак *Astacus astacus*

**Слика 3.** Мапа истраживаних локалитета. Локалитети су означени бројевима, а њихови називи приказани су у Табели 1

**Слика 4.** Врша са средњим отварањем (Фото Н. Радојковић)

**Слика 5.** Ноћни лов ракова (Фото Ј. Радојковић)

**Слика 6.** Узорци за генетичке анализе (Фото С. Ђуретановић)

**Слика 7.** Мерене морфометријске карактеристике, скраћенице објашњене у тексту (преузето из Sint *et al.*, 2005)

**Слика 8.** Провера продуката амплификације гел-агарозном електрофорезом (Фото С. Ђуретановић)

**Слика 9.** Раздвајање популација мужјака речног рака према првој и другој дискриминантној функцији

**Слика 10.** Раздвајање популација женки речног рака према првој и другој дискриминантној функцији

**Слика 11.** Процентуална заступљеност детектованих хаплотипова у односу на укупан број анализираних секвенци

**Слика 12.** Филогенија врсте *A. astacus* генерисана коришћењем Бајесијанске анализе која је имплементирана у програму BEAST на спојеним *COI* и *16S rRNA* секвенцама. Бројеви на чворовима представљају вредности постериорне вероватноће (pp) изнад 0.5. Кодови хаплотипова, линија и група одговарају Schrimpf *et al.*, (2014, 2017), Laggis *et al.*, (2017) и подацима из дисертације (хаплотипови обележени тачкама)

**Слика 13.** Мрежа конструисана (енг. Median joining network) од спојених секвенци *COI* и *16S rRNA*. Број мутацијских корака је приказан изнад гране, осим када је једнак 1. Величина кругова је пропорционална фреквенцији представљеног хаплотипа. Кодови хаплотипова, линија и група одговарају Schrimpf *et al.* (2014, 2017), Laggis *et al.* (2017) и подацима из дисертације (хаплотипови обележени тачкама)

**Слика 14.** Анализа главних координата (PCoA)

**Слика 15.** Процењена популациона структура у хијерархијској STRUCTURE анализи микросателитске ДНК. Беле линије раздвајају анализирани популације. Након два корака идентификовано је 8 кластера. На слици је представљен и број генетичких кластера (K)

# **1. Увод**

Очување биолошке разноврсности је један од три главна циља Конвенције о биолошкој разноврсности (енг. Convention on Biological Diversity - CBD). Биолошка разноврсност је дефинисана као свеобухватна разноликост и различитост живих организама, укључујући, између осталог, копнене, морске и остале водене екосистеме и еколошке комплексе чији су део; ово подразумева диверзитет у оквиру врста, између врста и између екосистема (SCBD, 1992). Рецентни биодиверзитет се проучава на три нивоа - генетичком, специјском и екосистемском, али Међународна унија за конзервацију природе (енг. The International Union for Conservation of Nature - IUCN) наглашава круцијалну потребу очувања генетичког диверзитета као еволуционог потенцијала генетичких ентитета (Milankov, 2007) и као предуслов за дугорочни опстанак врсте (Souty-Grosset *et al.*, 2003; Malcolm *et al.*, 2007; Schrimpf *et al.*, 2011).

Очување интегритета аутохтоних врста/локалних специфичности је један од главних циљева конзервационе генетике (Souty-Grosset *et al.*, 2003). Како би се ово постигло неопходно је познавати генетичку структуру врсте. Данашња генетска структура је последица геоморфолошких, хидрографских и климатских промена у прошлости (Schrimpf *et al.*, 2014).

Нестанак врста и смањење биодиверзитета представљају најозбиљније глобалне последице угрожавања животне средине.

Акватични екосистеми су под интензивним антропогеним утицајем у смислу загађења, прекомерне експлоатације, модификације водотокова, деградације станишта и уноса инвазивних врста (Allan & Flacker, 1993; Revenga *et al.*, 2005; Dudgeon *et al.*, 2006; Richman *et al.*, 2015). Пад биодиверзитета је далеко већи у слатководним екосистемима него у најугроженијим терестичним екосистемима (Sala *et al.*, 2000), иако слатководни екосистеми чине само око 0,8% површине Земље и 0,01% светских вода, они су дом за скоро 6% од свих описаних врста (Dudgeon, 2006). У слатководним екосистемима међу најугроженијима су инвертебрати, попут шкољки (Geist, 2011) и слатководних ракова (Reynolds & Souty-Grosset, 2012).

Чак једној трећини слатководних ракова широм света прети ризик од изумирања (Richman *et al.*, 2015; Owen *et al.*, 2015). Европски ракови су суочени са значајним притисцима, пре свега од инвазивних врста и патогена и болести које оне носе. Када су у питању природне популације речног рака, забележено је опадање за 50-70% упркос његовој широкој географској дистрибуцији (Edsman *et al.*, 2010).

Очување биодиверзитета природних популација ракова је актуелно питање последњих деценија, посебно у Западној Европи, Аустралији и Северној Америци.

Упоредне анализе митохондријалног и нуклеарног генома дају најкорисније резултате за популационо генетичка истраживања и омогућавају директну примену резултата у управљању и конзервацији популација (Veličković, 2014), а имају и изузетан значај за заштиту биодиверзитета, посебно угрожених врста.

Развојем и сталним напретком метода молекуларне биологије омогућено је да се генетичка варијабилност природних популација проучава анализом варијабилности протеинских молекула и варијабилности на нивоу ДНК (Veličković, 2014). Развој ланчане реакције полимеразом (енг. **P**olymerase **C**hain **R**eaction - PCR), такозване PCR технологије, посебно је допринео овом напретку. Ова брза и једноставна метода умножавања одеђених делова ДНК из мале количине изворне ДНК, развијена је 80тих година XX века (Mullis *et al.*, 1986). Ланчана реакција полимеразом подразумева низ прецизних, цикличних промена температуре током којих се врши диригована синтеза дела ланца ДНК ограниченог прајмерима (Свијановић, 2016), а који се може умножити у милијарду копија.

Митохондријска ДНК је добар генетички маркер који се користи за анализе филогенетских и филогеографских односа (Schrimpf *et al.*, 2011, 2014, 2017), за праћење процеса настанка нових врста, те за таксономска разматрања (Crandall & De Grave, 2017) и у конзервационе сврхе (Schrimpf *et al.*, 2017). Разлог су њене карактеристике: лако се изолује, има једноставну генетску структуру, високу стопу мутације и матерински се наслеђује (Awise *et al.*, 1987; Awise, 1994). Ове карактеристике чине мтДНК широко употребљивим маркером за реконструкцију филогеографске историје врста и за реконструкцију еволутивних догађаја, а у комбинацији са нуклеарним маркерима за објашњавање миграција, интродукција и ефекта „уских грла” популација (Awise, 2000).

Микросателити су, такође, погодни молекуларни маркери. Ови кратки сегменти ДНК молекула сачињени од неколико узастопних мотива, кододоминантно се наслеђују и показују висок степен полиморфности, чак и у малим популацијама. Висок степен варијабилности узрокован је високом стопом мутација која мења дужину микросателита (Свијановић, 2016). Број поновљених мотива у

микросателитима често варира између јединки једне врсте и креће се у опсегу варирања карактеристичном за дати локус (Savić Pavićević & Matić, 2011).

Велики број алела који се налази у хиперваријабилним микросателитским локусима омогућава да се утврде разлике између популација и индивидуа исте врсте, посебно ако се анализира већи број локуса (Veličković, 2014). Микросателити се углавном користе при утврђивању популационе структуре, која у већој мери рефлектује савремене него предачке еволуционе односе (Hewitt, 2004), те за утврђивање интрогресије и као што је поменуто у комбинацији са митохондријалним маркерима за објашњавање миграција, интродукција и ефекат „уских грла” популација (Avisе, 2000). И они се лако изолују из било ког ткива.

## 1.1 О слатководним раковима

Прво помињање ракова у научној литератури налази се у Аристотеловој „Историји животиња” (грч. Τὸν περὶ τὰ ζῷα ἱστορίων) (Chidester, 1912). Од тог времена ракови су предмет зоолошких истраживања и често су коришћени као модел организми.

Слатководни ракови су оставили културолошки траг скоро свуда. Јављају се у изрекама, баснама и причама (Текст 1 у Прилогу), именима села и река, митологији, део су фолклора и сујеверја, посебно код скандинавских народа. Ракови су били извор инспирације за уметнике, па су чест мотив на сликама (Слика 1), чак на фрескама, а јављају се и као украси на зградама, палатама и у црквама. Културни значај ракова у историји појединих земаља доказује њихово појављивање на амблемима, грбовима, топонимима и презименима породица (Gherardi, 2011). Често су означени као „водеће врсте” и сматрају се делом културног наслеђа многих европских земаља (Füreder *et al.*, 2003; Svobodová *et al.*, 2012).

Ракови, а посебно речни рак, се користе у исхрани широм Европе још од средњег века (Gherardi, 2011). Са француске трпезе су прешли у Енглеску, а све је започело у манастирима где су их монаси користили у исхрани током поста, па су их за те потребе узгајали у манастирским рибањацима. Монаси су одговорни и за многе транслокације ракова, укључујући и преношење врсте *Austropotamobius pallipes*

(Lereboullet, 1858) из Француске у Ирску (Gouin *et al.*, 2003). Месо ракова је постало специјалитет који је био обавезан на тањирима аристократа у Немачкој током XV века, а тај обичај је пренет и у Норвешку и Шведску у XVI веку. Швеђани из средње класе су почели да их конзумирају од половине XIX века, а у XX веку ракови су постали њихов национални деликатес (Swahn, 2004; Gherardi, 2011).

До деветнаестог века, слатководни ракови су коришћени као лек против неколико болести, укључујући и канцер (Skurdal & Taugbøl, 2002). У медицинским књигама из XVI века постоје подаци да се сок добијен гњечењем женки ракова користи за олакшавање после порођајних болова и болова тешког рада, као лек за екцем, опекотине од сунца, против стомачних болова, болова срца, туберкулозе, епилепсије (Swahn, 2004).



Слика 1. Минијатура из друге половине XIV века која представља гозбу раковима тзв. „crayfish party” (преузето из Gherardi, 2011)

Они су највећи покретни, слатководни бескичмењаци (Holdich, 2002a) и индикатори су доброг квалитета вода (Pârvulescu *et al.*, 2011; Richardson, 2012). Живе у различитим екосистемима - потоцима, рекама, језерима, мочварама, а посебно воле станишта са приступачним склоништем. Склониште подразумева камење, потољене пањеве, корење, водену и обалску вегетацију, а када је то могуће у меким обалама копају јазбине и на тај начин остварују и физички утицај на животну средину (Correia & Ferreira, 1995). Углавном су ноктуралне животиње, које користе механо- и хеморецепторе да лоцирају храну, могуће предаторе и своје сроднике.

Слатководни ракови су познати као значајне компоненте биодиверзитета у потоцима, рекама, језерима, мочварама, са важном еколошком улогом у правилном функционисању слатководних екосистема (Holdich, 2002a; Gherardi, 2011) и кључном улогом у ланцима исхране (Nyström *et al.*, 1996; Usio & Townsend, 2004; Sint *et al.*, 2007; Zimmerman, 2012).

Ракови су омнивори и хране се разноврсно. Често су кључни организми у ланцима исхране, било да су потрошачи или плен (Momot, 1995; Covich *et al.*, 1999; Dorn & Wojdak, 2004), и тада имају велики утицај на структуру самих ланаца (Nyström, 1999). Током развића им се мења начин исхране. Јувенилне јединке се хране филтрацијом или стружу алге (Budd *et al.*, 1978), а млађе јединке се чешће хране животињском храном (Hill & Lodge, 1994; Momot, 1995). Док расту, адаптирају се на исхрану детритусом (Parkyn *et al.*, 1997; Lipták *et al.*, 2019), конзумирају биљке (Momot *et al.*, 1978), макроинертебрате (Ilhéu *et al.*, 2002), могу да се хране и пужевицама јер су способни да поломе љуштуре (Nyström & Pérez, 1998), једу јаја и ларве водоземаца (Axelsson *et al.*, 1997), а радо конзумирају и рибу и рибљу икру (Capelli, 1980; Westman *et al.*, 1986; Guan & Wiles, 1997, 1998; Forsythe *et al.*, 2018). У исхрани одраслих ракова присутнији су детритус и биљке (Kholodkevich *et al.*, 2005), а храни животињског порекла дају предност једино у периоду пресвлачења, размножавања и припреме за зиму.

Astacidae имају телесну грађу карактеристичну за све тзв. више ракове (класа Malacostraca). Тело им је хетерономно сегментисано и најчешће подељено на два региона: главеногрудни (лат. cephalothorax) и трбушни (лат. abdomen) регион. Главеногрудни регион настао је срастањем пет главених и осам грудних сегмената. На грудима (переион/перејон) се налази осам пари ногу, од којих су прва три пара



модификована у максилепеде и функционално су прикључени усном апарату, јер имају улогу у исхрани. Преосталих пет пари ногу, познате и као переиопеде, служи за кретање, с тим да су крајеви првог пара преображени у клешта. Код женки се полни отвор налази у основи трећег пара переиопода, а код мужјака у основи петог пара переиопода. Трбушни, абдоминални (плеон) регион се састоји од шест сегмената и на њему се налази пет пари ногу за пливање (плеопеде). Код женки је први пар плеопода редукован, а следећа четири пара служе за ношење јаја. Прва два пара плеопода код мужјака су преображени у органе за копулацију - гоноподе, а остала три пара се користе за пливање. Последњи, шести пар ногу је преображен код оба пола у уроподе које са телзоном чине репно пераје или репну лепезу (Holdich, 2002a).

Површина тела ракова покривена је чврстим егзоскелетом који спречава континуирани раст, па се раст одвија периодичним пресвлачењем егзоскелета (Reynolds, 2002). То је сложен процес који укључује синтезу протеина и пролиферацију ћелија између пресвлачења, а затим и нагли пораст дужине и тежине тела након пресвлачења (Jussila & Evans, 1996). Пресвлачење егзоскелета јако утиче на животни циклус ракова, на избор станишта, исхрану, интраспецијске и интерспецијске односе, а одређује и време и начин размножавања. Циклус пресвлачења је под контролом хормона и спољашње температуре, и захтева прилагођавање свих ткива и органа у телу. Минерализација егзоскелета након пресвлачења зависи од расположиве количине калцијума у животној средини и делимично од калцијума у храни (Wheatly & Gannon, 1995).

Размножавање се одвија између пресвлачења, условљено је хормонима, а зависи и од спољашњих чинилаца од којих су најважнији температура и дужина дана (Taugbøl & Skurdal, 1992). Чврсти егзоскелет онемогућује унутрашње оплођење, па мужјак рака преноси пакетиће сперматозоида (сперматофоре) и лепи их на вентралну страну абдомена женке. Неколико дана касније долази до мрешћења и оплодње (Reynolds, 2002). Мужјаци и женке се приликом потраге за партнером ослањају на тактилна чула. Углавном мужјаци бирају женке, али је забележено да су и женке избирљиве, па избегавају мање мужјаке и оне без клешта. Током сезоне парења присутна је конкуренција између мужјака, пре и након копулације, при чему већи мужјаци нападају и убијају мање мужјаке. Размножавање се одвија у јесен, а женке носе јаја до пролећа када се излегу јувенилне јединке сличне одраслима (Holdich, 2002a).

Слатководни ракови су таксономски распоређени у три фамилије. Представници фамилија Astacidae и Cambaridae насељавају северну хемисферу, док представници фамилије Parastacidae имају ограничену дистрибуцију на јужној хемисфери и насељавају екосистеме на Мадагаскару, југу Јужне Америке и Аустралозији (Holdich, 2002b). Констатовано је више од 640 познатих врста ракова, при чему је највећа разноврсност забележена у Северној Америци и Аустралији, док је у Европи разноврсност врло ниска (Crandall & Buhay 2008).

Фамилија Astacidae је распрострањена у Европи и на западу Сједињених Америчких Држава. Европу насељава пет врста у оквиру три рода. Врсте рода *Astacus* и *Pontastacus* су распрострањене од западне Француске до Урала, укључујући и јужну Скандинавију, а рода *Austropotamobius* од централне Шпаније до Балкана, укључујући и Британска острва. Роду *Astacus* припада речни или племенити рак – *Astacus astacus* (Linnaeus, 1758), а барски рак – *Pontastacus leptodactylus* (Eschscholz, 1823) и *Pontastacus pachypus* (Rathke, 1837) припадају роду *Pontastacus* (Crandall & De Grave, 2017), док роду *Austropotamobius* припадају поточни рак – *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803) и белоноги рак – *Austropotamobius pallipes* species complex (Grandjean *et al.* 2006). Осим аутохтоних врста ракова, у европским слатководним екосистемима живе и алохтоне врсте (Holdich *et al.*, 2002b, 2009; Chucholl & Pfeiffer, 2010). То су америчке врсте *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852), *Orconectes limosus* (Rafinesque, 1817) и *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) и неке врсте аустралијског рода *Cherax*, попут врсте *Cherax quadricarina* (Von Martens, 1868) (Jaklič & Vrezec, 2011), које су унете због узгоја у аквакултури, или као акваријумске врсте.

Широм света је констатовано смањење популација ракова, чак изумирање појединих врста, што неминовно утиче и на други живи свет у води, као и на саме водене екосистеме. Узрок су промене и деградација станишта, различите врсте загађења и друге промене у животној средини које су последица активности човека (Taylor, 2002; Holdich *et al.* 2009; McGeoch *et al.*, 2010). Највећом претњом диверзитету ракова се сматрају интродуковане, алохтоне врсте (Twardochleb *et al.*, 2013; Makkonen *et al.*, 2015; Maguire *et al.*, 2018) и паразити и болести које ове врсте носе (Edgerton *et al.*, 2004; Jussila & Manonen, 2004; Kokko *et al.*, 2012; Filipova *et al.*, 2013). Управо су човековом активношћу многе врсте померане изван свог природног ареала распрострањења. Тако је и са раковима који су из Северне Америке преношени у Европу због гајења у астакикултури (Hobbs *et al.*, 1989; Kozák *et al.*, 2007). Ракови

су дуго били и мета излова у Европи, јер су цењена храна, па су гајени у астакикултури, али је та индустрија сада знатно смањена.

## 1.2 Племенити рак *Astacus astacus* (Linnaeus, 1758)

Речни или племенити рак је аутохтона европска врста (Слика 2). Ретко је већи од 150 mm укупне дужине, али пријављивани су и примерци од 170 mm и 270 g (Westman *et al.*, 1992). Тело је обично тамно браон обојено (понекад и црно, плавичасто или црвенкасто) са леђне стране, а маслинасто-браон са трбушне стране. Карапакс је гладак без трнова, али са малим зрнастим израштајима са стране. Као и сви представници рода *Astacus* има два пара посторбиталних гребена од којих је први јаче изражен, а иза цервикалне бразде се налази ред ситних избочења, обично са само једним јаче израженим тупим трном. Рострум је добро развијен, раван са глатким рубовима. Апекс рострума је истакнут и доста дугачак. Рубови абдоминалних плеура су заобљени и без трнова. Клешта су велика и широка, са брадавичастом површином. Непокретни прст, на унутрашњем рубу, има удубљење које је ограничено са два зуба. Код женки и јувенилних примерака ово удубљење је слабо изражено, а код регенерисаних клешта обично сасвим недостаје (Holdich, 2002a).



Слика 2. Речни рак *Astacus astacus*  
(извор: <https://heis.vuv.cz>)

Ареал распрострањења речног рака је од Русије и Украјине на истоку, до Уједињеног Краљевства и Француске на западу, од Финске, Шведске и Норвешке на северу до Грчке на југу (Edsman *et al.*, 2010). Некада је био врло распрострањен на Балканском полуострву и у Европи (Kouba *et al.*, 2014). Вероватно је више од 2000 година био предмет размене, трговине и зоолошких истраживања (Schrimpf, 2013). Временом му се образац дистрибуције значајно изменио, највише због утицаја човека. Популације су му десетковане након уноса рачије куге средином XIX века. Губитак станишта и загађење значајно су допринели смањењу популација у оквиру ареала распрострањења (Holdich, 2002b; Füreder *et al.*, 2006; Simić *et al.*, 2008; Holdich *et al.*, 2009; Kouba *et al.*, 2014; Maguire *et al.*, 2018), али укупна људска активност, у виду транслокација и реинтродукција, како аутохтоних, тако и алохтоних врста ракова, довела је до разбијања природне генетичке структуре врсте, до мешања и губитка популација широм Европе (Souty-Grosset & Reynolds, 2009; Schrimpf *et al.*, 2011, 2014; Gross *et al.*, 2013, 2016; Makkonen *et al.*, 2015). На популације ракова лоше је утицао и прекомерни излов, чак и криволов, а директан утицај огледа се и у чињеници да је речни рак позната комерцијална врста која се користи у људској исхрани, чак је и спортско-риболовно атрактивна врста (Skurdal & Taugbøl 2002; Sint & Füreder 2004; Jussila & Mannonen, 2004; Makkonen *et al.*, 2015). Према Ackefors (1998) укупна производња речног рака у астацикултури у Европи 1994. године била је око 27 тона (Gross *et al.*, 2016).

На Црвеној листи угрожених врста Међународне уније за очување природе (енг. the International Union for Conservation of Nature Red List of Threatened species- IUCN Red List – IUCN Red List) племенити речни рак је класификован као „рањива врста” са трендом смањења броја популација и субпопулација и смањења ареала распрострањења. На неким националним Црвеним листама је класификован као „угрожена врста”, што је случај у Чешкој, Немачкој и Норвешкој на пример, или као „критично угрожена врста” у Шведској (Schrimpf *et al.*, 2011). У Србији има статус „строга заштићене врсте” по Правилнику о проглашењу и заштити строго заштићених и заштићених дивљих врста биљака, животиња и гљива (Službeni glasnik RS, 2016). Заштићен је и Бернском конвенцијом, Прилог III (Конвенција о очувању европске дивље флоре и фауне и природних станишта), Европском директивом о стаништима, Прилог V, и Директивом 92/43/ЕЕС Савета Европске уније о очувању природних станишта и дивље фауне и флоре.

### 1.3 Преглед литературе

Прве студије о биогеографији и таксономији речног рака су засноване на морфолошким карактеристикама (Karaman S. 1929; Bott 1950, 1972; Karaman M. S., 1961, 1962, 1963; Albrecht 1983).

Sint *et al.* (2005) имплементирали су мултиваријантне статистичке методе у истраживању морфометрије европских ракова. У свом раду користили су 21 морфометријску варијаблу за дискриминацију између популација *A. pallipes* и *A. astacus* из Тиролског региона (Аустрија).

Sint *et al.* (2007) спровели су фенотипску карактеризацију *A. pallipes*, *A. torrentium* и *A. astacus* из аустријских и италијанских делова Тирола. Применом хијерархијске кластер анализе и дискриминантне анализе, било је могуће сагледати диференцијацију између популација и између врста и идентификовати јединице управљања у Тиролском региону.

Прва молекуларна техника која се користила за анализу генетичке варијабилности међу декаподним раковима је разноликост алозима. Albrecht & Von Hagen (1981) су анализирали мишићне протеине из клешта шест врста ракова: *A. astacus*, *A. leptodactylus*, *A. pallipes*, *A. torrentium*, *P. leniusculus*, *O. limosus* диск електрофорезом, односно техником раздвојених гелова. Електрофоретски узорак није показао генетичку варијацију унутар врста.

Прва молекуларна истраживања речног рака била су ограничена само на уска географска подручја (Fevolden & Hessen, 1989; Agerberg 1990; Fevolden *et al.*, 1994; Schulz 2000; Edsman *et al.*, 2002; Schulz *et al.*, 2004; Alaranta *et al.*, 2006).

Студија Edsman *et al.* (2002) је открила варијације сличне микросателитима унутар rDNA-ITS1 регије и детектован је генетички диверзитет између истраживаних популација. Међутим, rDNA-ITS1 регија је део гена са више копија и не може бити третиран као кодоминантни Менделов маркер (Harris & Crandall, 2000).

Kõiv *et al.* (2008, 2009) су развили прве микросателитске (енг. **S**imple **S**equence **R**epeats - SSR) маркере за речног рака који су касније примењени у неколико студија генетичког диверзитета (Gross *et al.*, 2013; Schrimpf *et al.*, 2014; Bláha *et al.*, 2016; Laggis *et al.*, 2017). Прво велико популационо генетичко истраживање речног рака на

основу десет новоразвијених микросателитских маркера урадили су Gross *et al.* (2013). Идентификоване су две високо диференциране популационе групе које одговарају сливовима Балтичког мора и Црног мора, с тим да је у популацијама из слива Балтичког мора детектована знатно мања генетичка варијабилност и мањи број приватних алела него у популацијама из црноморског слива.

Након тога су Gross *et al.* (2016) развили нове тетрануклеотидне микросателитске маркере погодне за мултиплекс тест и за откривање хибрида између речног и барског рака. Мултиплекс тест дизајниран у овој студији може се успешно применити у истраживањима која захтевају генетичко разрешавање, као што су структурирање популације, анализа сродности и идентификација рачијег фонда, те за генетичко управљање фондом речног рака у заточеништву (избор сојева, планирање парења, избегавање размножавања у сродству).

Schrimpf *et al.* (2011) су урадили прву велику студију генетичке разноликости популација речног рака у сливовима Црног, Северног и Балтичког мора засновану на анализи *COI* гена митохондријалне ДНК. Један заједнички хаплотип је пронађен широм истраживаног подручја, али високе фреквенце приватних хаплотипова детектоване су у свим главним сливовима великих река и указују на диференцијацију популација широм Европе, упркос опсежним транслокацијама које су последица људске активности. Већа хаплотипска разноликост и број приватних хаплотипова детектован је у сливу Црног мора у поређењу са сливом Северног мора и сливом Балтичког мора што сугерише да је током последње глацијације речни рак нашао уточиште на Балкану. И у студији Makkonen *et al.* (2015) испитивана је генетичка разноврсност 59 популација из Финске и Естоније, такође, на *COI* гену митохондријалне ДНК. Детектован је само један хаплотип који је потврдио изузетно низак генетички диверзитет истраживаних популација. Резултати студије су потврдили изузетно мали генетички диверзитет речног рака у северним деловима ареала распрострањења.

Schrimpf *et al.* (2014) су реконструисали филогеографску историју речног рака. Митохондријални и нуклеарни маркери открили су генетски релативно хомогену популацију у централној Европи. У неким подручјима детектована је изразита генетичка структура појединих популација са ендемским хаплотиповима и приватним алелима, који указују да су та подручја била рефугијуми речног рака у

централној Европи и да ове популације нису биле подложне антропогеним транслокацијама. Највећи генетички диверзитет откривен је у сливу Црног мора, а констатована је и велика разлика у диверзитету између популација са западног Балкана и преосталих популација које припадају сливу Црног мора. Њихови резултати указују на постојање најмање два плеистоценска рефугијума у југоисточној Европи.

Студија Laggis *et al.* (2017) је потврдила мтДНК линије које је описала Schrimpf *et al.* (2011, 2014) и утврдила постојање још две линије у Грчкој, на југу Балканског полуострва. Линије у Грчкој су показале веће хаплотипско богатство у односу на већ описане. Ова студија је још једном потврдила да је најјужнији део Балканског полуострва играо важну улогу као глацијални рефугијум и место са кога је речни рак реколонизовао северне регионе.

Генетичка разноликост природних популација речног рака на северозападу Пољске на основу комбинованих података SSR и AFLP (енг. Amplified Fragment Length Polymorphism) представљена је у студији Panicz *et al.* (2019).

Sint & Furader (2004) су представили конзервациони програм реинтродукције речног рака у Источни Тирол (Аустрија) након рестаурације потока. Програм је подразумевао различите специфичне мере заштите, укључујући узгој и обнављање популације младих и адултних јединки речног рака. Студија Raaver & Hurt (2009) говори о статусу популација речног рака у Естонији и њиховом управљању. Студија Jussila *et al.* (2008) детаљно говори о пројекту поновног увођења речног рака у реку Пихајоки у Западној Финској и проблемима са којима су се суочили (рачија куга, недостатак падавина и суша). Kozák *et al.* (2011) су покушали да сумирају најбоље праксе конзервационих стратегија, као и предности и недостатке примењених алата и приступа за наведене врсте или комплексе врста.

Wláha *et al.* (2016) су истраживали ефекат оснивача и његов утицај на генетичку варијабилност транслоцираних популација речног ракова. У студији Skuza *et al.* (2016) урађена је молекуларна карактеризација популација речног рака из Померанских језера северозападне Пољске заснована на генима митохондријалне ДНК.

### 1.3.1 Преглед литературе истраживаног подручја

Први подаци о истраживањима слатководних ракова на територији Балканског полуострва су радови Станка Карамана (1929) и Младена Карамана (1961, 1962, 1963). Ове студије о биогеографији и таксономији ракова су засноване на морфолошким карактеристикама.

После више од четири деценије Simić *et al.* (2008) су објавили рад о дистрибуцији декаподних ракова на територији Србије и Црне Горе, њиховој популационој структури и степену угрожености. Студија је показала да је речни рак најугроженија врста на истраживаном подручју због деградације станишта, загађења и болести. Испоставило се и да га барски рак потискује и замењује у неким стаништима. Према подацима, подручје које је насељавао речни рак на територији Србије смањено је за више од 65% у периоду од 1960. до 2006. године. Сходно претходно поменутом, речни рак је класификован као „строго заштићена врста” у слатководним екосистемима Србије.

Rajković (2012) је урадила докторску дисертацију о дистрибуцији, филогенији, екологији и конзервацији ракова из фамилије Astacidae на подручју Црне Горе. У анализираном узорку имала је и популацију речног рака из акумулације Бусур (Р. Србија) за коју су филогенетске анализе на митохондријалном *COI* гену показале да је јединствен хаплотип/хаплогрупа, који је еволуционо старији у односу на друге хаплотипове на Балкану и у Европи. Ауторка наводи популацију речног рака из акумулације Бусур као еволуционо значајну јединицу - ESU на подручју Црне Горе и Србије. Исти закључци су изнети и у студији Petrović *et al.* (2013). Аутори износе потребу о хитним мерама заштите популација речног рака на територији Србије.

Simić *et al.* (2015) су развили стратегију очувања популација ракова из породица Astacidae који живе у воденим екосистемима Централног Балкана (територије Србије и Црне Горе). Модификовали су ESHIPPO модел дизајниран за процену ризика изумирања и дефинисање приоритета очувања/конзервације угрожених врста у воденим екосистемима на локалном и националном нивоу (Simić *et al.* 2007, 2015) увођењем генетичких, морфолошких и елемената структуре популације. Њихови резултати указују да генетички елементи играју важну улогу у коначној процени ризика изумирања и дефинисања приоритета очувања/конзервације на локалном и националном нивоу.



Đuretanović *et al.* (2017) су објавили студију о морфометријским варијацијама између популација речног рака са подручја Балкана. Резултати ове студије показују јасну разлику између популација из различитих водених екосистема и одражавају географску раздвојеност.

У Словенији су прве студије о раковима везане за дистрибуцију. Machino (1997) је у оквиру биогеографске студије о раковима у горњој Сочи и Сави Долинки констатовао три врсте: *A. torrentium*, *A. pallipes* и *A. astacus*. Bedjanič (2004) објављује нове налазе *A. torrentium* на територији Словеније, а Jaklič & Vrezec (2011) пријављују прву тропску врсту *Cherax quadricarinatus* у водама Европе. У неколико студија (Simčič *et al.* 2012a, 2012b, 2014) је тестирана применљивост електрон-транспортног система (енг. electron transport system - ETS) као средства за нелеталну процену метаболичке активности код слатководних ракова. Trontelj *et al.* (2005) су покушали да разјасне филогенетске и филогеографске односе у оквиру рода *Austropotamobius* на читавом ареалу распрострањења уз помоћ *COI* гена митохондријалне ДНК.

Студија Mrugała *et al.* (2017) сумира историјске и тренутне податке о дистрибуцији ракова у Албанији и суседним земљама, и даје увид у генетичку варијабилност речног рака у водама Албаније.

## **2. Циљеви истраживања**

Циљеви овог рада су следећи:

- ❖ примена методе класичне морфометрије у анализи морфолошке варијабилности популација врсте *A. astacus* на истраживаном подручју,
- ❖ филогенетичко истраживање популација врсте *A. astacus* анализом *16S rRNA* и *COI* гена митохондријалне ДНК,
- ❖ процена нивоа диференцијације популација и стање истраживаних популација анализом нуклеарних маркера - микросателита,
- ❖ процена ризика изумирања применом ESHIPPO crayfish модела (Simić *et al.*, 2015) и одређивање приоритета заштите на истраживаном подручју и
- ❖ предлог стратегије конзервације врсте *A. astacus*.

### **3. Материјал и методе**

### 3.1 Истраживано подручје и његове карактеристике

Целокупна теренска истраживања у оквиру ове докторске дисертације обављена су у периоду од 2013. до 2015. године. Речни рак је узоркован на 15 локалитета (Табела 1 и Слика 3) у потоцима, рекама, језерима и акумулацијама Србије и Словеније, а једна популација је узоркована на Преспанском језеру у Албанији (Табела 1). Локалитети у Србији су: река Лепеница, Петровачка река, Реснички поток, Милошев рибњак, река Качер, Козељска река и акумулације: Гружа, Бусур, Кореница, Грлиште, Газиводе. У Словенији је узорковано на Кочевској реци, језеру Блед и вештачком језеру Блоке. На истраживаном подручју су прикупљени подаци за морфометријске анализе и узорци за генетичке анализе.

**Табела 1.** Списак истраживаних локалитета

Локалитети	Држава	Водени ток/Река	Координате
1. Језеро Блед	Словенија	Сава/Дунав	46.364N 14.094E
2. Акумулација Блоке	Словенија	Сава/Дунав	45.786N 14.516E
3. Кочевска река	Словенија	Купа/Дунав	45.573N 14.797E
4. Река Качер	Србија	Сава/Дунав	44.222N 20.280E
5. Козељска река	Србија	Сава/Дунав	44.211N 20.366E
6. Реснички поток	Србија	Велика Морава/Дунав	44.090N 20.937E
7. Петровачка река	Србија	Велика Морава/Дунав	44.052N 20.878E
8. Река Лепеница	Србија	Велика Морава/Дунав	43.962N 20.811E
9. Милошев рибњак	Србија	Велика Морава/Дунав	44.092N 20.849E
10. Акумулација Гружа	Србија	Велика Морава/Дунав	43.933N 20.683E
11. Акумулација Бусур	Србија	Велика Морава/Дунав	44.236N 21.393E
12. Акумулација Кореница	Србија	Велика Морава/Дунав	44.228N 21.413E
13. Акумулација Грлиште	Србија	Тимок/Дунав	43.812N 22.232E
14. Акумулација Газиводе	Србија	Велика Морава/Дунав	42.942N 20.648E
15. Преспанско језеро	Албанија	Охридско језеро/Дрим	40.865N 20.944E

### **3.1.1 Река Лепеница и њене притоке, Петровачка река и Реснички поток**

Лепеница је највећа река Крагујевачке котлине и једна од већих река у Шумадији. Лева је притока Велике Мораве. Извире на огранцима Гледићких планина у Голочелу из извора Студенац на 380 m надморске висине. Дугачка је 55,4 km, а површина слива је 640 km<sup>2</sup>. Лепеница је позната као река сиромашна водом чије је отицање неравномерно и са великим колебањем током године, а може чак и да пресуши (Milanović, 2007).

Има 28 притока у Крагујевачкој котлини, 17 левих и 11 десних. Од левих притока значајне су Петровачка и Драчка река, а од десних Грошничка река и Ждралица (Stapanović, 1974; Gavrilović & Đukić, 2002).

Петровачка река је највећа и најдужа лева притока Лепенице. Извире у Рамаћи испод Божурове главице на 620 m надморске висине. Дугачка је 35 km. Позната је као река са више имена: Изворчић, Паштрмски поток, Рамаћка река, Кутловачка река, а у Крагујевачкој котлини је зову Угљешница до саставка са Лимовцем, одакле носи назив Петровачка река (Stapanović, 1974).

Реснички поток је лева притока реке Лепенице. Дугачак је 10,4 km (Milanović, 2007).

### **3.1.2 Река Качер и Козељска река**

Река Качер је десна притока Љига у који се улива у атару Бранчића. Настаје у Драгољу од Босуте и Букуље. Дужина тока је 30 km. По реци је названа и област у њеном сливу. Козељска река је њена притока (Gavrilović & Đukić, 2002).

### **3.1.3 Акумулација Гружа**

Акумулационо језеро Гружа је настало преграђивањем средњег тока реке Груже која је једна од најдужих (дуга је 77 km) и водом најбогатијих река Шумадије (Stanković, 2000). Налази се 20 km југоисточно од Крагујевца, на надморској висини од 269 m и има површину од 934 ha. При највишем водостају дужина акумулације износи око 10 km, а ширина варира од 0,2 до 1,5 km. Просечна дубина акумулације је

6,3 m, а највећу дубину има код бране, око 31 m. Акумулација је вишенаменска, али њена основна улога је снабдевање водом становништва у региону (Џомић & Остојић, 2005).

Акумулација Гружа је под великим антропогеним утицајем због интензивне обраде околног земљишта употребом инвазивних агротехничких мера, али и због изграђеног моста преко акумулације на магистралном правцу Крагујевац - Чачак.

### **3.1.4 Акумулације Бусур и Кореница**

Акумулација Бусур је изграђена на реци Бусур која је притока реке Млаве. Акумулација Кореница налази се на реци Кореници и формирана је изградњом бране током 1968/69. године. Река Кореница је десна притока реке Бусур. Обе акумулације су формиране због потребе да се заштити низводно подручје од поплава (Službeni glasnik RS, 2010).

### **3.1.5 Акумулација Грлиште**

Акумулација Грлиште настала је изградњом бране на Грлишкој реци, највећој левој притоци Белог Тимока. Грлишка река настаје спајањем Леновачке и Ласовачке реке испред села Лесковца и представља систем бујичних токова који прикупља воду са планина Тупижнице и Лисоваче. Запремина акумулације при коти максималног водостаја је 12 милиона m<sup>3</sup>, а захвата површину од 110 хектара. Налази се на 187 m надморске висине. Просечна дубина воде у акумулацији је 6 m, а максимална дубина је 22 m непосредно пре бране. Основна улога акумулације је снабдевање водом Зајечара, који је удаљен 16 km од ње (Gavrilović & Đukić, 2002; Gavrilović *et al.* 2014).

### **3.1.6 Акумулација Газиводе**

Акумулација Газиводе формирана је прављењем насипне бране у Газиводској клисури, у горњем току реке Ибар. Укупна висина бране је 107 m, што је чини једном од највећих у Европи. Акумулација површине око 1190 ha налази се на надморској

висини од 694 m, а дужина јој је 22 km. Акумулација прихвата воду из Ибра, Црне и Чечевске реке, али и мањих притока са планина Мокра Гора и Рогозна.

Акумулација Газиводе је вишенаменска, а једна од намена јој је и снабдевање становништва водом за пиће (Urošević, 1993).

### **3.1.7 Језеро Блед и вештачко језеро Блоке**

Језеро Блед је типично минијатурно, субалпско језеро глацијално-тектонског порекла. Налази се у северозападном делу Словеније у Јулијским Алпима. Простире се на површини од 1,4 km<sup>2</sup> са максималном дужином од 30,1 m и просечном дужином од 17,9 m (Sketelj & Rejić, 1958)

Вештачко језеро Блоке (Блошко језеро) је мало језеро на надморској висини од 310 m, максималне дубине 3 m. Настало је преграђивањем потока.

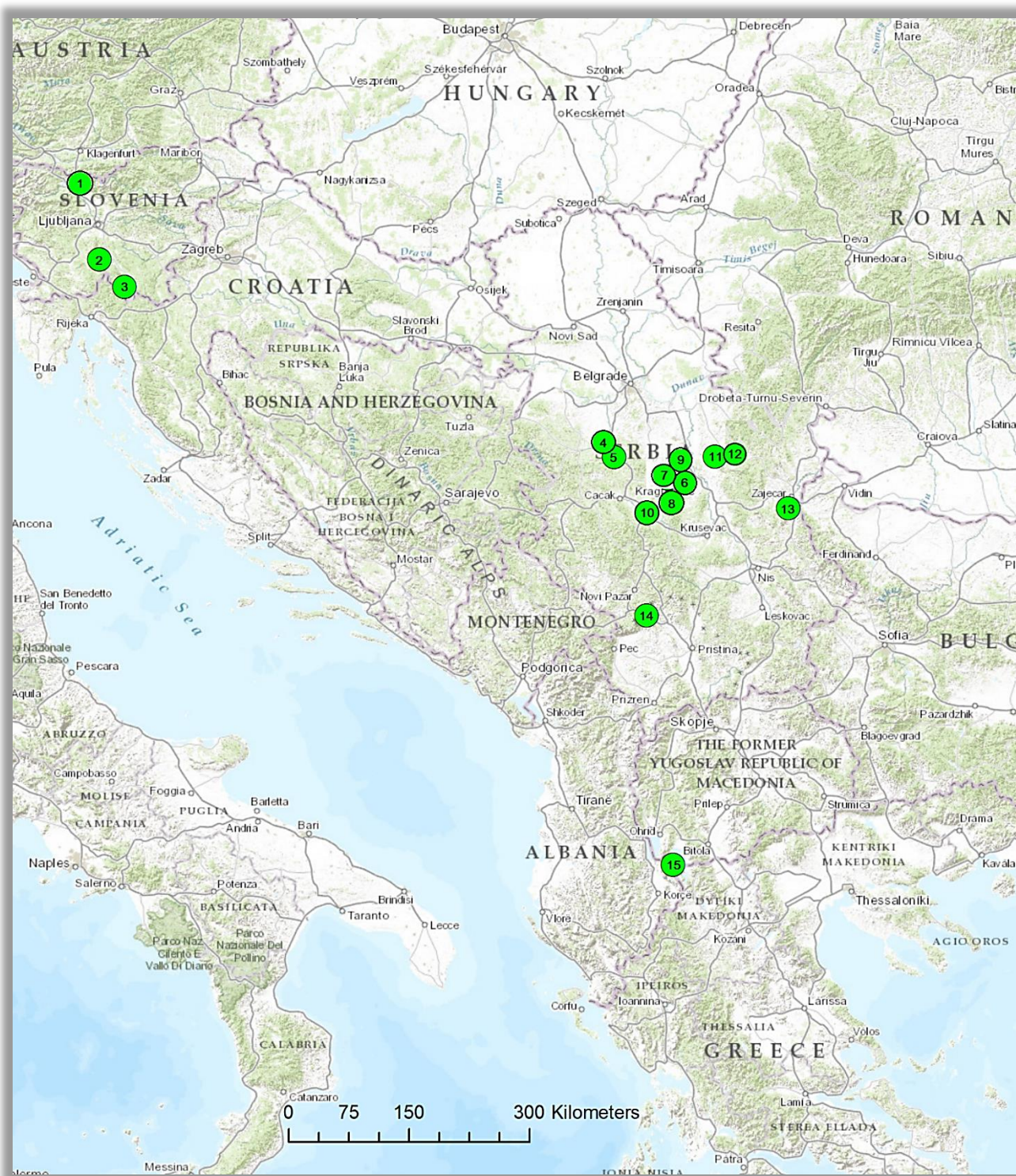
### **3.1.8 Преспанско језеро**

Преспанско језеро се налази у југоисточној Европи и чине га два језера, Велика Преспа и Мала Преспа (Leng, 2013). Сматра се да је језеро настало у оквиру тектонског гребена у Плиоцену (Aliaj *et al.*, 2001). Главна притока у Македонији му је Голема река (Albrecht *et al.*, 2012). Велика Преспа се налази на 849 m надморске висине и простире се на површини од 273 km<sup>2</sup>, док је Мала Преспа на 857 m надморске висине и простире се на површини од 47 km<sup>2</sup>. Највећа дубина језера је 54 m, док је средња дубина између 14 и 19 m (Matzinger *et al.*, 2006; Wilke *et al.*, 2010). Велика Преспа се простире на територији Албаније, Македоније и Грчке, а Мала Преспа се највећим делом налази на територији Грчке, а малим делом у Албанији. Језера су смештена на јужној страни Преспанске котлине између планине Галичице и планине Баба.

Претпоставља се да је Преспанско језеро остатак великог језерског система који се некада састојао од Охридског језера и недавно исушеног језера Малик (Hollis & Stevenson, 1997). Вода из Преспанског језера се улива у Охридско језеро кроз



систем крашких канала јер се Преспанско језеро налази на око 150 m већој надморској висини од Охридског језера.



Слика 3. Мапа истраживаних локалитета

### 3.2 Узорковање

Ракови су ловљени пластичним вршама са средњим отварањем (Слика 4), ручно, или комбинацијом ових техника. Вршама је ловљено у језерима и у дубоким деловима река. Врше са мамцем (покварено месо) су постављане у сумрак, а подизане су ујутру. Ручно је ловљено (Слика 5) у сумрак или ноћу уз помоћ лампе и ручне мрежице. Ловљено је по принципу максималног могућег излова.



Слика 4. Врша са средњим отварањем  
(Фото Н. Радојковић)

Сви уловљени примерци су идентификовани до нивоа врсте по Holdich (2002a) и одређен им је пол. Неповређене јединке, без знакова регенерације, су измерене за потребе класичне морфометрије. За генетичке анализе од сваке јединке узета је переиопода која је чувана у стерилној бочици (Слика 6) у 96% етанолу за накнадну изолацију ДНК (дезоксирибонуклеинска киселина). Након мерења и узорковања јединке су враћене на место са кога су изловљене. Узорковане переиоподe се регенеришу после неколико пресвлачења.



**Слика 5.** Ноћни лов ракова  
(Фото Ј. Радојковић)



**Слика 6.** Узорци за генетичке анализе  
(Фото С. Буретановић)

### 3.3 Морфометријске анализе

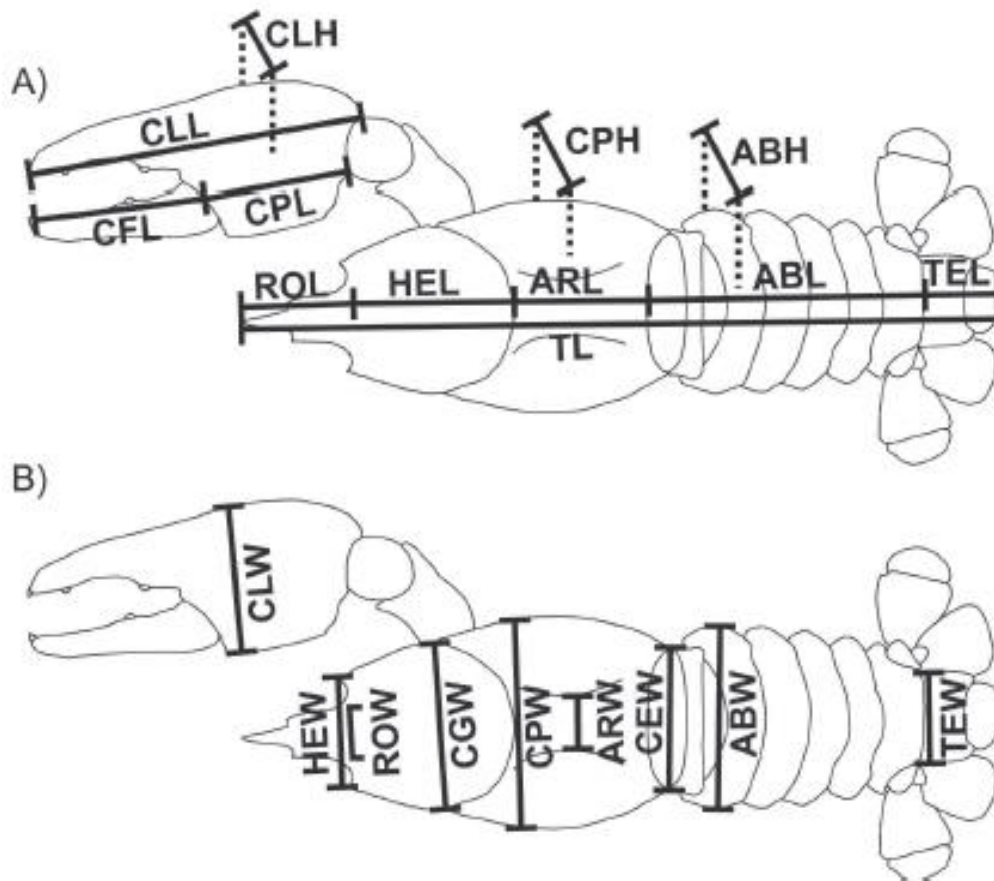
Морфометријском анализом обухваћено је десет популација речног рака: седам популација из Србије, две популације из Словеније и једна популација из Албаније. Укупно је анализирано 308 јединки, односно 179 мужјака и 129 женки (Табела 2).

**Табела 2.** Истраживани локалитети и број јединки (женке ( $N_f$ ) и мужјаци ( $N_m$ )) по популацији

Локалитети/Популације	Број јединки		
	$N_f$	$N_m$	Укупно
Реснички поток, СРБ	58	34	92
Петровачка река, СРБ	10	23	33
Река Качер, СРБ	3	15	18
Акумулација Кореница, СРБ	8	5	13
Акумулација Грлиште, СРБ	6	9	15
Акумулација Газиводе, СРБ	8	16	24
Милошев рибњак, СРБ	12	8	20
Кочевска река, СЛО	3	12	15
Река Блошчица, СЛО	5	19	24
Преспанско језеро, АЛБ	16	38	54
Укупно	129	179	308

Популације са мање од седам јединки су искључене из анализа.

За потребе класичне морфометрије мерене су само полно зреле јединке (укупне дужине тела  $>70$  mm) (Sint *et al.*, 2007). Мера је по 21 морфометријски карактер (Слика 7) помоћу нонијуса (изражен у mm, тачности  $\pm 0.01$  mm) према Sint *et al.* (2005): тотална дужина (TL - енг. **t**otal **l**ength), дужина рострума (ROL - енг. **r**ostrum **l**ength) и ширина рострума (ROW - енг. **r**ostrum **w**idth), дужина главе (HEL - енг. **h**ead **l**ength) и ширина главе (HEW - енг. **h**ead **w**idth), дужина ареоле (ARL - енг. **a**reolar **l**ength) и ширина ареоле (ARW - енг. **a**reolar **w**idth), дужина абдомена (ABL - енг. **a**bdomen **l**ength), ширина абдомена (ABW - енг. **a**bdomen **w**idth) и висина абдомена (ABH - енг. **a**bdomen **h**eight), дужина телзона (TEL - енг. **t**elson **l**ength) и ширина телзона (TEW - енг. **t**elson **w**idth), ширина карапакса (CPW - енг. **c**arapace



Слика 7. Мерене морфометријске карактеристике, скраћенице објашњене у тексту (преузето из Sint *et al.*, 2005)

width), ширина у нивоу цервикалног жлеба (CGW - енг. cervical groove width), ширина карапакса на задњем рубу (CEW - енг. carapace at the hind edges width), висина карапакса (CPH - енг. carapace height), дужина клешта (CLL - енг. claw length), ширина клешта (CLW - енг. claw width), висина клешта (CLH - енг. claw height), дужина длана клешта (CPL - енг. claw palm length), дужина прста клешта (CFL - енг. claw finger length). Свакој јединки је премерена и тежина која је изражена у грамима.

Како би се умањио утицај значајног варирања TL на резултате, урађена је нормализација овог параметра према Sint *et al.* (2005). Нормализација за дужину се добија дељењем морфометријских карактера са одговарајућом посторбиталном дужином:

$$POL = HEL + ARL$$

### 3.3.1 Статистичка анализа морфометријских података

Све статистичке анализе (*t* test, One-way ANOVA (Post-hoc Bonferroni), multivariate discriminant analysis) урађене су у софтверском пакету СПСС (енг. Statistical Package for the Social Sciences - SPSS) (SPSS Inc., Chicago, USA).

## 3.4 Генетичке методе

У овој докторској дисертацији филогенетичка структура популација и филогеографска анализа је заснована на варијацијама секвенци гена митохондријске ДНК. Коришћена су два молекуларна маркера, ген који кодира субјединицу I цитохром оксидазе митохондријске ДНК (енг. *COI* mtDNA) и ген који кодира 16S регион рибозомалне РНК (енг. *16S rRNA*). Ови гени су одабрани јер су већ коришћени у истим или сличним истраживањима и у банци гена (енг. GenBank) постоје депоноване секвенце (Schrimpf *et al.*, 2011, 2014, 2017; Laggis *et al.*, 2017) са којима се могу упоредити резултати добијени у докторској дисертацији. За популационе анализе рађена је амплификација 19 микросателитских локуса (Gross *et al.*, 2016).

### 3.4.1 Изолација геномске ДНК, PCR амплификација, гел електрофореза, секвенцирање гена мтДНК и микросателитска генотипизација

Изолација ДНК и амплификација истраживаних митохондријалних гена рађена је у Лабораторији за генетику Зоологијског завода, Биолошког одсека, Природословно-математичког факултета Универзитета у Загребу. Анализа дужине фрагмената микросателитских локуса рађена је у Департману за Аквакултуру Института за ветеринарску медицину, Универзитета природних наука у Тартуу, у Естонији.

ДНК је изолована из мишићног ткива помоћу китова (DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Немачка), GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep (SigmaAldrich, САД)) према упутству произвођача, по протоколу за изолацију ДНК из животињских ткива. Квалитет изоловане ДНК и концентрације су проверене на спектрофотометру NanoDrop ND-100 (NanoDrop Technologies, САД). Изолована геномска ДНК је чувана на -20 °C до поступка умножавања.

У овој дисертацији прајмери коришћени за умножавање *COI* гена мтДНК су ORCO1F (5' – AAC GCA ACG ATG ATT TTT TTC TAC – 3') (Taylor & Hardman, 2002) и APACO1H (5' – ATA GCG ACT ATA GCA TAA ATT ATC – 3') (Pedraza-Lara *et al.*, 2010), а за умножавање *16S rRNA* гена су 16Sar (5' – CGC CTG TTT AAC AAA AAC AT – 3') и 16Sbr (5' – CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T – 3') (Simon *et al.*, 1994).

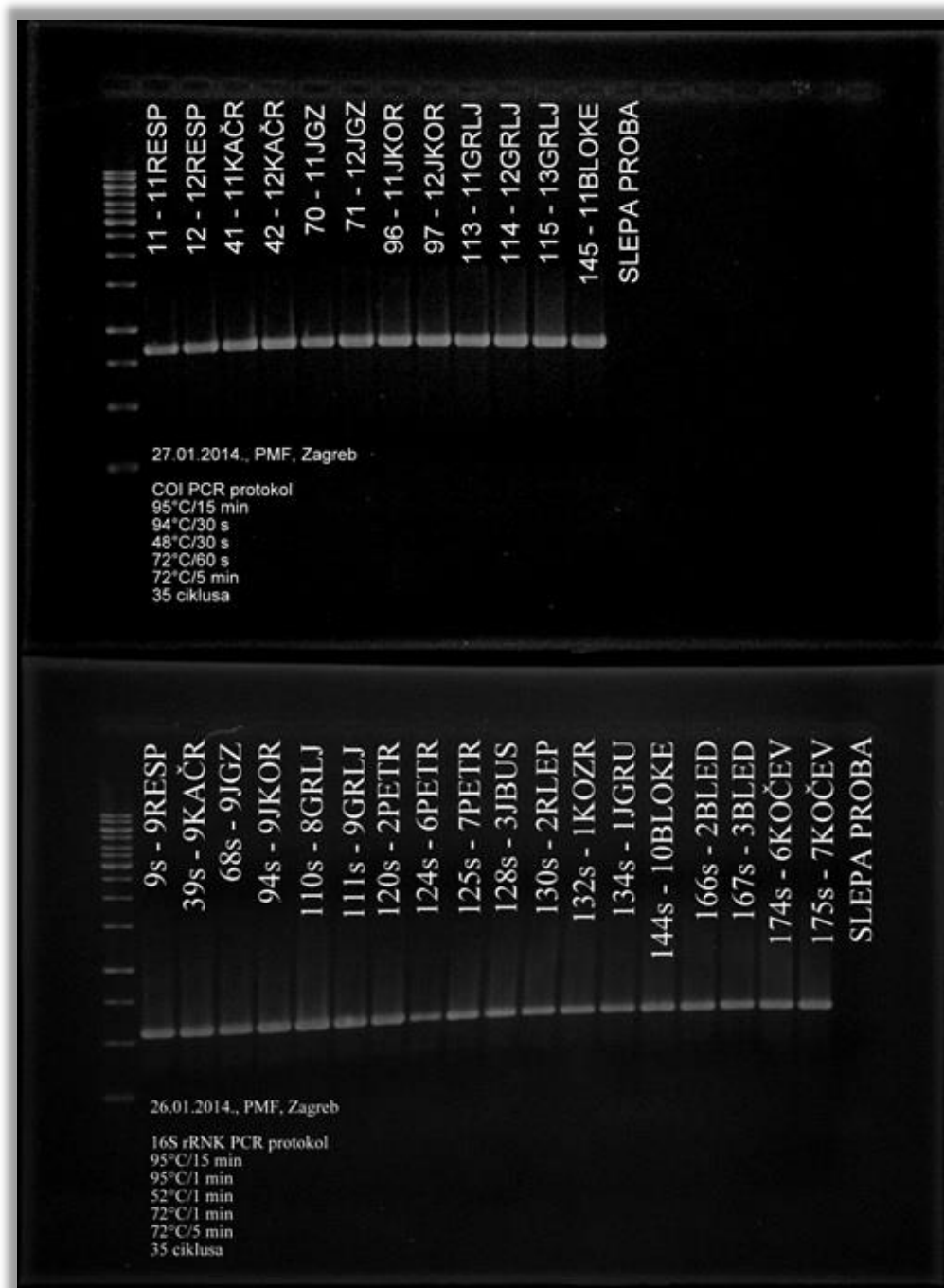
Смеша за PCR је припремљена са HotStarTaq Master Mix китом (Qiagen, Немачка) у укупном волумену од 10  $\mu$ L и садржала је 0,25 U HotStarTaq DNA полимеразе, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,24 mM dNTP, 0,20 mM сваког прајмера и 10 – 50 ng изоловане геномске ДНК.

Амплификација је урађена на апарату Eppendorf Mastercycler®. Програм под којим се одвијала амплификација *COI* гена састојао се од иницијалне денатурације (95 °C/15 min), праћене са 35 циклуса денатурације (94 °C/30 s), хибридизације (48 °C/30 s) и елонгације (72 °C/60 s). Након 35 циклуса следила је завршна екстензија у трајању од 5 минута на 72 °C.

Програм под којим се одвијала амплификација *16S rRNA* гена састојао се од иницијалне денатурације (95 °C/15 min), праћене са 35 циклуса денатурације (95 °C/1 min), хибридизације (52 °C/1 min) и елонгације (72 °C/1 min), а завршна екстензија је трајала 5 минута на 72 °C.

Сви PCR продукти су раздвојени на хоризонталном 1,5% агарозном гелу у 1x TAE пуферу (енг. TAE buffer). На гел је уз продукте амплификације наошана и негативна контрола, односно PCR смеша без геномске ДНК и стандард за величину ДНК (енг. GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific™, САД), такозване „лествице”, дизајниране за димензионирање и приближну квантификацију двоструке ДНК на агарозном гелу (Слика 8). Раздвајање је текло сат времена при напону од 100 V. Гел је обојен етидијум-бромидом (1  $\mu$ g/mL) да би се омогућила визуелизација

добијених фрагмената ДНК помоћу УВ трансилуминатора (енг. UV Transilluminator 2000, Bio-Rad Laboratories, Inc., САД).



Слика 8. Провера продуката амплификације гел-агарозном електрофорезом

(Фото С. Туретановић)



Пречишћавање и секвенцирање PCR продуката мтДНК је извршено од стране компаније Макроген (Macrogen Inc., Сеул, Јужна Кореја) са истим прајмерима који су коришћени за амплификацију гена. Пречишћени PCR производи су секвенцирани на секвенцеру ABI 3730XL DNA (Applied Biosystems, САД).

Од 19 претходно коришћених микросателита за потребе дисертације успешно је умножено 15 тетрануклеотидних микросателитних локуса: Aast4\_2, Aast4\_7, Aast4\_17, Aast4\_42, Aast4\_46, Aast4\_20, Aast4\_32, Aast4\_38, Aast4\_48, Aast4\_16, Aast4\_35, Aast4\_3, Aast4\_19, Aast4\_37, Aast4\_44 (Gross *et al.*, 2016) (Табела 3).

За мултиплекс у једној PCR реакцији изабрано је свих 15 локуса на основу опсега детектованих алела и овај мултиплекс панел је тестиран на варијабилност локуса код 185 јединки. Смеша за PCR је припремљена са Type-it Multiplex PCR Master Mix китом (Qiagen, Немачка) у укупном волумену од 10  $\mu$ L и садржала је 1 x Type-it Multiplex PCR Master Mix, 100 nM реверзног прајмера, 200 nM узводног прајмера са M13 репом и око 50 ng изоловане геномске ДНК. Сваки узводни прајмер (енг. forward) је дизајниран са M13 репом дужине 19 базних парова (CACGACGTTGTAАААСGAC), који је током PCR реакције обележен одговарајућом флуоресцентном бојом (6FAM, АТТО 550, АТТО 565 или Yakima Yellow) која омогућава детекцију фрагмента. Дужина фрагмента се читава у односу на стандард за величину ДНК.

Табела 3. Карактеризација тетрануклеотидних микросателитских локуса (модификовано према Gross *et al.*, 2016)

Локус	Понављајући мотив	Боја F прајмера	Forward прајмер 5' → 3' <sup>a</sup>	Reverse прајмер 5' → 3'	Детектовани опсег величина алела (bp)
Aast4_2	ACCT	6FAM	M13-AACCCATCCCTCCTACGTCT	GGAGGGACATTGAATAACGG	87-99
Aast4_7	ACAT	6FAM	M13-ATGAAGCTTGAGAAGGCCTATG	TGGTTAACATAACTGATGTGGGA	136-148
Aast4_17	ACGC	6FAM	M13-CCGCGCTAGTAAACTTGTCC	GTTGGTTGTGAGCCGACAGT	170-214
Aast4_42	AGGC	6FAM	M13-AAGCCACTAATATGCAGTCATTT	GAAATTTAATATCCATCGCCC	236-260
Aast4_46	ACAT	6FAM	M13-AGTCAAACAAGCCTAGCACG	TGAGTACAACGCTAAAGTTAATATGTC	278-290
Aast4_20	AGCC	ATTO 550	M13-CGTTACCCCTCCATATTGGC	TTATAAATGTCTGCAGCTCCC	165-197
Aast4_32	ACAT	ATTO 550	M13-ACCTATGTTTGTGTCTATATGGATCT	CGCCCTCCCTCAATATAGC	236-244
Aast4_38	ACAT	ATTO 550	M13-TGTTAACCGATTGGAGGGTC	TCATATTCCAATCCGCCTC	248-252
Aast4_48	ACAT	ATTO 550	M13-GCAATTTCAAACAGGCTTCA	CCCGCCTTTAAATGTTTAGC	292-304
Aast4_16	ACGC	ATTO 565	M13-GGTGTCTCGCGAAATGTAAA	TAGATGAATGGGCAGGAAGC	180-192
Aast4_35	ACAG	ATTO 565	M13-CGTTCTCAACACGCAAACCTT	CAGACCTTGAGCATGACCGT	228-244
Aast4_3	ACGC	Yaki.Yellow	M13-TTTCCTGTCTTTCGGCTGTC	ACCCTGCAAGCACATCTAGG	91-99
Aast4_19	ACAT	Yaki. Yellow	M13-TTGTTTTCGTGTTAATTCACCTTTGG	CATCCTCTCGCTTCAGTTGC	181-201
Aast4_37	ACAT	Yaki. Yellow	M13-TGGCTAAGACCAGATCTCAACA	TCTGGCACTGAAGGAGTTCT	239-247
Aast4_44	ACAG	Yaki. Yellow	M13-GGAACATTCTTTATTGGCAGG	TCACCTACCCAACATGTCTCA	289-313

Програм под којим се одвијала PCR амплификација састојао се од иницијалне активације (95 °C/5 min), праћене са 20 циклуса денатурације (95 °C/30 s), хибридизације (60 °C/90 s) и елонгације (72 °C/30 s) при чему се температура жарења смањује за 0,5° по циклусу. Затим је следило још 10 циклуса под следећим условима: 30 s на 95 °C, 90 s на 50 °C, 30 s на 72 °C и завршна екстензија 30 min на 60 °C.

Продукти амплификације раздвојени су капиларном електрофорезом на уређају Applied Biosystems 3500 Genetic Analyser (Life Technologies, САД). Дужина фрагмената је одређена коришћењем internal GeneScan 600 LIZ Size стандарда v2.0 (Life Technologies, САД), а генотипизација у софтверском пакету GeneMapper 5 (Life Technologies, САД).

### 3.4.2 Програмска анализа гена мтДНК

Секвенце преузете са корисничке стране Macrogen Inc. су проверене у програму BLAST (енг. Basic Local Alignment Tool) (Altschul *et al.*, 1990) који пореди добијену секвенцу са већ постојећим секвенцама за истраживану врсту у бази NCBI (енг. **N**ational **C**enter for **B**iototechnology **I**nformation – NCBI).

Секвенце су обрађене у SEQUENCHER 5.4.6 софтверу (Gene Codes Corp., САД), а затим су поравнате у ClustalW програму (Thompson, Higgins & Gibson, 1994) који је део MEGA7 софтверског пакета (Kumar, Stecher & Tamura, 2016).

Скуп података за филогенетске анализе обухватио је 979 повезаних секвенци *COI* и *16S rRNA* гена, укључујући наше податке и секвенце доступне у банци гена (енг. GenBank), углавном из студија Schrimpf *et al.* (2014; 2017) и Laggis *et al.* (2017) (приступни бројеви доступни у Табели 1 у Прилогу). Дужина секвенце за *COI* ген била је 350 базних парова (енг. **b**ase **p**airs - bp), за *16S rRNA* ген 418 базних парова, а завршне повезане секвенце су биле дугачке 768 базна пара. Секвенце су груписане у 78 јединствених хаплотипова помоћу софтвера DnaSP version 6.0 (Rozas *et al.*, 2017). У истом програму израчунати су и параметри генетичког диверзитета истраживаних популација: диверзитет хаплотипова (Hd), диверзитет нуклеотида ( $\pi$ ), просечан број нуклеотидних разлика (k), варијабилна (полиморфна) места (VPS), информативна места за парсимонију (PIS) (Табела 8).

За статистичку селекцију најбољег модела нуклеотидне супституције користили смо jModelTest2 version 2.1.6 (Guindon & Gascuel, 2003; Darriba *et al.* 2012). Према Бајесијанском критеријуму (енг. **B**ayesian **I**nformation **C**riterion - BIC) најбољи модел је Hasegawa-Kishino-Yano (енг. HKY model, Hasegawa, Kishino & Yano, 1985) уз предложену гама дистрибуцију (G) и пропорцију еволуционо инваријабилних места (I). Тест молекуларног сата, неопходан за припрему улазних података за филогенетску анализу, је урађен у MEGA7 софтверском пакету поређењем ML вредности (енг. **M**aximum **L**ikelihood - ML) за дату топологију, са и без молекуларних ограничења сата, у оквиру одабраног еволуционог модела (HKY + G + I). Пошто је нулта хипотеза о једнакој еволуционој стопи у свим деловима стабла одбачена са нивоом значајности од 5%, коришћен је *relaxed uncorrelated lognormal* модел молекуларног сата.

Филогенетска анализа спроведена је коришћењем Бајесијанског приступа имплементираних у програм BEAST version 2.5.2 (Bouckaert *et al.*, 2014) применом одабраног модела (HKY + G + I и prior „*coalescent constant-size tree*”). Примењени су рангови за стопе супституције мтДНК израчунате за декаподе по Schubart, Diesel & Hedges (1998). Markov Chain Monte Carlo (MCMC) метода је изведен за 100.000.000 генерација и узоркован на сваку 10.000. генерацију. Конвергенција је испитивана коришћењем софтвера Tracer version 1.7.1 (Rambaut *et al.*, 2014), а стабло максималног кредибилитета је конструисано помоћу TreeAnnotator v.1.8.4 (Drummond *et al.*, 2012) након одбацивања првих 20% узорака (опција „*Burn-in*”).

Мрежа хаплотипова је конструисана у програму PopArt 1.7 (Leigh & Bryant, 2015) помоћу Median-joining алгоритма (Bandelt, Forster & Röhl, 1999).

Еволуцијска дивергенција (заснована на *p*-дистанцама) парова секвенци унутар и између линија откривених филогенетском анализом процењена је коришћењем софтвера MEGA 7.

### 3.4.3 Програмске анализе микросателитских локуса

Микросателити су најпре проверени у програму MicroChecker version 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004) како би се установило постојање нултих алела, грешака у генотипизацији и насумични изостанак алела (енг. *allelic dropouts*).

У програмском пакету FSTAT v. 2.9.3.2 (Goudet, 2001) израчунат је проценат полиморфних локуса (P), коефицијент инбридинга ( $F_{is}$ ) према Pamilo (1984) и мера диференцираности популација преко парне  $F_{st}$  вредности према Weir & Cockerham (1984), те очекивана ( $H_e$ ) и детектована хетерозиготност ( $H_o$ ) и богатство алела ( $A_r$ ) (1000 пермутација, двострани тестови). Број алела по локусу израчунат је у програму Genetix version 4.05 (Belkhir et al, 1996-2004). Број приватних алела ( $A_{pva}$ ) и процена вредности протока гена  $Nm$  су израчунати у GenAlEx version 6.5 програму (Peakall & Smouse, 2006, 2012). У GENEPOP version 3.3 (Raymond & Rousset, 1995a) тестирано је и да ли су популације у Харди-Вајнберговој равнотежи (енг. Hardy-Weinberg Equilibrium - HWE). Сви тестови вероватноће били су засновани на Марковљевој ланчаној методи (енг. Markov Chain Method) (Guo & Thompson, 1992; Raymond & Rousset, 1995b), користећи 1.000 корака демеморисања 100 серија и 1.000 итерација/понављања по серији.

Анализа молекуларне варијансе (AMOVA) урађена је коришћењем матрице дистанци (енг. pairwise difference method) у програму GenAlEx (верзија 6.5). У истом програму урађена је анализа главних координата (енг. Pincipal Coordinates Analysis - PCoA). Геометријски однос међу популацијама се визуализује дијаграмом расипања (енг. scatter plot) факторских података дуж две осе које су одговорне за највеће варијације.

У програму STRUCTURE (верзија 2.3.4 –Pritchard *et al.*, 2000) је анализирана структурираност популација са претпостављеним бројем група  $K = 10$ . Користили смо модел уз претпоставку измешаних и корелисаних фреквенци алела између  $K$  популационих група са 50.000 burn-in репликација и 200.000 MCMC (енг. Markov Chain Monte Carlo) симулационих 7 понављања за сваку групу  $K$ , без претходне информације о локацији узорака индивидуа.

Како би се проценила највероватнија  $K$  вредност, према Evanno *et al.* (2005), коришћен је Structure Harvester софтвер (Earl & von Holdt, 2012).

### 3.5 Процена ризика изумирања и приоритета конзервације истраживаних популација речног рака применом модификованог модела **ESHIPPO crayfish**

ESHIPPO модел је дизајниран за процену ризика изумирања и дефинисање приоритета очувања/конзервације угрожених врста у воденим екосистемима на локалном и националном нивоу (Simić *et al.* 2007, 2015). Потреба за оваквим моделом настала је због честе разлике у процени ризика изумирања на локалном и глобалном нивоу. Пример овога је управо речни рак који је на Црвеној листи Међународне уније за очување природе класификован као „рањива врста”, а на националној Црвеној листи Немачке категорисан је као „угрожена врста”, у Шведској је „критично угрожена врста”, а у Србији има статус „строго заштићене врсте”.

Основни елементи модела су еколошка специјализација врсте – ES (енг. **E**cological **S**pecialization of taxa) и угрожавајући фактори диверзитета – HIPPO. Оцена еколошке специјализације извршена је у односу на: станиште, исхрану, репродуктивну стратегију, животни циклус, величину тела и ниво ендемизма истраживане врсте (Fisher & Owens, 2004). Оцена угрожавајућих фактора диверзитета квантификована је у односу на: измене/промене станишта (енг. **H**abitat alteration), утицај инвазивних врста (енг. **I**nvasive species), загађење (енг. **P**ollution), раст хумане популације (енг. **P**opulation growth), прекомерну експлоатацију (енг. **O**ver-exploitation) (Brennan & Withgott, 2005) (Табела 4).

Simić *et al.* (2015) су модификовали основни модел и посебно га прилагодили за фамилију Astacidae тако што су основним елементима додали и Индекс локалне прилагођености популација ракова (енг. **I**ndex of the **L**ocal **A**daptive **P**opulation of Crayfish - ILAP) (Табела 5). Кроз овај елемент бодују се генетички фактори популације (припадност одређеној филогенетској линији и коефицијент инбридинга), морфометрија (статистички значајне разлике морфометријских карактера), број индивидуа по популацији, старосна структура јединки и проценат полно зрелих женки.

На основу укупног броја бодова модела

$$\mathbf{ESHIPPO\ crayfish} = \Sigma(\mathbf{ES+HIPPO+ILAP})$$

врсте/популације се класификују и издвајају се оне које имају приоритет заштите на националном/локалном нивоу. Бодовна скала приоритета заштите се креће од **3** до **0**. Степен приоритета заштите **3** карактерише малу вероватноћу изумирања врсте на националном нивоу. Степен приоритета заштите **2** карактерише умерену вероватноћу изумирања врсте на националном нивоу. Ове врсте се морају sukcesивно истраживати како би се предузеле мере заштите уколико то буде потребно. Степен приоритета заштите **1** указује да врста има приоритет у заштити и да је потребно одмах предузети адекватне мере заштите на националном нивоу. Степен приоритета заштите **0** означава да је изумирање врсте у њеном природном станишту у току и да је један од могућих начина њеног очувања примена *ex-situ* заштите.

**Табела 4.** Протокол ESHIPPO модела са параметрима за процену еколошке специјализације (ES) и утицаја HIPPO фактора, преузето и прилагођено према Simić *et al.*, (2007)

Елементи ES	ознака	Индикатор ознака*	Бодови ES	Елементи HIPPO	Процент акватичних станишта на којима се манифестују фактори					
					%	број бодова	%	број бодова	%	број бодова
Станиште (Habitat)	h	h1, h2, h3, h4, h5	1- (h)(d)(rs): ниско специјализован. Толерантан. Еуривалент (еуриотоп) за све или > 3 индик. h. (d): d1. (rs):rs1.1, rs2.1, rs3.1, rs3.2, rs4.3, rs5.1, rs6.1, (lc): lc1.1, lc1.3, lc2.1, lc3.1, lc3.4, lc4.1, lc4.4, lc6.2, (bs): bs1.1, (re): re1.	Промене станишта <sup>1</sup> Деструкција, фрагментација и изолација Инвазивне врсте <sup>2</sup> и/или неадекватно порињавање						
Исхрана (Diet)	d	d1, d2, d3								
Репродуктивни систем (Reproduction strategy)	rs	rs1, rs2, rs3, rs4, rs5, rs6	3-(h)(d)(rs): умерено специјализован. Осетљив. Стеновалент (умерен), за 1-3 индик. h. (d): d2. (rs): rs.1.2, rs2.2, rs3.3; rs4.2; rs5.2; rs6.2; rs7.2; lc1.2, lc2.2, lc3.2, lc3.5, lc4.2, lc4.5. (bs).bs1.2; (re). re2.	Загађење <sup>3</sup>	>50	5	20-49,9	3	<20	1
Животни циклус (Life cycle)	lc	lc1, lc2, lc3, lc4		Раст хумане популације <sup>4</sup>						
Величина тела (Body size)	bs	bs1, bs2, bs3	5- (h)(d)(rs): високо специјализован. Стеновалент (стенотоп) за све или > 3 индик. h. (d): d3. (rs): rs1.3, rs2.3, rs4.1, rs5.3, rs6.3. (lc): lc1.3, lc2.3, lc3.3, lc3.6, lc4.3, lc4.6, lc6.1, bs1.3. (re): re3.	Прекомерна експлоатација <sup>5</sup>						
Ниво ендемизма и изолација популација / статус угрожености IUCN (Range endemic)	re	re1, re2, re3								

\*(h): h1) дистрибуција по екорегинима (Illies 1967); h2) надморска висина: < 200, 200-500, 500-800, 800-1500 и > 1500; h 2.1) тип екосистема и еколошка зона: текуће воде: сукренон, хипокренон, епиритрон, метаритрон, хипоритрон, епипотамон, метапотамон, хипопотамон; стајаће воде: литорал, сублиторал, профундал, баре, мочваре, ефемерне воде и друго. h3) морфметријски параметри водених екосистема: дубина (m), карактер дна (%), h4) физички и хемијски параметри: температура (°C), брзина воде, електропроводљивост, кисеоник (mg/l, %), рН, тврдоћа воде (dH), ВРК<sub>5</sub> (mg/l), h5) квалитет воде. Посебне прилагођености или осетљивост на одређене хемијске, токсичне или радиоактивне материје. Навести карактеристике: трофичност – олиготрофне, мезотрофне, еутрофне, дистрофне. Сапробност: ксеносапробне, олигосапробне, бетамезосапробне, алфамезосапробне и полисапробне. d): d1) еурифаг-омнивора, d2) еурифаг-хербивора, карнивора, специфичан тип исхране, специфичне морфометријске адаптације за исхрану, d3) стенофаг, специфичне прилагођености за исхрану или монофаг. (rs): rs1) репродукција- асексуална, паразитска; није специфичан тип репродукције (ововивипарни, изолована јаја, цементирани изолована јаја, полагају јаја на вегетацију, или неки супстрат (rs1.1), специфичан тип репродукције (rs1.2), строго специфичан тип репродукције (rs1.3). rs2) време репродукције и фреквенност: rs2.1) флексибилне или мултиволтине rs 2.2) триволтине, биволтине, rs2.3) семиволтине или униволтине rs3) трајање периода емергенције и/ (године): дуг >3 месеца (rs3.1), 1-3 месеца, (rs3.2), кратак < 1 месеца, (rs3.3). rs4) појава у великом броју (rs 4.1), да, ретко (rs 4.2), да, сваке године (rs4.3). rs5) акватичне фазе: адулт (rs5.1), ларва-нимфа-пула (rs 5.2), јаје (rs5.3). rs6). Стадијум трајања ларве /циклус развића ларве >2 године/целе године (rs 6.1), 1-2 године/2-3 (rs 6.2), < 1 година/један циклус (rs6.3) lc): lc1) животни циклус (година) <1 (lc1.1), ≈1(lc1.2), >1(lc1.3). ) покретљивост (тип кретања – веома покретне /пливање) (lc2.1), умерено покретни/пливање (lc2.2), семисеселни-сесилни (lc2.3). lc3) социјални живот: солитари (lc3.1), формирају периодичне агрегације (lc3.2), живе у заједници (lc3.3), ван територије (lc3.4), понекад територијалне (lc3.5), трајно територијалне (lc3.6). lc4) бригаа о потомству: не постоји (lc4.1), чувају јаја, ларве (lc4.2), бригаа о јувенилима (lc4.3), нема сексуалног диморфизма (lc4.4), сексуални диморфизам током репродукције (lc4.5) присутан сексуални диморфизам (lc4.6) <sup>1</sup>промене воденог станишта: регулација и рекултивација, вађење шљунка, прекомерна употреба воде. Укључујући промене у већини природног станишта. (bs): величина тела TL (cm): < 0,5 (bs1.1); 0,6-3 (bs1.2), > 3 (bs1.3); re): re1) није ендем и није угрожен re2) ендем за један екорегин, рањив re3) ендем за релативно мале или веома мале територије (један екосистем, један биотоп), и изоловане популације угрожене и критично угрожене.

<sup>2</sup>инвазивне врсте (%) или % природне популације снабдевене неадекватним јувенилима (генетички не компатибилних) у последњих 10-20 година

<sup>3</sup>загађење: сапробност, еутрофикација, токсично, радиоактивно загађење, ацидификација или мешовито загађење

<sup>4</sup>густина људске популације преко 150 ст/ km<sup>2</sup> статистичка процена годишњег улова комерцијалних врста већа од реалне производње у последњих 10 година и /или производња мања од реалне и смањена у односу на потенцијалну производњу и/или смањење укупне биомасе.

<sup>5</sup>природна и антропогена експлоатација



Табела 5. Индекс локалне прилагођености популација ракова (ILAP), параметри и бодовна скала, преузето и прилагођено према Simić *et al.*, (2015)

Елементи/бодови	5	3	1
<b>Филогенија</b>	популација припада новој хаплогрупи/хаплотипу на основу бар једног генетичког маркера	популација припада новом хаплотипу унутар хаплогрупе на основу бар једног генетичког маркера и/или унутар филогенетске хаплогрупе	популација припада познатој хаплогрупи/хаплотипу
<b>Коефицијент инбридинга (<math>F_{is}</math>)</b>	$F_{is} \geq 0.01$ присуство хомозигота у популацији	$F_{is} = 0$	$F_{is} \leq -0.01$ присуство хетерозигота у популацији
<b>Морфометрија (mf)</b>	статистички значајне разлике у морфометрији у > 70% карактера блиских и/или удаљених популација	статистички значајне разлике између популација у морфометрији у 30-70% карактера	статистички значајне разлике у морфометрији у < 30% карактера
<b>Бројност јединки</b>	абунданца (N) < 1000 јединки	абунданца (N) 1000-3000 јединки	абунданца (N) > 3000 јединки
<b>% полно зрелих женки</b>	< 5%	5-10%	> 10%
<b>Старосна и популациона структура</b>	доминација старих пост репродуктивних јединки, опадање популација	старосне групе приближно уједначене, популација стагнира или споро расте	доминација младих пре репродуктивних јединки, популација расте

Табела 6. Бодовна скала ESHIPPO crayfish модела, преузето и прилагођено према Simić *et al.*, (2015)

Број бодова				
Еколошка специјализација (ES)	<10	11-20	21-30	>30
Ниво еколошке специјализације	мали	умерен	истакнут	веома истакнут
Утицај HIPPO фактора	<20	21-35	36-50	51-60
Ниво утицаја фактора	мали	умерен	истакнут	веома истакнут
Индекс локалне прилагођености популација ракова (ILAP)	<10	11-15	16-20	>20
Ниво утицаја индекса локалне прилагођености популација ракова	мали	умерен	истакнут	веома истакнут
<b>Укупан број бодова (ES + HIPPO + ILAP)</b>	<50	51-59	60-89	>90
<b>Критичан ниво ризика од изумирања</b>	мали	умерен	истакнут критичан ниво	изумирање у току
	3	2	1	0

## **4. Резултати**

#### 4.1 Резултати морфометријских анализа

T-test је показао значајну разлику у средњим вредностима већине измерених морфометријских карактера (TL, ROL, ABL, TEL, CLL, CFL, CPL, CLH, CLW, CPW, ABW, TEW, тежина) између мужјака и женки (308 јединки; 179 мужјака и 129 женки) из 10 анализираних популација. Сходно томе, даље анализе су рађене одвојено за полове.

Резултати One-way ANOVA теста су показали значајну разлику у средњим вредностима већине измерених морфометријских карактера између популација и за мужјаке ( $F = 12,16$ ,  $p < 0,001$ ), за женке ( $F = 7,06$ ,  $p < 0,001$ ). Мужјаци различитих популација се нису статистички значајно разликовали само у два морфометријска карактера - CLH и ABH, а женке се нису значајно разликовале у четири морфометријска карактера - ABL, CFL, CPH и ABW.

Резултати Post-hoc Bonferroni теста су показали да постоје значајне разлике у карактеру HEW код популације мужјака из акумулације Газиводе и популација мужјака из Ресничког потока, Петровачке реке, акумулације Грлиште, Милошевог рибњака и Преспанског језера ( $p < 0,001$ ), као и између популације мужјака из акумулације Газиводе и популације мужјака из реке Качер ( $p = 0,005$ ); у карактеру ROW између популација мужјака из реке Блошчице и Ресничког потока, Петровачке реке, Милошевог рибњака, Преспанског језера и Кочевске реке ( $p < 0,001$ ); у карактеру CPW између популације мужјака из Кочевске реке и свих других популација ( $p < 0,001$ ); у карактеру ABW између популације мужјака из акумулације Газиводе и популације из Ресничког потока ( $p = 0,006$ ), између популације мужјака из акумулације Газиводе и популације из Петровачке реке ( $p = 0,001$ ), између популације мужјака из акумулације Газиводе и популације из реке Качер ( $p = 0,015$ ) и између популације мужјака из акумулације Газиводе и популација из Милошевог рибњака, Преспанског језера, Кочевске реке и реке Блошчице ( $p < 0,001$ ).

Резултати Post-hoc Bonferroni теста су показали да постоје значајне разлике у карактеру TL код популације женки из акумулације Газиводе и популација из Ресничког потока, Петровачке реке и Милошевог рибњака ( $p < 0,001$ ) и популације женки из акумулације Газиводе и популације из Преспанског језера ( $p = 0,002$ ); у карактеру ROL између популације женки из акумулације Кореница и популација из

Ресничког потока и Милошевог рибњака ( $p < 0,001$ ), као и између популације из акумулације Кореница и оне из Петровачке реке ( $p = 0,001$ ); у карактеру TEL између популације женки из акумулације Газиводе и популације из Ресничког потока, акумулације Кореница, Милошевог рибњака ( $p < 0,001$ ) и између популација из акумулације Газиводе и Петровачке реке ( $p = 0,011$ ); у карактеру CPL између популације женки из Преспанског језера и популације из Ресничког потока ( $p < 0,001$ ); у карактеру АВН између популације женки из акумулације Кореница и популације из Ресничког потока ( $p = 0,001$ ), популације из акумулације Кореница и из Петровачке реке ( $p = 0,045$ ), као и популације из акумулације Кореница и популације из акумулације Газиводе ( $p = 0,021$ ), и популације женки из акумулације Кореница и оних из Милошевог рибњака и Преспанског језера ( $p < 0,001$ ); у карактеру HEW између популације женки из акумулације Газиводе и популација из Ресничког потока, Петровачке реке, Милошевог рибњака и Преспанског језера ( $p < 0,001$ ); у карактеру ROW између популације из акумулације Кореница и популација из Ресничког потока, Петровачке реке, Милошевог рибњака и Преспанског језера ( $p < 0,001$ ).

Како би се видело који од измерених морфометријских карактера највише доприноси дискриминацији/раздвајању међу популацијама урађена је мултиваријантна дискриминантна анализа (енг. **M**ultivariate **D**iscriminant **A**nalysis – MDA). Варијабле које су коришћене у анализи наведене су у Табели 7.

За популације мужјака првих осам канонијских дискриминантних функција је коришћено у анализи. Прве две дискриминантне функције објашњавају 52 и 18,4% приказане варијабилности, а вредности канонијског R (енг. Canonical R) за те функције су биле 0,960 и 0,898. У односу на прву дискриминантну функцију диференцијацији је највише допринео карактер тежина (оптерећење у дискриминантној функцији 1 = 0,959), затим HEW (оптерећење у дискриминантној функцији 1 = 0,689), SEW (оптерећење у дискриминантној функцији 1 = 0,590) и CLL (оптерећење у дискриминантној функцији 1 = -0,518). Диференцирању популација у односу на другу дискриминантну функцију највише доприноси карактер AVL (оптерећење у дискриминантној функцији 2 = -0,939), затим TL (оптерећење у дискриминантној функцији 2 = 0,577), CPW (оптерећење у дискриминантној функцији 2 = 0,546) и CLW (оптерећење у дискриминантној функцији 2 = 0,546).

За популације женки првих пет канонијских дискриминантних функција је коришћено у анализи. Канонијско  $P$  је за прве две дискриминантне функције имало високе вредности, 0,883 и 0,868. Прва дискриминантна функција објашњава 36,1% приказане варијабилности, а највећи допринос у дискриминацији истраживаних популација дали су следећи карактери ABL (оптерећење у дискриминантној функцији 1 = -1,216), затим ROW (оптерећење у дискриминантној функцији 1 = 0,835) и TL (оптерећење у дискриминантној функцији 1 = 0,738). Друга дискриминантна функција објашњава 31,2% варијансе, а томе највише доприносе карактери CLL (оптерећење у дискриминантној функцији 2 = 0,902), ABL (оптерећење у дискриминантној функцији 2 = -0,887) и CLW (оптерећење у дискриминантној функцији 2 = -0,845).

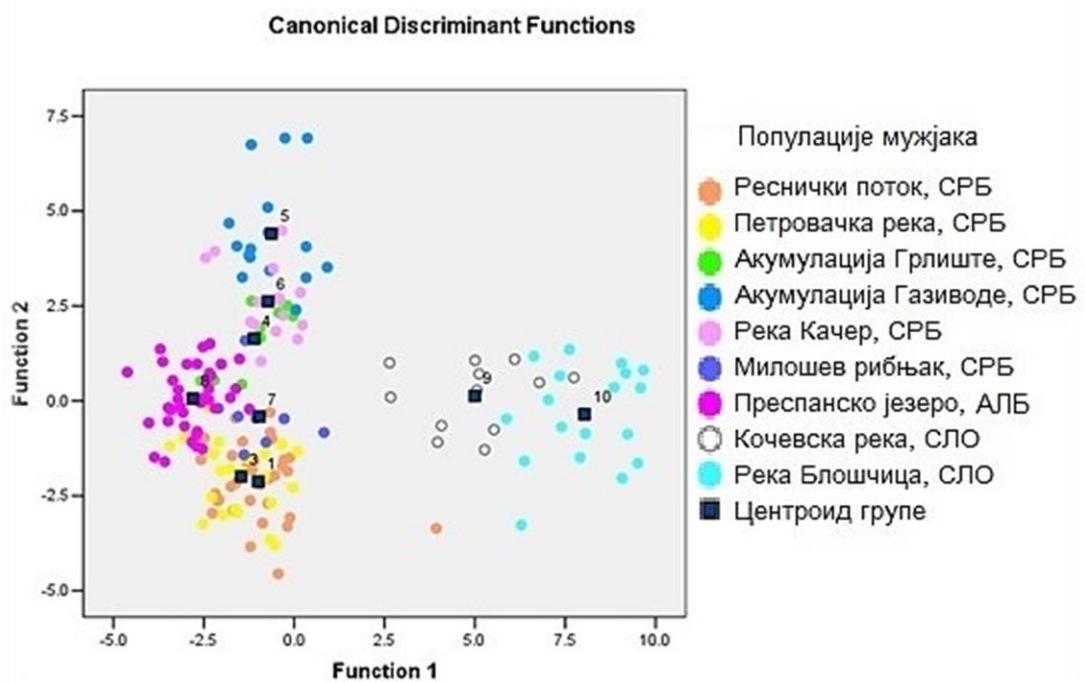
Табела 7. Стандардизовани коефицијенти каноничке дискриминативне функције за морфометријске карактере мужјака и женки. Приказане су и сопствене вредности (Eigenvalue), проценат варијансе (% of Variance), кумулативни проценат варијансе (Cumulative%) и канонске корелације (Canonical R)

Мужјаци				Женке			
Морфо. параметри	Функција 1	Функција 2	Функција 3	Морфо. параметри	Функција 1	Функција 2	Функција 3
TL	0,260	0,577	0,170	TL	0,738	0,550	-0,062
ROL	-0,212	0,364	-0,372	ROL	0,132	0,169	-0,286
HEL	0,368	0,124	0,219	HEL	0,005	-0,197	-0,137
ABL	-0,433	-0,939	0,130	ABL	-1,216	-0,887	-0,516
TEL	-0,040	0,249	-0,126	TEL	-0,356	0,386	-0,104
CLL	-0,518	0,353	-1,613	CLL	0,153	0,902	-0,560
CFL	0,371	-0,247	0,243	CFL	0,124	-0,529	0,184
CPL	-0,077	0,504	-0,189	CPL	0,007	0,511	-0,239
CLH	0,021	-0,148	-0,024	CLH	0,141	-0,015	-0,119
CLW	-0,201	-0,520	0,428	CLW	-0,441	-0,845	0,245
CPH	0,205	-0,189	-0,376	CPH	0,207	-0,081	-0,338
ABH	0,185	0,097	-0,162	ABH	0,355	-0,223	-0,268
HEW	0,689	0,491	-0,433	HEW	0,440	0,412	0,753
ROW	0,312	0,271	0,462	ROW	0,835	-0,206	0,047
CGW	-0,092	-0,215	-0,212	CGW	-0,147	-0,582	-0,437
CPW	-0,507	0,546	0,523	CPW	-0,216	0,398	0,062
ARW	-0,036	0,151	0,314	ARW	0,054	-0,095	0,283
CEW	0,590	-0,358	0,004	CEW	-0,480	0,308	0,385
ABW	-0,269	-0,302	0,630	ABW	0,036	0,197	-0,313
TEW	-0,233	-0,254	-0,076	TEW	-0,164	-0,085	0,347
тежина	0,959	-0,179	1,131	тежина	-0,192	0,301	1,081
Eigenvalue	11,758	4,159	3,789	Eigenvalue	3,543	3,056	2,016
% of Variance	52	18,4	16,8	% of Variance	36,1	31,2	20,6
Cumulative%	52	70,4	87,2	Cumulative%	36,1	67,3	87,8
Canonical R	0,96	0,898	0,889	Canonical R	0,883	0,868	0,818

За бољу визуализацију формиран је дводимензионални графикон у простору прве две дискриминантне функције, које носе највећи део укупне варијабилности популација мужјака (Слика 9) и популација женки (Слика 10). Код мужјака, прва

функција дискриминише популације из Словеније и друге популације које имају негативне вредности за прву канонску функцију. Пошто је прва дискриминативна функција обележена високим позитивним оптерећењима за тежину, HEW и CEW и високим негативним оптерећењима за CLL, CPW и ABL (Табела 7), може се рећи да што су веће вредности тежине, HEW и CEW, већа је вероватноћа да ракови припадају словеначким популацијама, а што су мање вредности CLL, CPW и ABL, вероватније је да ракови припадају популацији са Преспанског језера и популацијама из Србије.

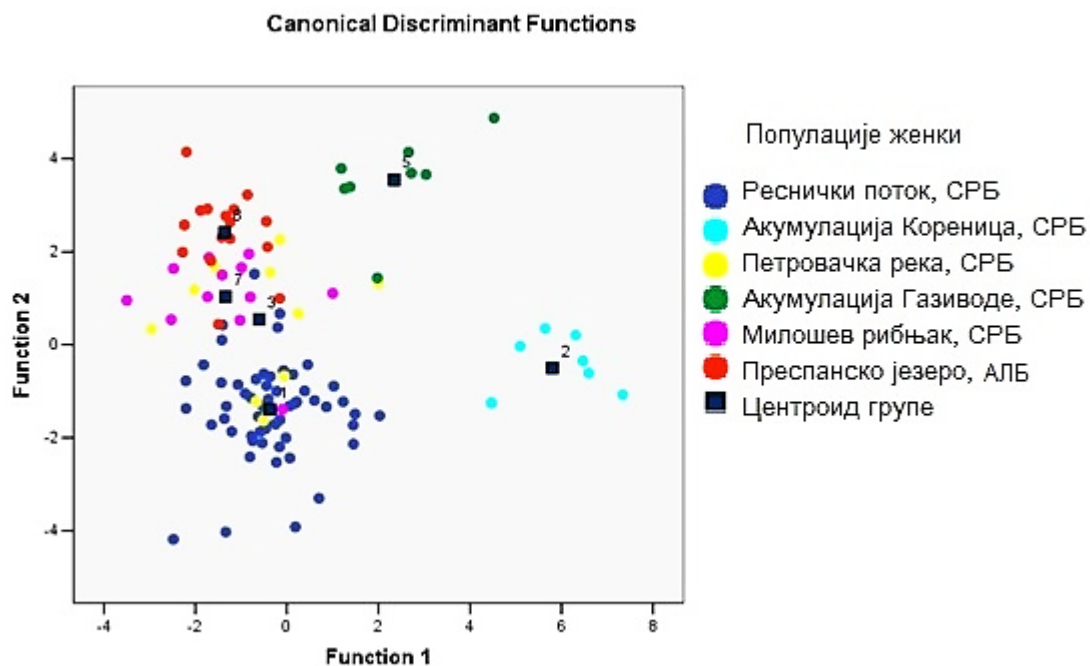
По другој дискриминантној функцији раздвојене су популације мужјака из акумулације Газиводе, Преспанског језера и популације из Петровачке реке, али је дошло до преклапања између популација мужјака из акумулације Газиводе и реке Качер, и популације мужјака из Петровачке реке са популацијама из Ресничког потока и Милошевог рибњака.



Слика 9. Раздвајање популација мужјака речног рака према првој и другој дискриминантној функцији



Код женки, прва функција дискриминише популације из акумулација Газиводе и Кореница и све друге популације које се налазе у негативном делу прве осе (Слика 10). Прва дискриминативна функција обележена је високим позитивним оптерећењима за TL, ROW и HEW и високим негативним оптерећењима за ABL, CEW и CLW, па се може рећи да што су веће вредности за TL, ROW и HEW већа је вероватноћа да ракови припадају популацијама из акумулација Газиводе и Кореница, а што су мање вредности за ABL, CEW и CLW већа је вероватноћа да ракови припадају популацијама из Преспанског језера и из Милошевог рибњака. Друга дискриминантна функција дискриминише популације из акумулације Газиводе и Ресничког потока. Обележена је високим позитивним оптерећењем за CLL, CPL и TL, и високим негативним оптерећењем за ABL, CLW и CGW. Што су веће вредности за CLL, CPL и TL већа је вероватноћа да ракови припадају популацији из акумулације Газиводе, а што су мање вредности за ABL, CLW и CGW већа је вероватноћа да ракови припадају популацији из Ресничког потока. По другој функцији се донекле одвајају и женке из Преспанског језера.



**Слика 10.** Раздвајање популација женки речног рака према првој и другој дискриминантној функцији

## 4.2 Генетичка варијабилност секвенци

Основни параметри генетичког диверзитета популација речног рака приказани су у Табели 8.

Анализом сета повезаних *COI* и *16S rRNA* секвенци речног рака детектовано је шест различитих хаплотипова са 18 полиморфних места од којих је 16 парсимонијски информативно. Вредност диверзитета хаплотипова за читав скуп узорака износио је  $Hd = 0,665$ , нуклеотидни диверзитет је био  $\pi = 0,00646$ , а просечан број нуклеотидних разлика  $k = 4,916$ .

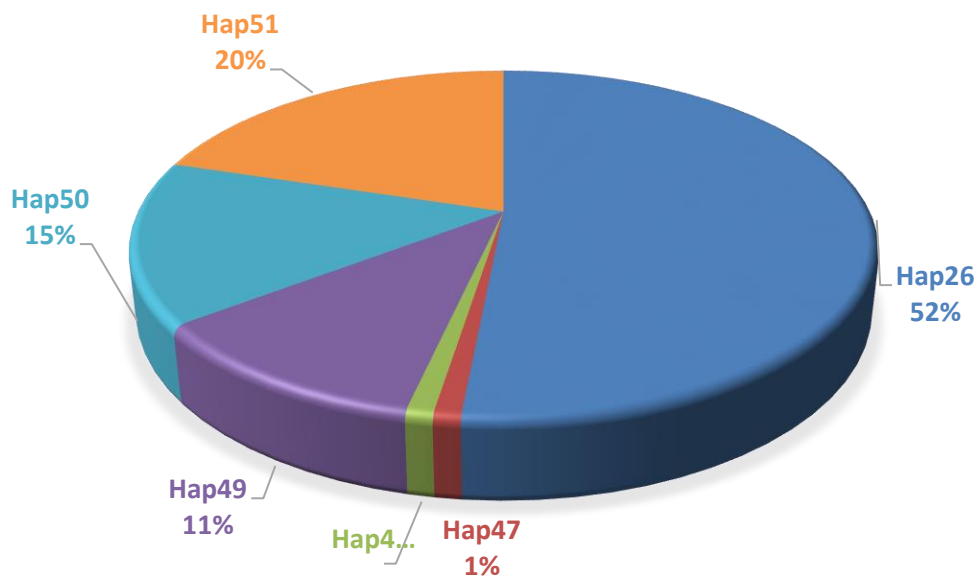
Диверзитет *COI* хаплотипова износио је  $Hd = 0,610$  и био је мало већи од диверзитета *16S rRNA* хаплотипова који је био  $Hd = 0,585$ . У оквиру *COI* секвенци било је 10 полиморфних места, од којих је 9 парсимонијски информативно. У оквиру *16S rRNA* секвенци било је 8 полиморфних места и сва су била парсимонијски информативна.

**Табела 8.** Основни параметри генетичког диверзитета популација речног рака

	<i>COI</i>	<i>16S rRNA</i>	<i>COI + 16S rRNA</i>
<b>N</b>	114	117	99
<b>Nh</b>	5	5	6
<b>Hd</b>	0,610	0,585	0,665
<b><math>\pi</math></b>	0,00692	0,00373	0,00646
<b>k</b>	2,421	1,774	4,916
<b>VPS</b>	10	8	18
<b>PIS</b>	9	8	16

\*N - број узорака, Nh – број различитих хаплотипова (енг. *Number of haplotype*), Hd - диверзитет хаплотипова (енг. *Haplotype (gene) diversity*),  $\pi$  - диверзитет нуклеотида (енг. *Nucleotide diversity*), k – просечан број нуклеотидних разлика (енг. *Average number of nucleotide differences*), VPS – варијабилна (полиморфна) места (енг. *Variable (polymorphic) sites*), PIS - информативна места за парсимонију (енг. *Parsimony informative sites*)

На Слици 11 је приказана процентуална заступљеност детектованих хаплотипова у узорку. Најзаступљенији је био хаплотип Нар26 који носи 52% анализираних јединки. Он је идентификован на 8 од 15 истражених локалитета.



Слика 11. Процентуална заступљеност детектованих хаплотипова у односу на укупан број анализираних секвенци

Хаплотип Har51 који је идентификован на три локалитета носи 20% јединки. Хаплотип Har50 носи 15% јединки и детектован је на једном локалитету, а 11% јединки носи хаплотип Har49 детектован на два локалитета. Хаплотипове Har47 и Har48 носи 1% јединки, а детектовани су на по једном локалитету.

У Табели 9 приказани су детектовани хаплотипови у оквиру истраживаних локалитета и њихова припадност до сада описаним линијама и групама.

За сет повезаних секвенци (*COI* и *16S rRNA*) конструисано је филогенетско стабло (Слика 12) максималне кредибилности помоћу Бајесијанске методе, које приказује вредности *posterior probability* подршке изнад 0,5. Хаплотипови детектовани у дисертацији, њих шест, распоређени су у оквиру већ описаних филогенетских линија (Schrimpf *et al.*, 2014) и група (Laggis *et al.*, 2017).

У оквиру *линије 2* налази се хаплотип Har49 детектован код јединки из Западне Србије, односно у Козељској и реци Качер.

Хаплотипови Har26, Har47, Har48 и Har51 су у оквиру *Линије 3*. Хаплотип Har26 је детектован у Ресничком потоку, Петровачкој реци, Милошевом рибњаку и акумулацијама Гружа, Бусур, Кореница, Грлиште и Газиводе. Готово све јединке из Петровачке реке носе хаплотип Har26, а једна јединка је носила и хаплотип Har47. Хаплотип Har48 је детектован у реци Лепеници, а хаплотип Har51 код јединки из Словеније, односно из Кочевске реке, језера Блед и акумулације Блоке.

Хаплотип Нар50 се налази у оквиру *групе 1 и 2*, а детектован је код јединки из Преспанског језера.

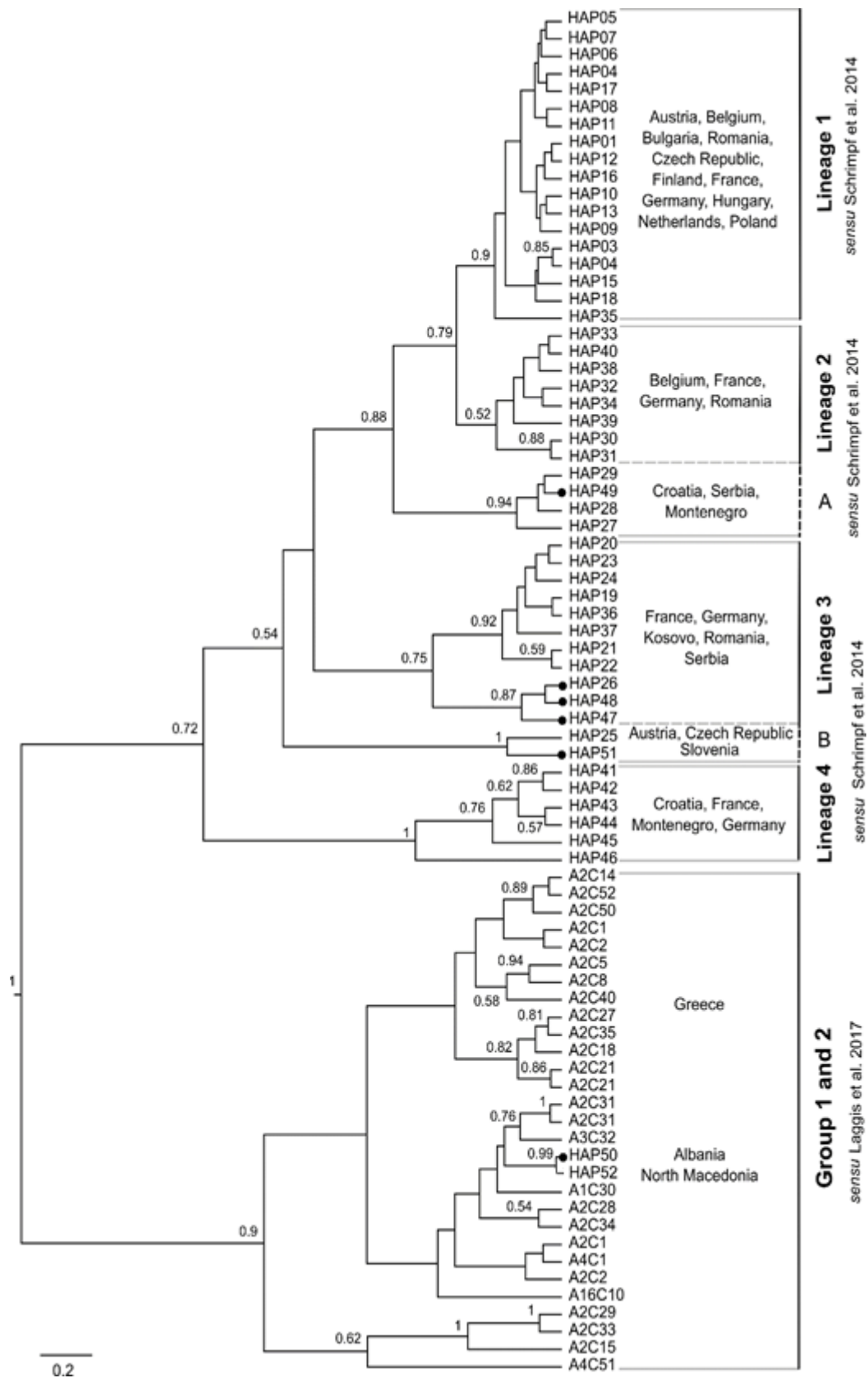
**Табела 9.** Списак локалитета, детектованих хаплотипова и припадност до сада описаним линијама/групама према Schrimpf *et al.* (2014) и Laggis *et al.* (2017)

Локалитети	N	Нар26	Нар47	Нар48	Нар49	Нар50	Нар51	Линија/
Реснички поток	5	5	-	-	-	-	-	Линија 3
Петровачка река	12	11	1	-	-	-	-	Линија 3
Река Лепеница	1	-	-	1	-	-	-	Линија 3
Милошев рибњак	6	6	-	-	-	-	-	Линија 3
Река Качер	9	-	-	-	9	-	-	Линија 2
Козељска река	2	-	-	-	2	-	-	Линија 2
Акумулација Гружа	1	1	-	-	-	-	-	Линија 3
Акумулација Бусур	3	3	-	-	-	-	-	Линија 3
Акумулација Кореница	7	7	-	-	-	-	-	Линија 3
Акумулација Грлиште	9	9	-	-	-	-	-	Линија 3
Акумулација Газиводе	9	9	-	-	-	-	-	Линија 3
Кочевска река	7	-	-	-	-	-	7	Линија 3
Акумулација Блоке	10	-	-	-	-	-	10	Линија 3
Језеро Блед	3	-	-	-	-	-	3	Линија 3
Преспанско језеро	15	-	-	-	-	15	-	Група 1 и 2

\*N – број секвенци

Процена еволуционе дивергенце приказана је у Табели 10, а вредности опсега (минимум и максимум) некоригованих *p*-дистанци унутар и између линија *A. astacus* за повезани скуп података приказане су у Табели 11.

Највећа вредност еволуционе дивергенце забележена је унутар *групе 1* где је средња вредност некориговане *p*-дистанце износила 0,017, а вредности у оквиру ранга су биле од 0,0042 до 0,0294. Са друге стране, најмања вредност еволуционе дивергенце забележена је у оквиру *линије 2* и износила је 0,0024, а кретала се у рангу од 0,00 до 0,0042.



Слика 12. Филогенија врсте *A. astacus* генерисана коришћењем Бајесијанске анализе која је имплементирана у програму BEAST на спојеним *COI* и *16S rRNA* секвенцама. Бројеви на чворовима представљају вредности постериорне вероватноће (*pp*) изнад 0,5. Кодови хаплотипова, линија и група одговарају Schrimpf *et al.*, (2014, 2017), Laggis *et al.*, (2017) и подацима из дисертације (хаплотипови обележени тачкама)

**Табела 10.** Процене еволутивне дивергенције над паровима секвенци. Просечне вредности некоригованих *p*-дистанци унутар и између линија *A. astacus* за спојени скуп секвенци (*COI* и *16S rRNA*)

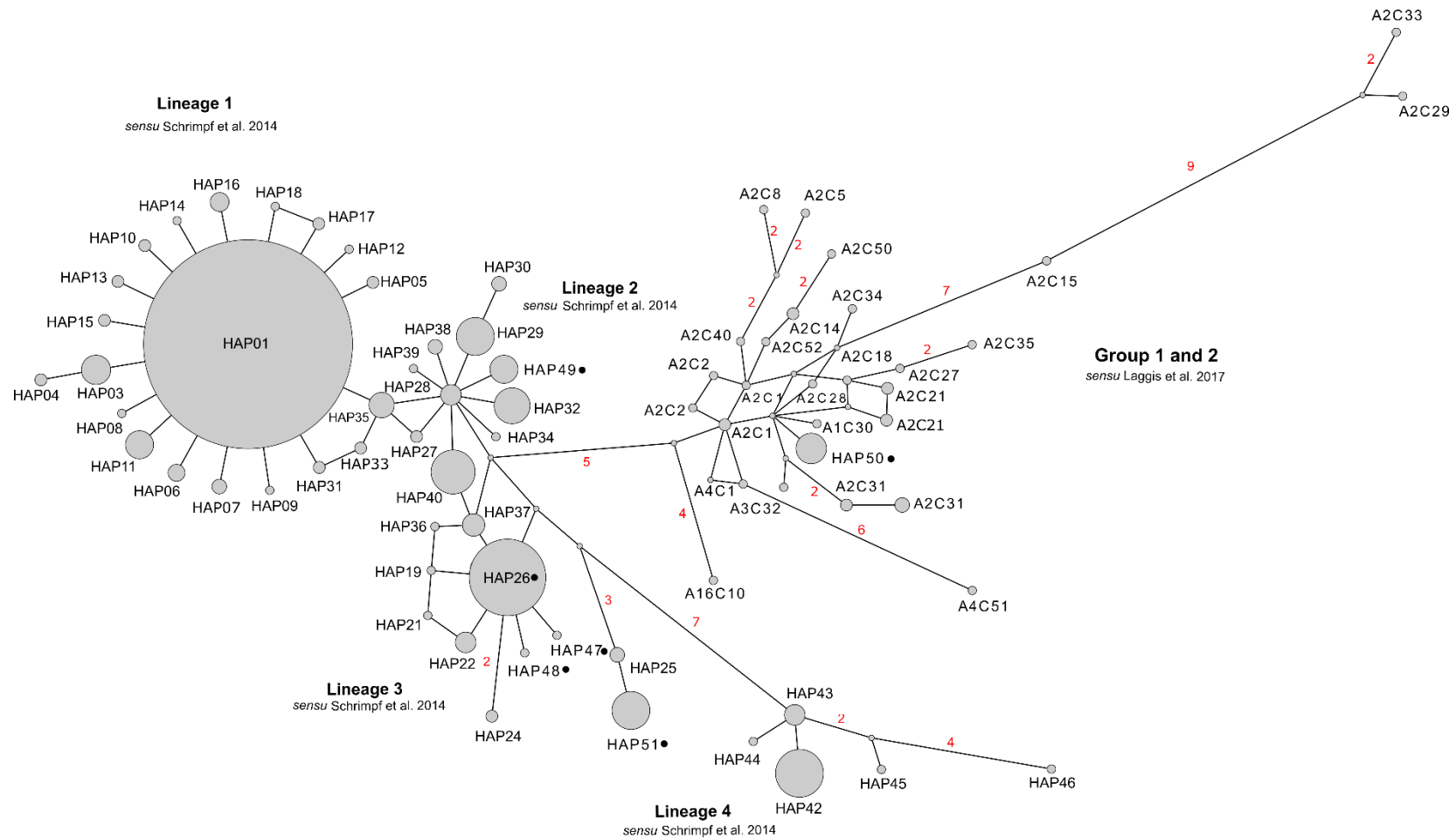
	Линија 1	Линија 2	Линија 3	Линија 4	Група 1	Група 2
Линија 1	0,0040	x	x	x	x	x
Линија 2	0,0054	0,0024	x	x	x	x
Линија 3	0,0064	0,0060	0,0027	x	x	x
Линија 4	0,0154	0,0165	0,0154	0,0050	x	x
Група 1	0,0254	0,0230	0,0242	0,0287	0,0170	x
Група 2	0,0172	0,0149	0,0159	0,0231	0,0170	0,0061

Када су у питању вредности еволуционе дивергенце између *линија* и *група*, највећа вредност забележена је између *групе 1* и *линије 4* и била је 0,0287, а вредности у оквиру ранга су се кретале од 0,0196 до 0,0378. Најмања вредност еволуционе дивергенце забележена је између *линија 1* и *2* и била је 0,0054, а вредности у оквиру ранга су се кретале од 0,0014 до 0,0112.

**Табела 11.** Процене еволутивне дивергенције над паровима секвенци. Вредности опсега (минимум и максимум) некоригованих *p*-дистанци унутар и између линија *A. astacus* за спојени скуп података (*COI* и *16S rRNA*)

	Линија 1	Линија 2	Линија 3	Линија 4	Група 1	Група 2
Линија 1	0,000- 0,0126	x	x	x	x	x
Линија 2	0,0014-0,0112	0,0000-0,0042	x	x	x	x
Линија 3	0,0028-0,0112	0,0014-0,0084	0,0000-0,0056	x	x	x
Линија 4	0,0126-0,0182	0,0126-0,0182	0,0112-0,0196	0,0000-0,0098	x	x
Група 1	0,0168-0,0364	0,0154-0,0336	0,0154-0,0350	0,0196-0,0378	0,0042-0,0294	x
Група 2	0,0112-0,0238	0,0098-0,0210	0,0098-0,0224	0,0182-0,0294	0,0056-0,0308	0,0000-0,0154

Мрежа хаплотипова (енг. **M**edian **J**oining network – MJ network) приказана на слици 13 показује јасно раздвајање између хаплотипова. Број мутационих корака је приказан изнад грана. Највећи број мутационих корака је 14 и уочен је између хаплотипа Нар50 и Нар51, односно између јединки из Албаније и Словеније. Између хаплотипа Нар50 и Нар47/48 је било 11 мутационих корака, а 10 мутационих корака између хаплотипова Нар50 и Нар49. Између хаплотипова Нар51 и Нар49 било је 8 мутационих корака, а између хаплотипова Нар49 и Нар47/48 било их је 5.



Слика 13. Мрежа конструисана (енг. Median joining network) од спојених секвенци *COI* и *16S rRNA*. Број мутацијских корака је приказан изнад гране, осим када је једнак 1. Величина кругова је пропорционална фреквенцији представљеног хаплогена. Кодови хаплогенова, линија и група одговарају Schrimpf et al. (2014, 2017), Laggis et al. (2017) и подацима ове дисертације (хаплогенови обележени тачкама)



### 4.3 Генетичка структура балканских популација

Укупан број алела по популацији је престављен у Табели 12. Највећи број алела је детектован у популацији из реке Качер и износио је 58. У популацијама Грлиште и Газиводе детектован је најмањи број алела, редом, 19 односно 23 алела.

Највећа вредност очекиване хетерозиготности детектована је у популацији из реке Качер и износила је  $H_e = 0,525$  (Табела 13). У овој популацији је и највећа вредност детектоване хетерозиготности  $H_o = 0,539$ , највећи просечан број алела по локусу  $A = 4$  и највеће богатство алела  $A_r = 3,1$ , док је највећи број приватних алела детектован у популацији из Преспанског језера и износио је  $A_{pve} = 12$ . Приватни алели нису детектовани у популацијама из акумулација Кореница, Газиводе и Грлиште, нити у Кочевској реци. Најнижа вредност богатства алела забележена је у популацијама из акумулација Газиводе и Грлиште и износила је  $A_r = 1,4$ . Најнижа вредност очекиване хетерозиготности детектована је у популацији из акумулације Газиводе и износила је  $H_e = 0,118$ , као и најнижа вредност детектоване хетерозиготности  $H_o = 0,125$ , а просечан број алела по локусу у овој популацији износио је  $A = 1,5$ . Вредност просечног броја алела по локусу детектована у популацији из акумулације Грлиште била је најнижа и износила је  $A = 1,4$ .

Табела 12. Укупан број алела по локусу по популацији

Популација/ локус	Кочевска река	Акумулација Блоке	Река Качер	Реснички поток	Акумулација Кореница	Акумулација Газиводе	Акумулација Грлиште	Преспанско језеро
Aast4_2	1	2	3	2	1	3	1	1
Aast4_7	1	3	1	2	1	1	1	2
Aast4_17	3	7	6	4	2	2	1	4
Aast4_42	1	5	7	3	3	1	1	3
Aast4_46	3	5	4	3	3	1	2	2
Aast4_20	3	4	3	4	2	1	2	5
Aast4_32	3	2	4	3	1	1	1	2
Aast4_38	3	3	3	5	3	2	1	1
Aast4_48	2	2	6	5	2	2	1	2
Aast4_16	2	3	6	6	2	1	1	3
Aast4_35	2	2	3	4	3	2	1	1
Aast4_3	1	5	0	4	1	2	1	2
Aast4_19	2	2	3	1	1	1	2	3
Aast4_37	2	3	4	3	2	2	2	2
Aast4_44	2	3	5	3	2	1	1	1
Укупан број алела по популацији	31	51	58	52	29	23	19	34

Табела 13. Вредности интрапопулационе генетичке варијабилности. Плавом бојом су означене највише вредности, а црвеном бојом најниже.

Популација	Држава	Слив	Басен	n	P	A	A <sub>r</sub>	A <sub>pve</sub>	H <sub>e</sub>	H <sub>o</sub>	F <sub>is</sub>	P <sub>HWE</sub>
Реснички поток	Србија	Дунав/Велика Морава	Црног мора	30	0,94	3,7	2,8	8	0,516	0,531	-0,030	NS
Акумулација Кореница	Србија	Дунав/Велика Морава	Црног мора	17	0,75	2,1	2,0	0	0,323	0,283	0,126	NS
Акумулација Газиводе	Србија	Дунав/Велика Морава	Црног мора	26	0,44	1,5	1,4	0	0,118	0,125	-0,063	NS
Акумулација Грлиште	Србија	Дунав/Тимок	Црног мора	13	0,38	1,4	1,4	0	0,135	0,144	-0,036	NS
Река Качер	Србија	Дунав/Сава	Црног мора	29	0,94	4,0	3,1	9	0,525	0,539	-0,027	NS
Акумулација Блоке	Словенија	Дунав/Сава	Црног мора	28	1,00	3,5	2,8	4	0,481	0,475	0,012	NS
Кочевска река	Словенија	Дунав/Купа	Црног мора	14	0,75	2,1	2,0	0	0,332	0,332	0,000	NS
Преспанско језеро	Албанија	Црни Дрим	Јадранског мора	33	0,75	2,4	1,8	12	0,242	0,233	0,040	NS

\*n – број узорака (енг. *number of analysed crayfish*), P – проценат полиморфних локуса (енг. *proportion of polymorphic loci*), A – просечан број алела по локусу (енг. *number of alleles per locus*), A<sub>r</sub> – богатство алела (енг. *allelic richness*), A<sub>pve</sub> – број приватних алела по локусу (енг. *number of private alleles per locus*), H<sub>e</sub> – очекивана хетерозиготност (енг. *expected heterozygosity*), H<sub>o</sub> – детектована хетерозиготност (енг. *observed heterozygosity*), F<sub>is</sub> – коефицијент инбридинга (енг. *inbreeding coefficient*), P<sub>HWE</sub> – значај одступања од Hardy–Weinberg равнотеже (енг. *deviation from Hardy–Weinberg equilibrium*), NS – није сигнификантно (енг. *not significant* ( $p > 0,05$ ))

Анализом молекуларне варијансе (AMOVA) према Weir & Cockerham (1984) утврђена је статистички значајна разлика између и унутар анализираних популација ( $p < 0,001$ ). Укупан проценат варијабилности између популација износио је 73%, док је проценат варијабилности унутар популација био 27% (Табела 14).

**Табела 14.** Анализа молекуларне варијансе (AMOVA) преко матрица дистанци. Степен слободe (df), сума квадрата (SS), средњи квадрат (MS) и статистичка значајност ( $p$ ).

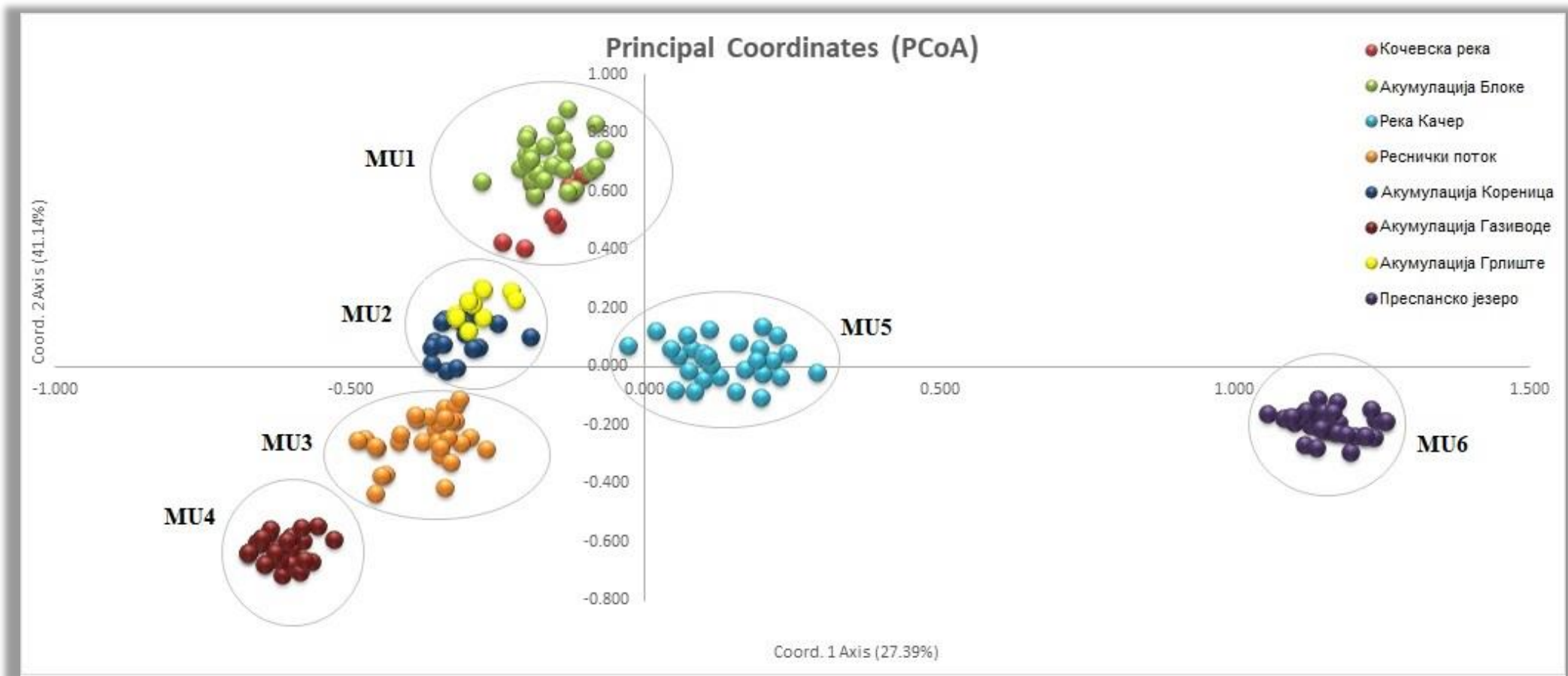
Извор варијабилности	df	SS	MS	Процењена варијаб. %	Укупна варијаб. %	$p$
Између популација	7	2232,814	318,973	13,734	73	< 0,001
Унутар популација	178	921,004	5,174	5,174	27	< 0,001
Укупно	185	3153,817		18,908	100	

У Табели 15 приказане су вредности генетичке удаљености ( $F_{st}$ ) за парове субпопулација и процењене вредности протока гена ( $N_m$ ). По правилу тамо где су најмање вредности генетичке удаљености највеће су вредности процењеног протока гена јер што су популације ближе већа је вероватноћа да долази до парења између јединки, односно до протока гена. Вредности генетичке удаљености су варирале од 0,328 до 0,826, а процењене вредности протока гена од 0,050 до 0,510. Најмање вредности  $F_{st}$  биле су између популација из Ресничког потока и реке Качер (0,328) и између популација из акумулације Блоке и Кочевске реке (0,340), док су највеће вредности  $F_{st}$  биле између популација из акумулације Газиводе и акумулације Грлиште (0,826) и између популација из акумулације Газиводе и Преспанског језера (0,808). Ове резултате су потврдиле и вредности процењеног протока гена које су биле највеће између популација из Ресничког потока и реке Качер (0,510) и између популација из акумулације Блоке и Кочевске реке (0,480), док је најмања вредност забележена између акумулације Грлиште и акумулације Газиводе (0,050).

Табела 15. Вредности генетичке удаљености ( $F_{st}$ ) за парове субпопулација, дијагонално лево и процењене вредности протока гена  $N_m$ , дијагонално десно. Плавом бојом су означене највише вредности, а црвеном бојом најниже.

Популације	Кочевска река	Акумулација Блоке	Река Качер	Реснички поток	Акумулација Кореница	Акумулација Газиводе	Акумулација Грлише	Преспанско језеро
Кочевска река		0,480	0,330	0,290	0,260	0,090	0,100	0.100
Акумулација Блоке	0,340		0,390	0,390	0,260	0,160	0,180	0.140
Река Качер	0,435	0,394		0,510	0,280	0,210	0,260	0.210
Реснички поток	0,456	0,386	0,328		0,380	0,410	0,250	0.150
Акумулација Кореница	0,490	0,487	0,474	0,404		0,120	0,100	0.090
Акумулација Газиводе	0,727	0,612	0,539	0,377	0,670		0,050	0.060
Акумулација Грлише	0,707	0,576	0,491	0,503	0,719	0,826		0.060
Преспанско језеро	0,713	0,643	0,542	0,622	0,728	0,808	0,800	

Индивидуална диференцијација јединки из осам истраживаних популација, урађена анализом главних координата, представљена је дијаграмом расипања на Слици 14. Анализа је открила постојање шест различитих кластера. У посебне кластере су се издвојиле јединке из Преспанског језера, акумулације Газиводе, реке Качер и Ресничког потока. До делимичног преклапања долази код јединки из акумулације Блоке и Кочевске реке, па се оне групишу у оквиру истог кластера, као и јединке из акумулација Кореница и Грлиште.

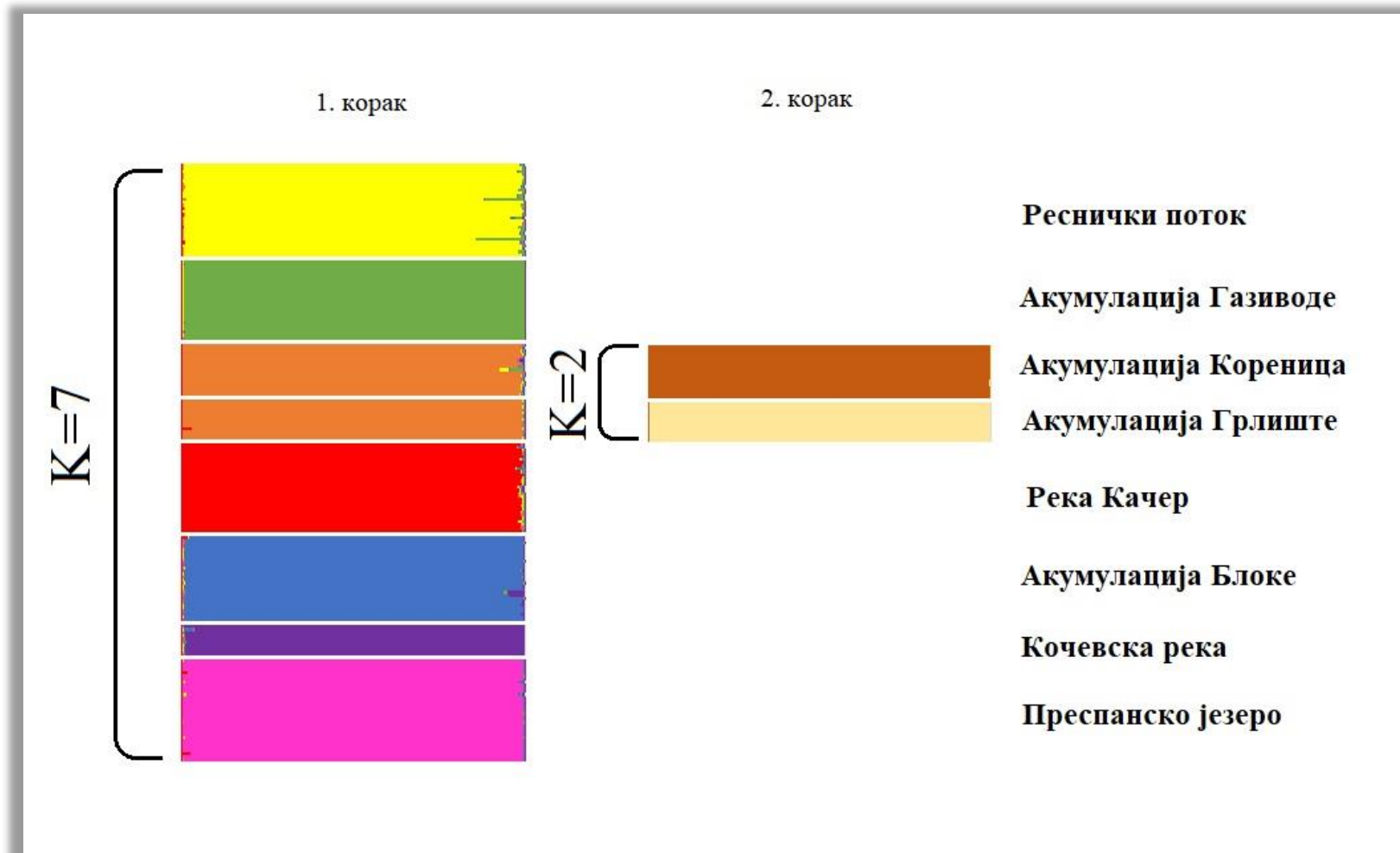


Слика 14. Анализа главних координата (PCoA)

Резултати хијерархијске STRUCTURE анализе за задати број генетичких група К (вредности К су од 1 до 10) су приказани на Слици 15.

Први корак подразумевао је анализу свих 185 јединки и процењени број генетичких кластера у програму *Structure harvester* применом  $\Delta K$  методе (Evanno *et al.*, 2005) био је  $K = 7$ , а вредност  $\Delta K$  била је 28,01. У овом кораку је видно јасно груписање по популацијама, као и корелација између генотипске припадности сваке јединке одређеном кластеру и географског порекла анализираних јединки. Све популације су се груписале у независне кластере сем популација из акумулација Кореница и Грлиште које су се груписале у један кластер, па је други корак подразумевао њихово даље структурирање. Процењен број генетичких кластера у другом кораку био је  $K = 2$ , а вредност  $\Delta K$  била је 373,21 (Табела 2 у Прилогу). Груписање ове две популације у један генетички кластер у хијерархијској STRUCTURE анализи је у корелацији са груписањем ових популација у исти кластер и у анализи главних координата (Слика 14).

Вредности  $\text{LnP}(K)$  (енг. Log Probability Values) за К, на целом узорку, су најниже за вредност  $K = 1$  и  $(-9424,67 \pm 0.58)$ , а највише за вредност  $K = 7$   $(-3842,54 \pm 81,96)$  (Табела 2 у Прилогу).



**Слика 15.** Процењена популациона структура у хијерархијској STRUCTURE анализи микросателитске ДНК. Беле линије раздвајају анализиране популације. Након два корака идентификовано је 8 кластера. На слици је представљен и број генетичких кластера ( $K$ ) добијен  $\Delta K$  методом.



#### 4.4 Процена ризика изумирања и приоритета конзервације истраживаних популација речног рака применом модификованог модела ESHIPPO crayfish

Процене ризика изумирања и приоритета конзервације истраживаних популација речног рака извршена је тестирањем према моделу ESHIPPO crayfish (Табела 16).

**Табела 16.** Приказ бодовања елемената модела ESHIPPO crayfish за процену ризика изумирања и приоритета конзервације истраживаних популација речног рака

	СЛОВЕНИЈА		СРБИЈА					АЛБАНИЈА
	Кочевска река	Акумулација Блоке	Река Качер	Реснички поток	Акумулација Кореница	Акумулација Газиводе	Акумулација Грлиште	Преспанско језеро
Станиште (Hb)	3	3	3	3	3	3	3	3
Исхрана (Dt)	1	1	1	1	1	1	1	1
Репродуктивна стратегија (Rs)	3	3	3	3	3	3	3	3
Животни циклус (Lc)	3	3	3	3	3	3	3	3
Величина тела (Bs)	5	5	5	5	5	5	5	5
Ниво ендемизма (Re)	3	3	3	3	3	3	3	3

Степен угрожености према IUCN	3	3	5	5	5	5	5	3
<b>Укупан резултат ES</b>	<b>21</b>	<b>21</b>	<b>23</b>	<b>23</b>	<b>23</b>	<b>23</b>	<b>23</b>	<b>21</b>
Промена станишта – без фрагментације (H)	3	3	3	3	3	3	3	3
<i>Деструкција</i>	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Фрагментација и изолација станишта</i>	1	3	1	1	3	3	3	3
Инвазивне врсте (I)	3	3	3	3	3	3	3	3
Загађење (P) - <i>Еутрофизација</i>	3	3	3	3	3	3	3	5
<i>Сапробност</i>	1	1	1	1	1	3	3	3
<i>Токсичност</i>	1	1	1	1	1	3	1	1
<i>Ацидификација</i>	1	1	1	1	1	3	1	3
<i>Радиоактивност</i>	1	1	1	1	1	1	1	1
Демографски раст становништва (P)	1	1	1	1	1	3	3	3
Претерана експлоатација (O) - антропогена	1	1	1	1	1	1	1	5
природна	1	1	1	1	1	1	1	1

<b>Укупан резултат HIPPO</b>	<b>18</b>	<b>20</b>	<b>18</b>	<b>18</b>	<b>20</b>	<b>28</b>	<b>24</b>	<b>32</b>
Филогенија	1	1	1	1	1	1	1	1
Коефицијент инбридинга ( $F_{is}$ )	3	5	1	1	5	1	1	5
Морфометрија (mf)	3	3	3	3	3	3	3	3
% полно зрелих женки	3	3	1	1	1	3	3	3
Старосна и популациона структура	3	3	3	3	3	3	3	3
<b>Укупан резултат ILAP</b>	<b>13</b>	<b>15</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>13</b>	<b>11</b>	<b>11</b>	<b>15</b>
<b>ES + HIPPO + ILAP</b>	<b>52</b>	<b>56</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>56</b>	<b>62</b>	<b>58</b>	<b>68</b>
<b>Степен приоритета конзервације</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>

На основу укупног броја бодова добијених бодовањем еколошке специјализације врсте, угрожавајућих фактора диверзитета и индекса локалне прилагођености популација ракова, процењен је ризик изумирања истраживаних популација, а затим и одређен приоритет конзервације на националном нивоу. Највише бодова је имала популација из Преспанског језера (68) и популација из акумулације Газиводе (62) и код њих је одређен степен приоритета заштите **1**, односно висок ниво ризика од изумирања на националном

нивоу. Умерени ризик од изумирања, односно степен приоритета заштите **2**, одређен је за популације из акумулација Грлиште (58), Кореница (56), Блоке (56) и за Кочевску реку (52). Степен приоритета заштите **3** карактерише малу вероватноћу изумирања врсте на националном нивоу и констатован је код популација из реке Качер (50) и код популације из Ресничког потока (50).

## **5. Дискусија**

Речни рак је најцењенији слатководни рак у Европи, познат и под именом племенити рак (Policař & Kozák, 2015). Вековима се узгаја у астаци култури, цењена је храна и врло је битан у економском смислу (Schulz *et al.*, 2004). Вероватно је био предмет размене, трговине и зоолошких проучавања више од 2000 година (Skurdal & Taugbøl, 2002). Као значајна трговинска врста преношен је широм Европе, па се сматра да су му оригинални филогеографски обрасци значајно промењени. Познато је да је ова врста осетљива на промене у станишту, на алохтоне врсте са којима је у конкуренцији за храну и животни простор, а посебно на патогене попут *Aphanomyces astaci* (Schikora, 1906), узрочника рачје куге (Adamkowska *et al.*, 2018). Речни рак дефинисан је као рањива врста и стављен је на Црвену листу угрожених врста Међународне уније за конзервацију природе, док у неким земљама, попут наше, има статус строго заштићене врсте (Službeni glasnik RS, 2016).

Речни рак има комплексан историјски и генетички статус у оквиру ареала распрострањења. Његова дивергенција је обликована геолошким догађајима и антропогеним утицајима, пре свега деградацијом његове еколошке нише (Laggis *et al.*, 2017).

Климатске промене током Квартара, нарочито током последњег леденог максимума (енг. **L**ast **G**lacial **M**aximum - LGM), утицале су на демографску историју, генетичку разноликост и распрострањеност многих врста (Hewitt, 2000, 2004; Abellán *et al.*, 2012). Сматра се да су хладни периоди током Квартара у Европи снажно утицали на дистрибуцију интраспецифичних генетских варијација и биљака и животиња (Taberlet *et al.*, 1998). Распрострањености током претходних климатских догађаја, као што су глацијације које су доминирале у плеистоценској епохи (Willis & Niklas, 2004), дају драгоцене увиде о стопама миграција и отпорности популација (Maggs *et al.*, 2008).

Балканско, Апенинско и Иберијско полуострво су представљали главне плеистоценске рефугијуме у Европи (Hewitt, 2011), а Балканско полуострво је играло важну улогу у реколонизацији источних и западних делова Европе (Hewitt, 1999). Према првим претпоставкама речни рак је последњу глацијацију преживео на Балканском полуострву (Albrecht, 1983), одакле је касније највероватније ишла реколонизација Европе преко дунавског дренажног система (Schrimpf *et al.*, 2011, 2014).

Укупна људска активност, у виду транслокација и реинтродукција, како аутохтоних, тако и алохтоних врста ракова, довела је до деградације природне генетичке структуре популација речног рака, до мешања и губитка популација широм Европе (Souty-Grosset & Reynolds, 2009; Schrimpf *et al.*, 2011, 2014; Gross *et al.*, 2013, 2016; Makkonen *et al.*, 2015). Познато је да су транслокације организама и мењање природних станишта најчешћи узроци хибридизације и интрогресије алохтоних гена у аутохтоне популације (Allendorf *et al.*, 2001). Интродуковане, а посебно инвазивне врсте, могу деловати индиректно мењањем услова станишта и уношењем нових и непознатих обољења у популацију или директно, предаторством и конкуренцијом (Тошић, 2016). Популације угрожених врста у природним стаништима суочавају се са сталним стресом који је последица климатских промена, загађења, конкуренције, унетих предатора/алохтоних врста и нових или измењених болести (Frankham, 2005).

Неопходно је познавати генетичку структуру врсте како би било могуће сачувати њен интегритет и унутар специјски диверзитет (Schrimpf *et al.*, 2014). Ово је од посебног значаја за угрожене и експлоатисане врсте јер се тако могу добити важне информације о постојању рањивих или јединствених субпопулација, које се истовремено могу користити приликом планирања активности управљања попут поновног успостављања популација или програма унапређења (Gross *et al.*, 2013). Генетичка варијабилност је од суштинског значаја за осигурање еволуционог потенцијала врсте, а очување је предуслов за ефикасну конзервацију и одрживо коришћење (Allendorf *et al.*, 2008). Комбинација филогенетских информација и степена угрожености врсте омогућава конзервационом биологу да доносе одлуку о приоритету очувања (Owen *et al.*, 2015). Генетички подаци су фундаментални за развијање ефикасних конзервационих стратегија (Klobučar *et al.*, 2013).

Спроведена истраживања су имала за циљ да се добију информације о морфолошкој диференцијацији, филогенетичкој и популационој структури популација речног рака на истраживаном подручју, као и да се процени ризик изумирања и дефинишу конзервационе мере.

## 5.1. Морфометријске анализе балканских популација речног рака

Морфометрија је квантитативни начин описивања и поређења различитих облика који је одувек интересовао биологе (Zelditch *et al.*, 2004). Она истражује проблем облика и величине морфолошких целина уз помоћ статистичких метода (Ivanović & Kalezić, 2013). Традиционална (линеарна) морфометрија се заснива на мерењу дистанци, углова и површина делова неког организма (Adams *et al.*, 2004). Мултиваријантна статистичка анализа морфометријских карактера се показала као корисна за квантификацију величине и облика организама (Klingenberg, 2002) и као добра техника за истраживање географских варијација истих (Palma & Andrade, 2002). Ова метода је погодна јер није инвазивна, нити скупа и лако се може применити на терену. Квантификација специфичних карактеристика индивидуа, или група/популација, може показати степен специјације индукован и биотичким и абиотичким факторима и допринети дефиницији тих разлика (Palma & Andrade, 2002). Генерално, морфолошка диференцијација може бити последица генетских разлика или последица прилагођавања јединки условима животне средине или последица њихове интеракције (Pakkasmaa & Piironen 2001). Сваки генотип у оквиру своје реакционе норме у стању је да одговори на промене у окружењу, степен ове фенотипске пластичности може да се разликује између индивидуа (Agerberg, 1993).

Прве студије о биогеографији и таксономији речног рака су засноване на морфометријским карактеристикама (Karaman S., 1929; Bott, 1950, 1972; Karaman M. S., 1962, 1963; Albrecht, 1983). Истраживања Saila & Flowers (1969), Chambers *et al.* (1979), Sint *et al.* (2005, 2006, 2007), Maguire & Dakić (2011) су показала да су анализе великог броја морфометријских карактера по индивидуи добар метод за раздвајање група декапода, што није било могуће постићи анализом само неколико морфометријских карактера (Grandjean & Souty-Grosset, 2000b). Морфометријска карактеризација је такође успешно примењена код слатководних и морских риба (Pakkasmaa & Piironen, 2001; Palma & Andrade, 2002).

У овој тези по први пут је детаљно анализиран велики број морфолошких карактера по индивидуи речног рака, укупно 22. Анализе су спроведене на 10 популација (308 јединки) из водених екосистема Србије, Словеније и Албаније како би се утврдило да ли између њих постоје разлике.



Најпре је констатован полни диморфизам, због алометријског раста одраслих јединки (Jelić, 2014), забележен и у претходним морфолошким истраживањима ракова (Grandjean *et al.* 1997; Grandjean & Souty-Grosset 2000b; Sint *et al.*, 2005, 2006, 2007; Maguire & Dakić, 2011). Морфолошка диференцијација јединки по локалитетима је присутна. Добијени резултати мултиваријантне дискриминантне анализе су показали да постоје разлике између популација мужјака, и између популација женки, у измереним морфометријским карактеристикама. Те разлике би могле да одражавају географску удаљеност, слично налазима Sint *et al.* (2005) и Maguire & Dakić (2011) за друге врсте ракова, али и генетичку диференцијацију јер су се детектовани хаплотипови распоредили у оквиру различитих *линија* и *група* (Табела 9, Слика 13).

Слично горе наведеним студијама, открили смо да се мужјаци разликују у више карактера од женки. Карактер који је највише допринео разликовању мужјака из различитих популација била је тежина, што се разликује од претходних студија. С друге стране, дискриминацији између популација женки највише су допринели карактери ABL, CLL и CLW, као и у студији Maguire & Dakić (2011) за друге врсте ракова.

У овом истраживању, мере карапакса (HEW, ROW, CGW, CPW, CEW) значајно су допринеле дискриминацији између популација мужјака и између популација женки, јер су имале највеће вредности у првој и другој дискриминацијској функцији. Предност мера карапакса је њихова ригидност јер нису под утицајем губитка и регенерације, као што је случај са клештима, нити су под утицајем контракција мишића абдомена (Sint *et al.*, 2005).

Забележене морфометријске разлике међу популацијама из Србије су биле изражене. Ове разлике могу бити резултат изолације популација јер према резултатима Simić *et al.* (2008) у периоду од 1960. до 2006. године територија коју је речни рак насељавао у Србији је смањена за више од 65% и регистроване су само изоловане популације. Овоме је сигурно допринела и деградација станишта, загађење и болести, а можда и експанзивно понашање барског рака који потискује речног рака у неким стаништима (Cukerzis, 1988; Simić *et al.*, 2008; Maguire *et al.*, 2018). Истраживања Stucki & Romer (2001) указују да је барски рак агресивнији и доминантан у агонистичким интеракцијама, а агресивнији је и сигнални рак,

*Pacifastacus leniusculus*, који у већини случајева елиминира речног рака кроз предацију и конкурентско искључивање (Söderbäck, 1991; Holdich *et al.*, 1995).

Теорија популационе генетике предвиђа да мале изоловане популације са малим протоком гена карактеристично показују ниску генетичку разноликост унутар популација и високу генетичку диференцијацију међу популацијама (Grandjean & Souty-Grosset, 2000a). Ово је потврђено у докторској дисертацији јер је анализом молекуларне варијансе (AMOVA) утврђено 73% варијабилности између популација (Табела 14). Претпоставља се и да ће се репродуктивно изоловане популације генетички раздвојити због генетичког дрифта и селекције (Agerberg, 1993).

У овој докторској дисертацији, проценат правилно класификованих примерака/јединки био је већи него што је забележено у истраживањима Sint *et al.* (2005), али сличан подацима из истраживања Maguire & Dakić (2011). Што је већи проценат правилне класификације у дискриминантној анализи, већа је дистанца између популација. Добијени резултати су показали да је највећа дистанца између популација мужјака из Словеније и свих осталих популација што је и разумљиво обзиром на географску удаљеност између њих и губитак повезаности (Santos & Araújo, 2015). Филогенетички резултати потврђују резултате морфометријских анализа с обзиром да се популације из Словеније издвајају у посебну грану у оквиру линије 3 (Слика 13), док су популације из Србије распоређене у оквиру линије 2 и линије 3 (према Schrimpf *et al.*, 2014), а популација из Преспанског језера је у групи 1 и 2 (према Laggis *et al.*, 2017) (Слика 12).

Када је реч о популацији женки, највећа дистанца постоји између популација из Преспанског језера, акумулације Кореница и Ресничког потока. Ово може бити последица географске удаљености, а делимично одражава и разлике у стаништима које јединке насељавају.

Добро је познато да организми теже да се прилагоде условима свог специфичног окружења, а ове адаптације могу утицати и на генотип и на фенотип организма (Swain & Foote, 1999). Морфометријске разлике у овој дисертацији могу бити последица разлика у геному речног рака или се могу приписати његовој фенотипској пластичности. Део разлика може бити последица различитих водених екосистема које насељавају - нпр. језера и акумулације у односу на реке и потоке и утицаја локалних срединских фактора (Santos & Araújo, 2015). Фактори животне

средине могу узроковати фенотипску пластичност, која представља способност генотипа да производи различите фенотипове у различитим условима животне средине (Agerberg, 1993; Pakkasmaa & Piironen 2001). Фенотипске варијације међу популацијама нису нужно повезане са варијацијама у геному, али могу указивати на продужено одвајање, а самим тим и на почетак диференцијације (Swain & Foote, 1999). Фенотипске варијације погодније су за анализирање краткорочних ефеката и тренутних одвајања, него генетичке методе Морфометријска мерења у комбинацији са мултиваријантном анализом добар су алат за истраживање разлика између појединих група организама.

## 5.2 Филогенетичке и популационе анализе балканских популација речног рака

До недавно, знање о интра-специфичној генетичкој разноликости речног рака је било прилично ограничено и генетска позадина ракова је ретко разматрана при избору материјала за реинтродукцију, узгој у астаци култури, или узгој у заточеништву (Gross *et al.*, 2016).

Прва велика филогенетичка студија речног рака (Schrimpf *et al.*, 2011) која је покрила централну и југоисточну Европу урађена је помоћу само једног генетичког маркера, *COI* гена митохондријалне ДНК, и показала је да постоје разлике у генетичком диверзитету између главних сливова река и да је највећи диверзитет хаплотипова ( $H_d = 0,794 \pm 0,024$ ) и велики број приватних хаплотипова детектован у популацијама са подручја Балкана. Популационо генетичке студије спроведене на различитим врстама, указују на то да је Балкан био један од главних рефугијума током последњег леденог доба и један од најважнијих извора постгласијалне реколонијације Европе за бројне животињске врсте (Veličković, 2014). У студији Schrimpf *et al.* (2011) веома низак диверзитет хаплотипова у централној Европи ( $H_d = 0,299 \pm 0,038$  у сливу Северног мора и  $H_d = 0,163 \pm 0,058$  у сливу Балтичког мора) објашњен је као могућа последица транслокација под антропогеним утицајем и/или ефекта оснивача постгласијалне реколонијације.

У овој дисертацији детектовано је шест хаплотипова у оквиру 15 истраживаних популација. Резултати одговарају резултатима филогенетских студија

Schrimpf *et al.* (2014) и Laggis *et al.* (2017) јер су се хаплотипови распоредили у оквиру већ описаних филогенетских линија и група. До сада детектована хаплотипска разноликост речног рака у складу је са широким географским распрострањењем врсте на подручју Европе (Kouba *et al.*, 2014; Laggis *et al.*, 2017). Диверзитет *COI* хаплотипова ( $Hd = 0,610$ ) детектован у овој дисертацији био је већи у односу на диверзитет детектован у студији Schrimpf *et al.* (2014) ( $Hd = 0,548$ ), а мањи од вредности детектоване у студији Laggis *et al.* (2017) ( $Hd = 0,985$ ). Исто је и са диверзитетом 16S хаплотипова јер је диверзитет детектован у дисертацији био већи ( $Hd = 0,585$ ) него у студији Schrimpf *et al.* (2014) ( $Hd = 0,410$ ), а мањи од вредности у студији Laggis *et al.* (2017) ( $Hd = 0,686$ ). Вредност диверзитета хаплотипова за читав скуп узорака, односно за спојене мтДНК секвенце, ( $Hd = 0,665$ ) био је незнатно већи од диверзитета у студији Schrimpf *et al.* (2014) ( $Hd = 0,626$ ). При томе треба нагласити да су вредностима диверзитета хаплотипова у студији Schrimpf *et al.* (2014) највише допринеле високе вредности диверзитета популација из слива Црног мора ( $Hd = 0,851$ ), затим из слива Јадранског мора ( $Hd = 0,576$ ), а знатно мање вредности из Северног и Балтичког мора ( $Hd = 0,316$ ,  $Hd = 0,276$ , редом). Претпоставка да се ниво генетичког диверзитета смањује од југа ка северу (Hewitt, 1999, 2000) потврђена је досадашњим студијама (Schrimpf *et al.* 2011, 2014; Makkonen *et al.*, 2015; Laggis *et al.*, 2017), као и овом истраживањем. Јужни делови Европе, укључујући полуострва, су планински, а њихова разноврсна топографија је обезбедила погодна и разноврсна станишта (рефугијуме) да врсте преживе климатске осцилације (Hewitt, 1996). Дистрибуција слатководних организама је повезана са хидрогеографском историјом предела (Verovnik *et al.*, 2005), а тренутни образац дистрибуције слатководних животиња, према Klobučar *et al.* (2013) више је обликован пре-плеистоценским променама речних сливова, но климатским променама у Плеистоцену.

У популацијама са територије Словеније и Албаније детектован је по један хаплотип - Нар51 и Нар50, редом, а у истраживаним популацијама са територије Србије (њих једанаест) детектована су четири хаплотипа Нар26, Нар47, Нар48 и Нар49. Ова диференцијација унутар једне државе слична је субструктурираности естонских популација, која је детектована анализом микросателита у студији Gross *et al.* (2013), а коју су дефинисали као последицу ограниченог протока гена или генетичког дифта. Само су у популацији из Петровачке реке детектована два хаплотипа, Нар26 и Нар47.

Популационе анализе су урађене на осам популација и анализирана је полиморфност 19 тетрануклеотидних микросателитских локуса. Средње вредности генетичке разноликости микросателитских локуса добијене у овој дисертацији се знатно разликују између истраживаних популација. Највећа генетичка варијабилност је детектована код популације из реке Качер. У овој популацији су детектоване највеће вредности за просечан број алела по локусу ( $A = 4,0$ ), богатство алела ( $A_r = 3,1$ ), очекивану хетерозиготност ( $H_e = 0,525$ ) и детектовану хетерозиготност ( $H_o = 0,539$ ) међу свим испитиваним популацијама. Такође, вредности просечног броја алела по локусу, очекиване и детектоване хетерозиготности су веће од вредности детектованих у студији Gross *et al.* (2016) рађеној на тетрануклеотидним микросателитским локусима на узорцима из Чешке и Естоније. Ако се упореде до сада урађене микросателитске студије на речном раку веће вредности очекиване хетерозиготности су детектоване у две популације које су проучавали Schrimpf *et al.* (2014) (0,550 и 0,531) и седам популација које су проучавали Laggis *et al.* (2017) (вредности од 0,559 до 0,761). Међутим, мора се имати на уму да су студије Gross *et al.* (2013), Schrimpf *et al.* (2014) и Laggis *et al.* (2017) рађене на динуклеотидним локусима који имају већу стопу мутације у поређењу са тетрануклеотидним локусима што се и показало у ранијим студијама за друге врсте ракова и друге организме (Chakraborty *et al.*, 1997; Schug *et al.*, 1998; Jelić, 2014). Знање о стопи мутације омогућава процену времена дивергенције између врста и ефективне величине популација врста (Vigouroux *et al.*, 2002).

Најнижа генетичка варијабилност детектована је у популацији из акумулације Газиводе ( $H_e = 0,118$ ) и у популацији из акумулације Грлиште ( $H_e = 0,135$ ). Ове вредности су међу најнижима у односу на све претходне популационе студије. Једине ниже вредности забележене су у студији Gross *et al.* (2016) у три популације: енг. *Mustoja* ( $H_e = 0,095$ ), енг. *Aheru* ( $H_e = 0,109$ ) и енг. *Laugi* ( $H_e = 0,116$ ). Разлози овако ниске генетичке варијабилности нису у потпуности јасни, јер не постоје доступни подаци о истраживањима популација ракова у горе наведеним екосистемима. Један од разлога може бити модификација природног окружења и фрагментација станишта због изградње брана и формирања акумулација (Souty-Grosset *et al.*, 2006). Фрагментација ограничава проток гена између популација и утиче на структурираност популација слатководних врста (Grandjean & Souty-Grosset, 2000a). Она може изазвати смањење ефективне величине популације које би водило или

ефекту оснивача или генетичком дрифту, а све заједно екстинцијском вортексу (Gilpin & Soulé, 1986). Нижи диверзитет није нужно резултат ефекта уског грла и може одражавати повећани генетички дрифт у односу на популације пре ефекта фрагментације (Bonhomme *et al.*, 2008). Одржавање варијабилности је јако битно јер омогућава врсти да се прилагоди променљивим условима окружења (Kozák *et al.*, 2011). Показало се да губитак генетичке варијабилности има негативне ефекте на карактере повезане са кондицијом (Kincaid, 1983). Генетички фактори утичу на ризик од изумирања јер угрожене врсте имају малу и/или популацију у опадању, а код таквих популација неизбежно је парење у сродству и губитак генетичког диверзитета (Frankham, 2005).

Загађење животне средине, такође, може значајно утицати на генетички диверзитет природних популација и то повећањем стопе мутација, селекцијом толерантних генотипова и изазивањем миграција (Van Straalen & Timmermans, 2002). Река Ибар, на којој је акумулација Газиводе, једна је од загађенијих у Србији и то из површинских рудника лигнита, термоелектране у Обилићу, фабрике суперфосфата у Косовској Митровици и рударско-металуршког система Трепча (Milošković, 2016). Ово може објаснити лошу ситуацију у популацији из акумулације Газиводе (Табела 13).

У три истраживане популације (акумулација Кореница, акумулација Блоке и Преспанско језеро) очекивана хетерозиготност на нивоу испитиваних локуса је већа од детектоване хетерозиготности, што указује да у популацији има више хомозиготних индивидуа у односу на Hardy-Weinbergovu равнотежу. Како бисмо установили просечно одступање од равнотеже унутар популације чији је узрок међусобно укрштање израчунат је коефицијент инбридинга ( $F_{is}$ ). Коефицијент инбридинга једнак је пропорционалном губитку генетичке разноликости (Frankham, 2005). Вредности инбридинг коефицијента у докторској дисертацији кретале су се у рангу од  $-0,063$  до  $0,126$ . У четири популације детектоване су негативне вредности што нам говори о хетерозиготности индивидуа у истима (Табела 13). У популацији из Кочевске реке вредност коефицијента је  $F_{is} = 0$  што значи да је популација у равнотежи, односно очекивана и детектована хетерозиготност је једнака. Како су вредности коефицијента у популацијама из акумулације Блоке, Преспанског језера и акумулације Кореница незнатно веће од нуле ( $0,012$ ;  $0,040$ ;  $0,126$ ) може се закључити да инбридинг постоји, али још увек није значајно заступљен, тако да је варијабилност

на унутарпопулационом нивоу и даље значајна (Maksimović, 2015). Иначе, инбридинг има штетне последице на све аспекте репродукције и преживљавања, укључујући производњу сперме, плодност женки, способност парења, преживљавање јувенилних јединки, достизање полне зрелости и опстанак адултних животиња (Frankham, 2005).

Вредности броја приватних алела по локусу у популацији из Преспанског језера ( $A_{pve} = 12$ ) и из реке Качер ( $A_{pve} = 9$ ) биле су највеће детектоване вредности у поређењу са до сада објављеним популационим студијама (Gross *et al.*, 2013, 2016; Schrimpf *et al.*, 2014; Laggis *et al.*, 2017). Различита генетичка структура популација са ендемичним хаплотиповима и присуство приватних алела указују на подручја која су била рефугијуми за речног рака (Schrimpf *et al.*, 2014). Популација из Преспанског језера осим високе вредности броја приватних алела има нешто ниже вредности богатства алела ( $A_r = 1,8$ ), те очекиване ( $H_e = 0,242$ ) и детектоване хетерозиготности ( $H_o = 0,233$ ). Према Maggs *et al.* (2008) популације које би преживеле у мањим рефугијумима и прошле кроз ефекат „уског грла” би се карактерисале малим генетичким диверзитетом, али би требале да имају већи ендемични диверзитет (већи број приватних алела).

Са друге стране у половини истраживаних популација нису детектовани приватни алели, а познато је да континуирана ерозија генетичке структуре, укључујући губитак јединствених алела, може значајно смањити способност врсте да се прилагоди будућим променама у окружењу (Gross *et al.*, 2013).

Резултати хијерархијске AMOVA (Табела 14) показују значајно већи проценат варијабилности између анализираних популација (73%), него унутар популација (27%). Ово се потпуно разликује од резултата студије Schrimpf *et al.* (2014) где је проценат варијабилности између анализираних популација био 29.85%, а проценат варијабилности унутар популација 54.26%.

Највеће вредности генетичке удаљености ( $F_{st}$  вредности у Табели 15) између парова популација у овој дисертацији детектоване су између популација из акумулације Грлиште и акумулације Газиводе ( $F_{st} = 0,826$ ) и између популација из Преспанског језера и акумулације Газиводе ( $F_{st} = 0,808$ ). Оне су уједно биле и највеће детектоване вредности у односу на до сада објављене популационе студије ( $F_{st} = 0,500$  Gross *et al.*, 2013;  $F_{st} = 0,723$  Schrimpf *et al.* 2014;  $F_{st} = 0,749$  Laggis *et al.*, 2017). Овако високе вредности генетичке удаљености у овој дисертацији говоре о високом нивоу

генетичке диференцијације анализираних популација и непостојању протока гена. Најнижа вредност генетичке удаљености је детектована између популација из Ресничког потока и реке Качер ( $F_{st} = 0,328$ ), а пропорционално томе највеће вредности протока гена  $N_m = 0,510$  детектоване су између ових популација. Најнижи проток гена  $N_m = 0,050$  детектован је између популација из акумулације Грлиште и акумулације Газиводе што је у складу са највишим вредностима  $F_{st}$  између тих популација.

Хијерархијска STRUCTURE анализа је показала јасну структурираност анализираних популација у седам различитих кластера већ у првом кораку. Једино су се јединке из акумулације Кореница и акумулације Грлиште груписале заједно, али су и оне у другом кораку јасно раздвојене. Резултати STRUCTURE анализе у потпуности одговарају географском пореклу анализираних популација и врло су слични резултатима добијеним у анализи главних координата која је представљена дијаграмом расипања (Слика 14). На дијаграму се види јасно раздвајање између популација из Преспанског језера, акумулације Газиводе, реке Качер и Ресничког потока, а до делимичног преклапања је дошло између јединки из акумулације Блоке и Кочевске реке, као и између јединки из акумулација Кореница и Грлиште. Ово преклапање се може објаснити малом географском удаљеношћу између истраживаних локалитета.

Резултати приказани у овој дисертацији дају информације о морфолошкој диференцијацији, генетичком диверзитету и структури популација речног рака на истраживаном подручју Балканског полуострва.

### 5.3 Процена ризика изумирања и могуће конзервационе мере

Конзервација аутохтоних популација ракова је препозната као неопходност у многим европским земљама јер се у њиховим слатководним екосистемима запажа континуирано опадање популација (Gherardi & Holdich, 1999; Sint & Füreder, 2004; Holdich *et al.*, 2009, Zimmerman, 2012). Тренутно препоручене конзервационе стратегије за очувања аутохтоних врста ракова разликују се од државе до државе, а разликују се и у односу на врсте ракова.



Концептуални модел за конзервацију аутохтоних ракова који су развили Taugbøl & Skurdal (1999), а модификовали Holdich *et al.* (2009), сугерише да одређивање дистрибуције аутохтоних и алохтоних врста представља први и битан корак за било које специфичне акције менаџмента/управљања. Зато је потребно детаљно познавање дистрибуције и статуса популација у свакој земљи (Hudina *et al.*, 2011). Ефикасна конзервациона стратегија захтева не само еколошке податке, већ и познавање генетичке структуре популација, а уобичајено се користе молекуларни маркери за идентификацију значајних еволуционих јединица (енг. Evolutionary Significant Units - ESU) или управљачких јединица (енг. Management Units - MU) (Avice, 2000; Moritz, 1994; Grandjean & Souty-Grosset, 2000a). Стабилна генетичка структура и задовољавајући степен генетичке варијабилности представљају полазну основу за дефинисање адекватне стратегије конзервације (Maksimović, 2015).

Kozák *et al.* (2011) су покушали да резимирају најбоље праксе тренутних конзервационих стратегија, као и предности и недостатке примењених алата и приступа за европске аутохтоне врсте ракова. Истакнути су различити приступи конзервације речног рака и врста рода *Austropotamobius* као што су генетичка разноврсност, узгој у заточеништву, порекло и особине материјала за реинтродукцију, оснивање нових популација, као и дугорочни циљеви уточишта или „арки”.

Реинтродукција речног рака представља честу конзервациону меру (Šmietana *et al.*, 2004; Sint & Füreder, 2004; Taugbøl, 2004; Taugbøl & Peay, 2004; Jussila *et al.*, 2008; Erkamo *et al.*, 2010; Kozák *et al.*, 2011). Реинтродукције аутохтоних врста ракова нису дозвољене у неколико европских земаља (Kozák *et al.*, 2011) премда су предложене као кључни део стратегија управљања и конзервације у Европи (Schulz *et al.*, 2000; Souty-Grosset & Reynolds, 2009) које би могле или помоћи у заштити у случају угрожених врста или у одрживости њихове потенцијалне комерцијалне експлоатације. Аутори предлажу интегрисање знања о популационој генетици у нове принципе конзервационих стратегија. Према Schrimpf *et al.* (2014) у пројектима реинтродукције речног рака, донаторску популацију треба бирати на основу њених локалних генетичких карактеристика да би се сачувала максимална генетичка разноликост.

Применом ESHIPPO crayfish модела утврђен је први степен приоритета заштите, односно висок ризик од изумирања, за популације из Преспанског језера и акумулације Газиводе. Потребно је одмах предузети адекватне мере заштите ових популација. Стање популације из Преспанског језера је могуће објаснити великим риболовним притиском пошто је на језеру уобичајен излов ракова у конзумне сврхе. Притисак долази и од загађења што из домаћинстава, а значајним делом и из индустрије (посебно са македонске стране језера): прехранбене, текстилне и хемијске индустрије, затим из погона за обраду метала, прераду дрвета и израду керамике (Krstić, 2012). Лоше стање популације из акумулације Газиводе могуће је објаснити, већ поменути, загађењем из рударско-металуршког система Трепча, термоелектране у Обилићу, фабрике суперфосфата у Косовској Митровици (Milošković, 2016), отпадних вода из домаћинстава и различитих индустријских постројења, те из неколико депонија (Elezovic *et al.*, 2018). За популације из акумулација Блоке, Кореница и Грлиште и популацију из Кочевске реке одређен је степен приоритета заштите 2, односно умерени ризик од изумирања, па је неопходно праћење стања ових популација у циљу њихове заштите и очувања.

На основу генетичких маркера коришћених у дисертацији, те урађених анализа било је могуће дефинисати еволуционо значајне јединице (ESUs), а по узору на рад Schrimpf *et al.* (2017) одредити и јединице управљања (MUs) дефинисане по Moritz (1994). Могуће је издвојити бар четири еволуционо значајне јединице: (1) популација из Преспанског језера (Нар51, Група 1 и 2), (2) популације из Кочевске реке и акумулације Блоке (Нар51, посебна грана у оквиру *Линије* 3), (3) популација из реке Качер (Нар49, *Линија* 2) и (4) популације из Ресничког потока и акумулација Газиводе, Кореница и Грлиште (Нар26, *Линија* 3). У будућим конзервационим пројектима неопходно је спречити мешање генетичког материјала из ових популација, поготово ако нису унутар исте ESU.

Резултати анализе главних координата (PCoA) (Слика 14) и STRUCTURE анализе (Слика 15) показују јасну диференцијацију индивидуа истраживаних популација и скоро да се преклапају. Популације из Ресничког потока, акумулације Газиводе, реке Качер и Преспанског језера су се издвојиле у посебне кластере и представљају посебне јединице управљања (MU3, MU4, MU5 и MU6, редом), док су популације из Кочевске реке и акумулације Блоке издвојене у посебан кластер и

представљене као посебна јединица управљања (MU1), што је случај и са популацијама из акумулација Кореница и Грлиште (MU2).

С обзиром на то да је код популација из Ресничког потока и реке Качер детектован највећи ниво генетичке варијабилности требамо их третирати са посебном пажњом због њиховог великог генетичког потенцијала који би могао бити кориштен у будућим конзервационим акцијама. Са друге стране, ниска генетичка варијабилност детектована у популацијама из акумулација Газиводе и Грлиште може озбиљно утицати на будући опстанак популација услед смањене кондиције (Jelić, 2014).

## **6. Закључци**

На основу морфолошких, филогенетских и популационих истраживања спроведених на 15 популација речног рака из водених екосистема Србије, Словеније и Албаније и резултата изложених у овој докторској дисертацији могу се извести следећи закључци:

- ❖ Анализа 22 морфолошка карактера показала је да постоји диференцијација јединки по локалитетима. Резултати мултиваријантне дискриминантне анализе су показали да постоје разлике између популација мужјака и популација женки. Мужјаци су се разликовали у више карактера од женки. Мере каракса (HEW, ROW, CGW, CPW, SEW) значајно су допринеле дискриминацији између популација мужјака и између популација женки. Забележене морфометријске разлике међу популацијама из Србије су биле изражене.
- ❖ Мултиваријантна статистичка анализа морфометријских карактера се још једном показала као корисна за квантификацију величине и облика организама и као добра техника за истраживање географских варијација истих.
- ❖ Према резултатима филогенетске анализе детектовано је шест хаплотипова у оквиру 15 истраживаних популација. У истраживаним популацијама са територије Србије детектована су четири хаплотипа Нар26, Нар47, Нар48 и Нар49. Нар50 детектован је код популације из Албаније, а Нар51 код истраживаних популација из Словеније. Детектована је висока вредност диверзитета хаплотипова за читав скуп узорака ( $H_d = 0,665$ ).
- ❖ Највеће вредности очекиване ( $H_e = 0,525$ ) и детектоване хетерозиготности ( $H_o = 0,539$ ) констатоване су у популацији из реке Качер, што указује на велику унутарпопулациону варијабилност.

- ❖ Најнижа генетичка варијабилност детектована је у популацији из акумулације Газиводе ( $H_e = 0,118$ ) и у популацији из акумулације Грлиште ( $H_e = 0,135$ ).
- ❖ Вредности коефицијента инбридинга ( $F_{is}$ ) у популацијама из акумулације Блоке, Преспанског језера и акумулације Кореница незнатно су веће од нуле, па се може закључити да инбридинг постоји, али још увек није значајно заступљен, тако да је варијабилност на унутарпопулационом нивоу и даље значајна.
- ❖ Највећи број приватних алела по локусу детектован је у популацији из Преспанског језера.
- ❖ Највеће вредности генетичке удаљености ( $F_{st}$ ) између парова популација детектоване су између популација из акумулације Грлиште и акумулације Газиводе ( $F_{st} = 0,826$ ) и између популација из Преспанског језера и акумулације Газиводе ( $F_{st} = 0,808$ ).
- ❖ Најнижа вредност генетичке удаљености је детектована између популација из Ресничког потока и реке Качер ( $F_{st} = 0,328$ ).
- ❖ Хијерархијска STRUCTURE анализа је показала јасну структурираност анализираних популација.
- ❖ Применом ESHIPPO crayfish модела утврђен је први степен приоритета заштите за популације из Преспанског језера и акумулације Газиводе.
- ❖ Други степен приоритета заштите утврђен је за популације из акумулација Блоке, Кореница, Грлиште и за популацију из Кочевске реке.
- ❖ Дефинисане су четири еволуционо значајне јединице (ESUs) и шест јединица управљања (MUs) према Moritz (1994) применом резултата анализе главних координата (PCoA), STRUCTURE анализе, урађених филогенетичких и популационих анализа и примењених модела.

- ❖ Процењено стање популација речног рака на истраживаном подручју Балканског полуострва указује на постојање потребе за конзервацијом генофонда применом адекватних мера.

## **7. Литература**



Abellán P., Arribas, P. & Svenning J. C. (2012). Geological habitat template overrides late Quaternary climate change as a determinant of range dynamics and phylogeography in some habitat-specialist water beetles. *Journal of Biogeography* 39(5):970-983.

Ackefors H. (1998). The culture and capture crayfish fisheries in Europe. *World Aquaculture* 29(2):18–24,64–7.

Adams D., Rohlf J. & Slice D. (2004). Geometric morphometrics: ten years of progress following the “revolution”. *Italian Journal of Zoology* 71(1):5–16.

Adamkowska N., Kielpinska J., Panicz R. & Śmietana P. (2018). Detection of *Aphanomyces astaci* in spiny-cheek crayfish from selected water reservoirs of north-western Poland. *Medycyna Weterynaryjna*, 74(06).

Agerberg A. (1990). Genetic variation in three species of freshwater crayfish; *Astacus astacus* L., *Astacus leptodactylus* Aesch., and *Pacifastacus leniusculus* (Dana), revealed by isozyme electrophoresis. *Hereditas* 113:101–108.

Agerberg A. (1993). Genetic and phenotypic variation in the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana). Doctoral dissertation, Uppsala University.

Albrecht H. & Von Hagen H. O. (1981). Differential weighting of electrophoretic data in crayfish and fiddler crabs (Decapoda: Astacidae and Ocypopidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 70(3):393-399.

Albrecht H. (1983). Besiedlungsgeschichte und ursprüngliche holozäne Verbreitung der europäischen Flußkrebse (Decapoda: Astacidae). *Spixiana* 6:61–77.

Albrecht C., Hauffe T., Schreiber K. & Wilke T. (2012). Mollusc biodiversity in a European ancient lake system: lakes Prespa and Mikri Prespa in the Balkans. *Hydrobiologia*, 682(1), 47-59.

Alaranta A., Henttonen P., Jussila J., Kokko H., Presteggaard T., Edsman L. & Halmekyto M. (2006). Genetic differences among noble crayfish (*Astacus astacus*) stocks in Finland, Sweden and Estonia based on the ITS1 region. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 380-381:965–975.

Aliaj S.H., Baldassarre G. & Shkupi, D. (2001). Quaternary subsidence zones in Albania: some case studies. *Bulletin of Engineering Geology and the Environment* 59(4):313-318.

Allan J.D. & Flecker A. S. (1993). Biodiversity conservation in running waters. *BioScience* 43, 32–43.

Allendorf F., Leary R., Spruell P. & Wenburg J. (2001). The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in ecology & evolution* 16(11):613-622.

Allendorf F. W., England P. R., Luikart G., Ritchie P. A. & Ryman N. (2008). Genetic effects of harvest on wild animal populations. *Trends in ecology & evolution* 23(6):327-337.

Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. & Lipman D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* 215:403-410.

Avise J. C., Arnold J., Ball R. M., Bermingham E., Lamb T., Neigel J. E., Reeb C. A. & Saunders R. C. (1987). Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA and bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18:489-522.

Avise J. C. (1994). Molecular tools. V: Molecular markers, natural history and evolution. Chapman & Hall, New York, pp. 44 - 91.

Avise J. C. (2000). Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge.

Axelsson E., Nyström P., Sidenmark J. & Brönmark C. (1997). Crayfish predation on amphibian eggs and larvae. *Amphibia-Reptilia* 18(3):217-228.

Bandelt H. J., Forster P. & Röhl A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution* 16(1):37-48.

Bedjanič M. (2004). Novi podatki o razširjenosti raka navadnega koščaka *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803) v Sloveniji (Crustaceae: Decapoda). *Natura Sloveniae* 6(1):25–33.

Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. & Bonhomme F. (1996–2004). GENETIX 4.05. logiciel sous Windows TM pour la genetique des populations. Laboratoire Genome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000. Universite de Montpellier II. Montpellier (France).

Bláha M., Žurovcová M., Kouba A., Policar T. & Kozák, P. (2016). Founder event and its effect on genetic variation in translocated populations of noble crayfish (*Astacus astacus*). *Journal of applied genetics* 57(1):99-106.

Bonhomme M., Blancher A., Cuartero S., Chikhi L. & Crouau-Roy B. (2008). Origin and number of founders in an introduced insular primate: estimation from nuclear genetic data. *Molecular ecology* 17(4):1009-1019.

Bott R. (1950). Die Flusskrebse Europas (Decapoda, Astacidae). Abh. Senckenberg. Naturf. Ges. 483:1–36.

Bott R. (1972). Besiedlungsgeschichte und Systematik der Astaciden West-Europas unter besonderer Berücksichtigung der Schweiz. *Revue suisse de zoologie* 79:387–408.

Bouckaert R., Hele J., Kühnert D., Vaughan T., Wu C. H., Xie D., Suchard M. A., Rambaut A. & Drummond A. J. (2014). BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLoS Computational Biology* 10(4):e1003537.

Brennan S. & Withgott J. (2005). Biodiversity and conservation biology. *In: Environment: The Science behind the Stories. Pearson, Bewamin Cummings*. San Francisco.

Budd T. W., Lewis J. C. & Tracey M. L. (1978). The filter-feeding apparatus in crayfish. *Canadian Journal of Zoology* 56(4):695-707.

Capelli G. M. (1980). Seasonal variation in the food habits of the crayfish *Orconectes propinquus* (Girard) in trout lake, Vilas county, Wisconsin, USA (Decapoda, Astacidea, Cambaridae). *Crustaceana* 82-86.

Chakraborty R., Kimmel M., Stivers D. N., Davison L. J. & Deka R. (1997). Relative mutation rates at di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite loci. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94(3):1041-1046.

Chambers C.L., Payne J.F. & Kennedy M.L. (1979). Geographic variation in the dwarf crayfish, *Cambarellus puer* Hobbs (Decapoda, Cambaridae). *Crustaceana* 36(1):39-55.

Chidester F. E. (1912). The biology of the crayfish. *The American Naturalist* 46(545):279-293.

Chucholl C. & Pfeiffer M. (2010). First evidence for an established Marmorcrebs (Decapoda, Astacida, Cambaridae) population in Southwestern Germany, in syntopic occurrence with *Orconectes limosus* (Rafinesque, 1817). *Aquatic Invasions* 5(4):405-412.

Correia A. M. & Ferreira Ó. (1995). Burrowing behavior of the introduced red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Decapoda: Cambaridae) in Portugal. *Journal of Crustacean Biology*, 15(2):248-257.

Covich A. P., Palmer M. A. & Crowl T. A. (1999). The role of benthic invertebrate species in freshwater ecosystems: zoobenthic species influence energy flows and nutrient cycling. *BioScience* 49(2):119-127.

Crandall K. A. & Buhay J. E. (2008). Global diversity of crayfish (Astacidae, Cambaridae, and Parastacidae—Decapoda) in freshwater. *Hydrobiologia* 595:295–301.

Crandall K. A., & De Grave S. (2017). An updated classification of the freshwater crayfishes (Decapoda: Astacidea) of the world, with a complete species list. *Journal of Crustacean Biology* 37(5):615-653.

Cvijanović G. (2016). Morfološka i genetička diferencijacija kečige (*Acipenser ruthenus* L.) u srednjem i donjem toku Dunava. Doktorska disertacija. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.

Cukerzis J. (1988). *Astacus astacus* in Europe. In: Holdich D.M. & Lowery R.S. (eds), *Freshwater Crayfish: Biology, Management and Exploitation*, pp. 309–40. *Croom Helm*, London.

Čomić Lj. & Ostojić A. (2005). Reka i akumulaciono jezero Gruža. In: Čomić Lj. & Ostojić A. (eds.), *The Reservoir Gruža – monography*. Faculty of Science, Kragujevac, pp 21-28.

Darriba D., Taboada G.L., Doallo R. & Posada D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8):772.

Dorn N. J. & Wojdak J. M. (2004). The role of omnivorous crayfish in littoral communities. *Oecologia* 140(1):150-159.

Drummond A.J., Suchard M.A., Xie D. & Rambaut A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* 29:1969–1973.

Dudgeon D., Arthington A. H., Gessner M. O., Kawabata Z. I., Knowler D. J., Lévêque C., Naiman R. J., Prieur-Richard A. H., Soto D., Stiassny M. L. J. & Sullivan C. A. (2006). Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological reviews* 81(2):163-182.

Đuretanić S., Jaklič M., Milošković A., Radojković N., Radenković M., Simić V. & Maguire I. (2017). Morphometric variations among *Astacus astacus* populations from different regions of the Balkan Peninsula. *Zoomorphology* 136(1):19-27.

Earl D. A. & von Holdt B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4(2):359-361.

Edgerton B. F., Henttonen P., Jussila J., Mannonen A. R. I., Paasonen P., Taugbøl T., Edsman L. & Souty-Grosset C. (2004). Understanding the causes of disease in European freshwater crayfish. *Conservation Biology* 18(6):1466-1474.

Edsman L., Farris J. S., Kallersjo M. & Prestegard T. (2002). Genetic differentiation between noble crayfish, *Astacus astacus* (L.) populations detected by microsatellite length variation in the rDNA ITS1 region. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* (367): 691-706.

Edsman L., Füreder L., Gherardi F. & Souty-Grosset C. (2010). *Astacus astacus*. In: IUCN 2010, IUCN red list of threatened species, version 2010.4. <http://www.iucnredlist.org>. Accessed January 2019.

Elezovic N., Komatina D. I., Dervisevic I., Ketin S. & Dasic P. (2018). Analysis of SWQI index of the River Ibar (Serbia). *Fresenius environmental bulletin* 27(4):2505-2509.

Erkamo E., Ruokonen T., Alapassi T., Ruokolainen J., Järvenpää T, Tulonen J. & Kirjavainen J. (2010). Evaluation of crayfish stocking success in Finland. *Freshwater Crayfish* 17:77-83.

Evanno G., Regnaut S. & Goudet J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology* 14(8):2611-2620.

Fevolden S. E. & Hessen D. O. (1989). Morphological and genetic differences among recently founded populations of noble crayfish (*Astacus astacus*). *Hereditas* 110(2):149-158.

Fevolden S. E., Taugbøl T. & Skurdal, J. (1994). Allozymic variation among populations of noble crayfish, *Astacus astacus* L., in southern Norway: implications for management. *Aquaculture Research* 25(9):927-935.

Filipova L., Petrusek A., Matasova K., Delaunay C. & Grandjean F. (2013). Prevalence of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* in populations of the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* in France: evaluating the threat to native crayfish. *PLoS One* 8(7):e70157.

Fisher D. O. & Owens I. P. (2004). The comparative method in conservation biology. *Trends in ecology & evolution* 19(7):391-398.

Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R. & Vrijenhoek R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 3(5): 294–299.

Forsythe P. S., Crossman J. A., Firku C. P., Scribner, K. T & Baker, E. A. (2018). Effects of crayfish density, body size and substrate on consumption of lake sturgeon (*Acipenser fulvescens* Rafinesque, 1817) eggs by invasive rusty crayfish [(*Orconectes rusticus* (Girard, 1852)]. *Journal of applied ichthyology* 34(2):314-321.

Frankham R. (2005). Stress and adaptation in conservation genetics. *Journal of evolutionary biology* 18(4):750-755.

Füreder L., Oberkofler B., Hanel R., Leiter J. & Thaler B. (2003). The freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes* in south Tyrol: heritage species and bioindicator. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* (370-371): 79-95.

Füreder L., Edsman L., Holdich D., Kozäk P., Machino Y., Pöckl M., Renai B., Reynolds J., Schulz H., Schulz R., Sint D., Taugbol T. & Trouilhé M. C. (2006). Indigenous crayfish habitat and threats. pp 25-47 *In* Souty-Grosset C., Holdich D. M., Noel P. Y., Reynolds J. D., Haffner P. (eds). Atlas of crayfish in Europe. - Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, Patrimoines naturels 64:187.

Gavrilović Lj. & Dukić D. (2002). Reke Srbije. *Zavod za udžbenike i nastavna sredstva*, Beograd.

Gavrilović B., Popović S., Ćirić M., Gotovina Ž., Pantelić A., Subakov-Simić G. & Vidović M. (2014). Seasonal aspects of water quality in the Grlište reservoir, Eastern Serbia. *Environment* 1:17-21.

Geist J. (2011). Integrative freshwater ecology and biodiversity conservation. *Ecological Indicators* 11(6):1507-1516.

Gherardi F. (2011). Towards a sustainable human use of freshwater crayfish (Crustacea, Decapoda, Astacidea). *Knowledge and management of aquatic ecosystems* 401:02.

Gherardi F. & Holdich D. M. (1999). Crayfish in Europe as alien species. How to make the best of a bad situation? - 295pp., (A. A. Balkema) Rotterdam.

Gilpin M. E. & Soulé M. E. (1986). Minimum Viable Populations: Processes of Species Extinction. *In* M. E. Soulé (eds). Conservation Biology: The Science of Scarcity and Diversity. Sunderland, Mass: Sinauer. pp 19-34. ISBN 0-87893-794-3.

Gouin N., Grandjean F., Pain S., Souty-Grosset C. & Reynold J. (2003). Origin and colonization history of the white-clawed crayfish, *Austropotamobius pallipes*, in Ireland. *Heredity* 91:70-77.

Goudet J. (2001). FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). <http://www2.unil.ch/popgen/software/fstat.htm>.

Grandjean F., Romain D., Avila-Zarza C., Bramard M., Souty-Grosset C. & Mocquard J. P. (1997). Morphometry, sexual dimorphism and size at maturity of the white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes pallipes* (Lereboullet) from a wild French population at Deux-Sèvres (Decapoda, Astacidea). *Crustaceana* 70(1):31–44.

Grandjean F. & Souty-Grosset C. (2000a). Mitochondrial DNA variation and population genetic structure of the white-clawed crayfish, *Austropotamobius pallipes pallipes*. *Conservation genetics* 1(4):309-319.

Grandjean F. & Souty-Grosset C. (2000b). Genetic and morphological variation in the endangered crayfish species *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet) (Crustacea, Astacidae) from the Poitou-Charentes region (France). *Aquatic Sciences* 62:1–19

Grandjean F., Gouin N., Keith P., Noël P., Persat H., Reynolds J., Schulz H., Šmietana P. & Souty-Grosset C. (2006). Systematics and phylogeny of freshwater crayfish, with particular reference to historical biogeography of Europe. *In*: Souty-Grosset C, Holdich DM, Noël P, Reynolds JD and Haffner P (eds) Atlas of Crayfish in Europe. Publications Scientifiques Museum National d'Histoire Naturelle, Paris, France, 11-23.

Gross R., Palm S., Koiv K., Prestegard T., Jussila J., Paaver T., Geist J., Kokko H., Karjalainen A. & Edsman, L. (2013). Microsatellite markers reveal clear geographic structuring among threatened noble crayfish (*Astacus astacus*) populations in Northern and Central Europe. *Conservation Genetics* 14(4):809-821.

Gross R., Kõiv K., Pukk L., & Kaldre K. (2016). Development and characterization of novel tetranucleotide microsatellite markers in the noble crayfish (*Astacus astacus*) suitable for highly multiplexing and for detecting hybrids between the noble crayfish and narrow-clawed crayfish (*A. leptodactylus*). *Aquaculture* 472:50-56.

Guindon S. & Gascuel O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic biology* 52(5):696-704.

Guan R. Z. & Wiles P. R. (1997). Ecological Impact of Introduced Crayfish on Benthic Fishes in a British Lowland River. *Conservation Biology* 11(3):641-647.



- Guan R. Z. & Wiles P. R. (1998). Feeding ecology of the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* in a British lowland river. *Aquaculture* 169(3-4):177-193.
- Guo S. W. & Thompson E. A. (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics* 48:361–372.
- Harris D. J. & Crandall K. A. (2000). Intragenomic variation within ITS1 and ITS2 of freshwater crayfishes (Decapoda: Cambaridae): implications for phylogenetic and microsatellite studies. *Molecular Biology and Evolution* 17(2):284-291.
- Hasegawa M., Kishino H. & Yano T. (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22:160–174.
- Hewitt G. M. (1996). Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological journal of the Linnean Society* 58(3):247-276.
- Hewitt G. M. (1999). Post-glacial recolonization of Europe. *Biological Journal of the Linnean Society* 68:87–112.
- Hewitt G. M. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405:907–913.
- Hewitt G. M. (2004). Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions Royal Society London B* 359:183-195.
- Hewitt G. M. (2011). Quaternary phylogeography: the roots of hybrid zones. *Genetica* 139(5):617-638.
- Hill A. M. & Lodge D. M. (1994). Diel changes in resource demand: competition and predation in species replacement among crayfishes. *Ecology* 75(7):2118-2126.
- Hobbs H. H., Jass J. P. & Huner J. V. (1989). A review of global crayfish introductions with particular emphasis on two North American species (Decapoda, Cambaridae). *Crustaceana* 56:299-316.
- Holdich D. M., Reader J. P., Rogers W. D. & Harlioglu M. (1995). Interactions between three species of crayfish (*Autstropotamobius pallipes*, *Astacus leptodactylus* and *Pacifastacus leniusculus*). *Freshwater Crayfish* 10:46–56.

- Holdich D. (2002a). *Biology of Freshwater Crayfish*. Oxford: Blackwell Science Ltd. 702pp.
- Holdich D. (2002b). Distribution of crayfish in Europe and some adjoining countries. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 367:611–650
- Holdich D.M., Reynolds J.D., Souty-Grosset C. and 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.
- Hollis G. & Stevenson A. (1997). The physical basis of the Lake Mikri Prespa systems: geology, climate, hydrology and water quality. *Hydrobiologia* 351:1e19.
- Hudina S., Janković S., Lucić A. & Žganec K. (2011). The status of *Astacus astacus* in the northernmost part of Croatia (Međimurje County) in the face of invasion by *Pacifastacus leniusculus* (Crustacea: Astacidae). *Lauterbornia* 72:31-44.
- Ilhéu M., Guilherme P. & Bernardo J. M. (2002). Impact of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) on aquatic invertebrate and macrophyte assemblages: a case study in the south of Portugal. *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen* 28(1):144-147.
- Ivanović A. & Kalezić M. (2013). Evolucionarna morfologija: teorijske postavke i geometrijska morfometrija. Biološki fakultet, Beograd, 1-223.
- Jaklič M. & Vrezec A. (2011). The first tropical alien crayfish species in European waters: the redclaw *Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1868) (Decapoda, Parastacidae). *Crustaceana* 84(5):651–665.
- Jelić M. (2014). Phylogeny and phylogeography of the white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes complex*) in the rivers of the Adriatic Basin. Doctoral dissertation, Faculty of Science, University of Zagreb.
- Jussila J. & Evans L. H. (1996). On the factors affecting marron, *Cherax tenuimanus*, growth in intensive culture. *Freshwater Crayfish* 11:428-440.

Jussila J. & Mannonen A. (2004). Crayfisheries in Finland, a short overview. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* (372-373):263-273.

Jussila J., Ojala K. & Mannonen A. (2008). Noble crayfish (*Astacus astacus*) reintroduction project in the River Pyhäjoki, western Finland: A case study. *Freshwater Crayfish* 16:51-56.

Karaman S. (1929). Die Potamobiiden Jugoslaviens. *Glasnik zemaljskog muzeja u Bosni i Hercegovini* 41:147–150.

Karaman M. S. (1961). Slatkovodni rakovi Jugoslavije. *Ribarstvo Jugoslavije* 3(61):1-33.

Karaman M. S. (1962). Ein Beitrag zur Systematik der Astacidae (Decapoda). *Crustaceana* 3(3):173–191.

Karaman M. S. (1963). Studie der Astacidae (Crustacea, Decapoda). *Hydrobiologia* 22(1):111–132.

Kholodkevich S. V., Shumilova T. E., Fedotov V. P. & Zhuravlev D. A. (2005). Effects of the *Astacus astacus* L. population on biomass of macrophytes in a fresh water body. *Russian Journal of Ecology* 36(4):271-276.

Kincaid H. L. (1983). Inbreeding in fish populations used for aquaculture. *Aquaculture* 33(1-4):215-227.

Klingenberg C. P. (2002). Morphometrics and the role of the phenotype in studies of the evolution of developmental mechanisms. *Gene* 287(1):3–10.

Klobučar, G. I., 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(6):1089-1105.

Kõiv K., Gross R., Paaver T. & Kuehn, R. (2008). Isolation and characterization of first microsatellite markers for the noble crayfish, *Astacus astacus*. *Conservation genetics* 9(6):1703-1706.

Kõiv K., Gross R., Paaver T., Hurt M. & Kuehn R. (2009). Isolation and characterization of 11 novel microsatellite DNA markers in the noble crayfish, *Astacus astacus*. *Animal genetics* 40(1):124-124.

Kokko H., Koistinen L., Harlioğlu M. M., Makkonen J., Aydı H., & Jussila J. (2012). Recovering Turkish narrow clawed crayfish (*Astacus leptodactylus*) populations carry *Aphanomyces astaci*. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* (404):12.

Kouba A., Petrusek A. & Kozák P. (2014). Continental-wide distribution of crayfish species in Europe: update and maps. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* (413):05.

Kozák P., Buřič M., Policar T., Hamáčková J. & Lepičová A. (2007). The effect of inter- and intra-specific competition on survival and growth rate of native juvenile noble crayfish *Astacus astacus* and alien spiny-cheek crayfish *Orconectes limosus*. *Hydrobiologia* 590(1):85-94.

Kozák P., Füreder L., Kouba A., Reynolds J. & Souty-Grosset C. (2011). Current conservation strategies for European crayfish. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 401:01.

Krstić S. S. (2012). Environmental changes in lakes catchments as a trigger for rapid eutrophication - A Prespa Lake case study. *In Studies on environmental and applied geomorphology. IntechOpen.*

Kumar S., Stecher G. & Tamura K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution* 33(7):1870-1874.

Laggis A., Baxevanis A. D., Charalampidou A., Maniatsi S., Triantafyllidis A. & Abatzopoulos T. J. (2017). Microevolution of the noble crayfish (*Astacus astacus*) in the Southern Balkan Peninsula. *BMC evolutionary biology* 17(1):122.

Leigh J. W. & Bryant D. (2015). POPART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution* 6:1110–1116.

Leng M. J., Wagner B., Boehm A., Panagiotopoulos K., Vane C. H., Snelling A., Haidon C., Woodley E., Vogel H., Zanchetta G. & Baneschi I. (2013). Understanding past climatic

and hydrological variability in the Mediterranean from Lake Prespa sediment isotope and geochemical record over the Last Glacial cycle. *Quaternary Science Reviews* 66:123-136.

Lipták B., Veselý L., Ercoli F., Bláha M., Buřič M., Ruokonen T. & Kouba A. (2019). Trophic role of marbled crayfish in a lentic freshwater ecosystem. *Aquatic Invasions* 14(2).

Makkonen J., Kokko H. & Jussila J. (2015). Mitochondrial cytochrome oxidase I gene analysis indicates a restricted genetic background in Finnish noble crayfish (*Astacus astacus*) stocks. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* (416):21.

Machino Y. (1997). Crayfish of the upper Soca and upper Sava rivers, Slovenia. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 347:721–729.

Maggs C. A., Castilho R., Foltz D., Henzler C., Jolly M. T., Kelly J., Olsen J., Perez K. E., Stam W., Väinölä R., Viard F. & Wares J. (2008). Evaluating signatures of glacial refugia for North Atlantic benthic marine taxa. *Ecology* 89(11):S108-S122.

Maguire I. & Dakić L. (2011). Comparative analyses of *Astacus leptodactylus* morphological characteristics from Croatia and Armenia. *Biologia* 66(3):491-498.

Maguire I., Klobučar G., Žganec K., Jelić M., Lucić A. & Hudina S. (2018). Recent changes in distribution pattern of freshwater crayfish in Croatia— threats and perspectives. *Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems* (419):2.

Maksimović Z. (2015). Konzervacija i usmereno korišćenje genofonda crne topole (*Populus nigra* L.) na području Velikog ratnog ostrva. Doktorska disertacija. Šumarski fakultet, Univerzitet u Beogradu.

Malcolm L., Hunter Jr. & James P. (2007). Fundamentals of Conservation Biology. 3rd edition. *Blackwell Publishing*, Oxford, United Kingdom, pp 516.

Matzinger A., Jordanoski M., Veljanoska-Sarafiloska E., Sturm M., Müller B., Wüest A., (2006). Is Lake Prespa jeopardizing the ecosystem of ancient Lake Ohrid? *Hydrobiology* 553:89-109.

McGeoch M.A., Butchart S.H.M., Spear D., Marais E., Kleynhans E.J., Symes A., Chanson J. & Hoffmann M. (2010). Global indicators of biological invasion: species numbers, biodiversity impact and policy responses. *Diversity and Distributions* 16:95–108.

Milankov V. (2007). Osnove konzervacione biologije I. PMF, Departman za biologiju i ekologiju, Novi Sad.

Milanović A. (2007). Hidrogeografska studija reke Lepenice. Specijalno izdanje, br. 70. Geografski Institut „Jovan Cvijić”, Srpska akademija nauka i umetnosti.

Milošković A. (2016). Prostorni monitoring teških metala kopnenih voda Srbije na osnovu bioakumulacije u ribama. Doktorska disertacija. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevcu.

Momot W. T., Gowing H. & Jones P. D. (1978). The dynamics of crayfish and their role in ecosystems. *American Midland Naturalist* 10-35.

Momot W. T. (1995). Redefining the role of crayfish in aquatic ecosystems. *Reviews in Fisheries Science* 3(1):33-63.

Moritz C. (1994). Defining ‘evolutionarily significant units’ for conservation. *Trends in ecology & evolution* 9(10):373-375.

Mrugała A., Šanda R., Shumka S. & Vukić J. (2017). Filling the blank spot: first report on the freshwater crayfish distribution in Albania. *Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems* (418):34.

Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R. K., Horn G. T. & Erlich H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. In Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology (Vol. 51, pp. 263-273). *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

Nyström P., Brönmark C. & Granéli W. (1996). Patterns in benthic food webs: a role for omnivorous crayfish? *Freshwater Biology* 36(3):631–646.

Nyström P. & Pérez J. R. (1998). Crayfish predation on the common pond snail (*Lymnaea stagnalis*): the effect of habitat complexity and snail size on foraging efficiency. *Hydrobiologia* 368(1-3):201-208.

Nyström P. (1999). Ecological impact of introduced and native crayfish on freshwater communities: European perspectives. *In: Crayfish in Europe as Alien Species: How to Make the Best of a Bad Situation?* (eds F. Gherardi & D.M. Holdich), A.A. Balkema, Rotterdam, Brookfield 63–85.

Owen C. L., Bracken-Grissom H., Stern, D. & Crandall K. A. (2015). A synthetic phylogeny of freshwater crayfish: insights for conservation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 370(1662):20140009.

Paaver T. & Hurt M. (2009). Status and management of noble crayfish *Astacus astacus* in Estonia. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* (394-395):18.

Pakkasmaa S. & Piironen J. (2001). Morphological differentiation among local trout (*Salmo trutta*) populations. *Biological Journal of the Linnean Society* 72:231–239.

Palma J. & Andrade J. P. (2002). Morphological study of *Diplodus sargus*, *Diplodus puntazzo* and *Lithognathus mormyrus* (Sparidae) in the Eastern Atlantic and Mediterranean Sea. *Fisheries Research* 57:1–8.

Pamilo P. (1984). Genotypic correlation and regression in social groups: Multiple alleles, multiple loci and subdivided populations. *Genetics* 107:307-320.

Panicz R., Napora-Rutkowski Ł., Keszka S., Skuza L., Szenejko M. & Śmietana P. (2019). Genetic diversity in natural populations of noble crayfish (*Astacus astacus* L.) in north-western Poland on the basis of combined SSR and AFLP data. *PeerJ* 7:e7301.

Parkyn S. M., Rabeni C. F & Collier, K. J. (1997). Effects of crayfish (*Paranephrops planifrons*: Parastacidae) on in-stream processes and benthic faunas: A density manipulation experiment. *New Zealand journal of marine and freshwater research* 31(5):685-692.

Pârvulescu L., Pacioglu O. & Hamchevici C. (2011). The assessment of the habitat and water quality requirements of the stone crayfish (*Austropotamobius torrentium*) and noble

crayfish (*Astacus astacus*) species in the rivers from the Anina Mountains (SW Romania). *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* (401):03.

Peakall R. & Smouse P. E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288–295.

Peakall R. & Smouse P. E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* 28: 2537–2539.

Pedraza-Lara C., Alda F., Carranza S. & Doadrio I. (2010). Mitochondrial DNA structure of the Iberian populations of the white-clawed crayfish, *Austropotamobius italicus italicus* (Faxon, 1914). *Molecular phylogenetics and evolution* 57(1):327-342.

Petrović A., Rajković M., Simić S., Maguire I. & Simić V. (2013). Importance of genetic characteristics in the conservation and management of crayfish in Serbia and Montenegro. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 19(5):1093-1104.

Polcar T. & Kozák P. (2015). Production and culture of crayfish. In: Kozák P., Ďuriš Z., Petrušek A., Buřič M., Horká I., Kouba A., Kozubíková-Balzarová E., Polcar T., eds. *Crayfish Biology and Culture*. Vodňany (Czech Republic): University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Fisheries and Protection of Waters, pp. 293–363.

Pritchard J. K., Stephens M. & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155(2):945-959.

Rajković M. (2012). Distribucija, filogenija, ekologija i konzervacija rakova iz familije Astacidae na području Crne Gore. Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevcu.

Rambaut A SM, Xie D & Drummond AJ. (2014). Tracer v1.7. Available: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.

Revenga C., Campbell I., Abell R., De Villiers P. & Bryer M. (2005). Prospects for monitoring freshwater ecosystems towards the 2010 targets. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 360:397–413.



Raymond M. & Rousset F. (1995a). GENEPOP (Version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered* 86: 248–249.

Raymond M. & Rousset F. (1995b). An exact test for population differentiation. *Evolution* 49:1280–1283.

Reynolds J. D. (2002). Growth and reproduction. In Holdich D. (eds.) *Biology of Freshwater Crayfish*. Oxford: Blackwell Science Ltd. 702pp.

Reynolds J. & Souty-Grosset C. (2012). Management of freshwater biodiversity: crayfish as bioindicators. Cambridge University Press.

Richardson A. (2012). Crayfish species as bioindicators for communities and or habitats. In Management of Freshwater Biodiversity: Crayfish as Bioindicators Reynolds J. & Souty-Grosset C. (2012). Cambridge University Press, Cambridge UK. 76-77.

Richman N. I., Böhm M., Adams S. B., Alvarez F., Bergey E. A., Bunn J. J., Burnham Q., Cordeiro J., Coughran J., Crandall K. A., Dawkins K. L., DiStefano R. J., Doran N. E., Edsman L., Eversole A. G., Füreder L., Furse J. M., Gherardi F., Hamr P., Holdich D. M., Horwitz P., Johnston K., Jones C. M., Jones J. P. G., Jones R. L., Jones T. G., Kawai T., Lawler S., López-Mejía M., Miller R. M., Pedraza-Lara C., Reynolds J. D., Richardson A. M. M., Schultz M. B., Schuster G. A., Sibley P. J., Souty-Grosset C., Taylor C. A., Thoma R. F., Walls J., Walsh T. S. & Collen B. (2015). Multiple drivers of decline in the global status of freshwater crayfish (Decapoda: Astacidea). *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 370(1662):20140060.

Rozas J., Ferrer-Mata A., Sánchez-DelBarrio J. C., Guirao-Rico S., Librado P., Ramos-Onsins S. E. & Sánchez-Gracia A. (2017). DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular biology and evolution* 34(12):3299-3302.

Saila S. B. & Flowers J. M. (1969). Geographic morphometric variation in the American lobster. *Systematic Zoology* 18(3):330–338.

Sala O. E., Chapin F. S., Armesto J. J., Berlow R., Bloomfield J., Dirzo R., Huber-Sanwald E., Huenneke L. F., Jackson R. B., Kinzing A., Leemans R., Lodge D., Mooney H. A.,

Oeasterheld M., Poff N. L., Sykes M. T., Walker B. H., Walker M. & Wall D. H. (2000). Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* 287:1770–1774.

Santos A. B. I. & Araújo F. G. (2015). Evidence of morphological differences between *Astyanax bimaculatus* (Actinopterygii: Characidae) from reaches above and below dams on a tropical river. *Environmental biology of fishes* 98(1):183–191.

Savić Pavićević D. & Matić G. (2011). Molekularna biologija I. NNK International, Beograd.

SCBD (Secretariat of the Convention on Biological Diversity) (1992). Convention on Biological Diversity. Available at: [www.cbd.int](http://www.cbd.int) (accessed 29 December 2012).

Schrimpf A., Schulz H.K., Theissing K., Pârvulescu L. and Schulz R. (2011). The first large-scale genetic analysis of the vulnerable noble crayfish *Astacus astacus* reveals low haplotype diversity in Central European populations. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 401:35.

Schrimpf A. (2013). DNA-based methods for freshwater biodiversity conservation. Phylogeographic analysis of noble crayfish (*Astacus astacus*) and new insights into the distribution of crayfish plague. Doctoral dissertation, Universität Koblenz-Landau.

Schrimpf A., Theissing K., Dahlem J., Maguire I., Pârvulescu L., Schultz H. & Schulz R. (2014). Phylogeography of noble crayfish (*Astacus astacus*) reveals multiple refugia. *Freshwater Biology* 59:761–776.

Schrimpf A., Piscione M., Cammaerts R., Collas M., Herman D., Jung A., Ottburg F., Roessink I., Rollin X., Schulz R. & Theissing K. (2017). Genetic characterization of Western European noble crayfish populations (*Astacus astacus*) for advanced conservation management strategies. *Conservation genetics* 18(6):1299-1315.

Schubart C. D., Diesel R. & Hedges S. B. (1998). Rapid evolution to terrestrial life in Jamaican crabs. *Nature* 393(6683):363.

Schug M. D., Hutter C. M., Wetterstrand K. A., Gaudette M. S., Mackay T. F. & Aquadro C. F. (1998). The mutation rates of di-, tri- and tetranucleotide repeats in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology and Evolution*, 15(12):1751-1760.

Schulz R. (2000). Status of the noble crayfish *Astacus astacus* (L.) in Germany: monitoring protocol and the use of RAPD markers to assess the genetic structure of populations. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* (356):123-138.

Schulz H. K., Šmietana P. & Schulz R. (2004). Assessment of DNA variations of the noble crayfish (*Astacus astacus* L.) in Germany and Poland using Inter-Simple Sequence Repeats (ISSRs). *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* (372-373):387-399.

Simić V., Simić S., Paunović M. & Cakić P. (2007). Model of the assessment of the critical risk of extinction and the priorities of protection of endangered aquatic species at the national level. *Biodiversity and Conservation* 16: 2471–2493.

Simić V., Petrović A., Rajković M. & Paunović M. (2008). Crayfish of Serbia and Montenegro-The population status and the level of endangerment. *Crustaceana* 1153-1176.

Simić V., Maguire I., Rajković M. & Petrović A. (2015). Conservation strategy for the endangered crayfish species of the family Astacidae: the ESHIPPO crayfish model. *Hydrobiologia* 760(1):1-13.

Simčič T., Pajk F., Vrezec A. & Brancelj A. (2012a). Size scaling of whole-body metabolic activity in the noble crayfish (*Astacus astacus*) estimated from measurements on a single leg. *Freshwater Biology* 57(1):39–48.

Simčič T., Pajk F., Brancelj A. & Vrezec A. (2012b). Preliminary multispecies test of a model for non-lethal estimation of metabolic activity in freshwater crayfish. *Acta Biologica Slovenica* 55(1):15–27.

Simčič T., Pajk F., Jaklič M., Brancelj A. & Vrezec A. (2014). The thermal tolerance of crayfish could be estimated from respiratory electron transport system activity. *Journal of thermal biology* 41:21–30.

Simon C., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H. & Flook P. (1994). Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the entomological Society of America* 87(6):651-701.

Sint D. & Füreder L. (2004). Reintroduction of *Astacus astacus* L. in East Tyrol, Austria. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 372-373:301-314.

Sint D., Dalla Via J. & Füreder L. (2005). Morphological variations in *Astacus astacus* L. and *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet) populations. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 376–377:637–652.

Sint D., Dalla Via J. & Füreder L. (2006). The genus *Austropotamobius* in the Ausserfern region (Tyrol, Austria) with an overlap in the distribution of *A. torrentium* and *A. pallipes* populations. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 380–381:1029–1040.

Sint D., Dalla Via J. & Füreder L. (2007) Phenotypical characterization of indigenous freshwater crayfish populations. *Journal of Zoology* 273(2):210–219.

Sketelj J. & Rejic M. (1958). Preliminary account on the examination of Lake Bled. *Gradbeni vestnik* 61-64.

Skurdal J. & Taugbøl T. (2002). *Astacus*. In Holdich D. (eds.) *Biology of Freshwater Crayfish*. Oxford: Blackwell Science Ltd. 702pp.

Skuza L., Keszka S., Panicz R. & Śmietana P. (2016). Molecular characterization of the noble crayfish (*Astacus astacus* L.) population from Pomeranian lakes (north-western Poland) based on mitochondrial DNA. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, (417), 13.

Službeni glasnik Republike Srbije (2010). Pravilnik o utvrđivanju vodenih tela površinskih i podzemnih voda. Br. 96/2010.

Službeni glasnik Republike Srbije (2016). Pravilnik o proglašenju i zaštiti strogo zaštićenih i zaštićenih divljih vrsta biljaka, životinja i gljiva. Br. 5/2010, 47/2011, 32/2016, 98/2016.

Söderbäck B. (1991). Interspecific dominance relationship and aggressive interactions in the freshwater crayfishes *Astacus astacus* (L.) and *Pacifastacus leniusculus* (Dana). *Canadian Journal of Zoology* 69(5):1321-1325.

Souty-Grosset C., Grandjean F. & Gouin N. (2003). Keynote involvement of genetics in knowledge, stock management and conservation of *Austropotamobius pallipes* in Europe. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* (370-371):165-179.

Souty-Grosset C., Holdich D. M., Noël P. Y., Reynolds J. D. & Haffner P. (2006). Atlas of Crayfish in Europe. *Muséum national d'Histoire naturelle*, Paris.

Souty-Grosset C. & Reynolds J. (2009). Current ideas on methodological approaches in European crayfish conservation and restocking procedures. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 394-395:01.

Stanković S.M. (2000). Jezera Srbija. Limnološka monografija. *Srpsko geografsko društvo*, Beograd.

Stepanović Ž. (1974). Hidrološke karakteristike kragujevačke kotline sa posebnim osvrtom na snabdevanje Kragujevca vodom. *Fond za finansiranje visokoškolskih ustanova, naučne i naučno izdavačke delatnosti Skupštine opštine Kragujevac*, Kragujevac.

Stucki T. P. & Romer J. (2001). Will *Astacus leptodactylus* displace *Astacus astacus* and *Austropotamobius torrentium* in Lake Ägeri, Switzerland? *Aquatic sciences* 63(4):477-489.

Svobodová J., Douda K., Štambergová M., Píček J., Vlach P. & Fischer D. (2012). The relationship between water quality and indigenous and alien crayfish distribution in the Czech Republic: patterns and conservation implications. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 22(6):776-786.

Swahn J. Ö. (2004). The cultural history of crayfish. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* (372-73):243-251.

Swain D. P & Foote C. J. (1999). Stock and chameleons: the use of phenotypic variation in stock identification. *Fisheries Research* 43:113-128.

- Šmietana P., Krzywosz T. & Strużyński W. (2004). Review of the national restocking programme “active protection of native crayfish in Poland” 1999-2001. *Bulletin Francais de la Peche et de la Pisciculture* 372-373:289-299.
- Taberlet P., Fumagalli L., Wust-Saucy A. G. & Cosson J. F. (1998). Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular ecology* 7(4):453-464.
- Taugbøl T. & Skurdal J. (1992). Growth, mortality and moulting rate of noble crayfish, *Astacus astacus* L., juveniles in aquaculture experiments. *Aquaculture Research* 23(4):411-420.
- Taugbøl T. & Skurdal J. (1999). The future of native crayfish in Europe: how to make the best of a bad situation. *In: Crayfish in Europe as Alien Species. How to Make the Best of a Bad Situation?* (eds F. Gherardi & D.M. Holdich), pp. 271–9. A. A. Balkema, Rotterdam.
- Taugbøl T. (2004). Exploitation is a prerequisite for conservation of *Astacus astacus*. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* (372-373):275-279.
- Taugbøl T. & Peay S. (2004). Roundtable Session 3. Reintroduction of native crayfish and habitat restoration. *Bulletin Francais de la Peche et de la Pisciculture* 372-373:465-471.
- Taylor C.A. (2002). Taxonomy and Conservation of Native Crayfish Stocks. *In: Biology of freshwater crayfish*. Holdich, D.M. eds., Blackwell Science Ltd, Oxford. 236-257.
- Taylor C.A. & Hardman M. (2002). Phylogenetics of the crayfish subgenus Crockerinus, genus *Orconectes* (Decapoda: Cambaridae), based on cytochrome oxidase I. *Journal of Crustacean Biology* 22:874–881.
- Thompson J.D., Higgins D.G. & Gibson T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position- specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids research* 22(22): 4673-4680.

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(1):212–226.

Tošić A. (2016). Filogeografski status i genetička struktura populacija kompleksa potočne pastrmke (*Salmo cf. trutta*) Đerdapa i Timočke Krajine. Doktorska disertacija. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.

Twardochleb L. A., Olden J. D. & Larson E. R. (2013). A global meta-analysis of the ecological impacts of nonnative crayfish. *Freshwater Science* 32(4):1367-1382.

Urošević V. (1993). Plankton primary production changes in Gazivode reservoir. *Glasnik Instituta za botaniku i botaničke baste Univerziteta u Beogradu XXIV-XXV*:105-113

Usio N. & Townsend C.R. (2004). Roles of crayfish: consequences of predation and bioturbation for stream invertebrates. *Ecology* 85(3):807–822.

Van Oosterhout C., Hutchinson W. F., Wills D. P. M. & Shipley P. (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4(3):535–538.

Van Straalen N. M. & Timmermans M. J. (2002). Genetic variation in toxicant-stressed populations: an evaluation of the “genetic erosion” hypothesis. *Human and Ecological Risk Assessment* 8(5):983-1002.

Veličković N. (2014). Genetička analiza populacione strukture i filogeografija divlje svinje (*Sus scrofa* Linnaeus, 1758). Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.

Verovnik R., Sket B. & Trontelj P. (2005). The colonization of Europe by the freshwater crustacean *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda) proceeded from ancient refugia and was directed by habitat connectivity. *Molecular ecology* 14(14):4355-4369.

Vigouroux Y., Jaqueth J. S., Matsuoka Y., Smith O. S., Beavis W. D., Smith J. S. C. & Doebley J. (2002). Rate and pattern of mutation at microsatellite loci in maize. *Molecular Biology and Evolution* 19(8):1251-1260.

Weir B. S. & Cockerham C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 1358-1370.

Westman K., Särkkä J., Pursiainen M. & Sumari O. (1986) Population structure and gut contents of the crayfish *Astacus astacus* in two finnish rivers. *Freshwater Crayfish* 6:166–77.

Westman K., Ackefors H. & Nylund C. (1992). Crayfish. Biology, *Aquaculture and Harvest*. Kiviksgården, Stockolm, Sweden.

Wheatly M. G. & Gannon A. T. (1995). Ion regulation in crayfish: freshwater adaptations and the problem of molting. *American Zoologist* 35(1):49-59.

Willis K. J. & Niklas K. J. (2004). The role of Quaternary environmental change in plant macroevolution: the exception or the rule?. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 359(1442):159-172.

Wilke T., Schultheiß R., Albrecht C., Bornmann N., Trajanovski S. & Kevrekidis T. (2010). Native *Dreissena* freshwater mussels in the Balkans: in and out of ancient lakes. *Biogeosciences* 7:3051-3065.

Zelditch M. L., Swiderski D. L., Sheets H. D. & Fink W. L. (2004). Geometric morphometrics for biologists: A primer. *Elsevier Academic Press*. 1-443.

Zimmerman J. K. (2012). Noble Crayfish (*Astacus astacus*) in a Changing World: Implications for Management. Doctoral dissertation, Mid Sweden University.

**Коришћене интернет странице:**

<http://www.cbd.int>

<http://www.iucnredlist.org>

<https://heis.vuv.cz>



## **8. Прилози**

**Додатак 1. Прича о раку кројачу Десанке Максимовић**

Живео је под великим белутком у реци Рак Кројач. Он је надалеко био чувен по свом занату. Све бубе, лептири и рибице из околине шили су код њега своје одело. О вредноћи његовој свугде се причало; говорило се да никад из руке не испушта своје руменкасте оштре маказе. У послу су му помагали мали ракови, његови синови. Они су по дну речном прикупљали материјал, од кога је после Рак Кројач правио дивна одела.

Једном у великом виру, близу белутка где је становао Рак Кројач, рибице реше да приреде забаву, те све потрче њему, да им сашије ново одело.

– Ноћас ће бити забаве у виру на месечини, па те молим да сашијеш хаљину, лепшу него иједну што си ми до сада шио – рече штука Раку Кројачу, пресецајући хитро воду.

– Сашићу ти сивозелену хаљину од шљокица, закићену седефастим лепезама – одговори Рак Кројач и узе јој меру.

За штуком дође каћиперка пастрмка и стаде се умиљавати Раку Кројачу:

– Драги Рачићу, сашиј ми хаљину да буде лепша него у осталих риба.

А Рак Кројач се замисли и рече:

– Сашићу ти шарену хаљину, пуну жутих, црвених, белих и плавих тачкица. Бићеш најлепша на целој забави.

После њих изрони из трске греч молећи:

– Рачићу, молим те да ми сашијеш ново одело за забаву, па ћу ти платити колико год затражиш.

-Сашићу ти жућкастозелено одело ишарано црним пругама. Ти једини бићеш тако одевен.

Кад рибице одоше, навали Рак Кројач на посао. Посла рачиће да наберу материјал потребан за рибље хаљине: речног бисера, седефа, шареног ситног песка. А чим се они вратише, поче да прави нова одела нижући бисер и седеф на дуга влакна лике, која је потом уплетао са речним сребром.

А за то време су рибице спремале вир за забаву. Прво су очистиле дно од муља и посуле га руменкастим белутком и маховином; после су покосиле високу обалску траву, да би Месец што боље осветлио вир. Најзад су отишле до жабље свирачке дружине зване „Крекетуша“ и погодиле се да им свира на забави. Чак пред вече се упуте Раку Кројачу да виде шта је са хаљинама.

Кад тамо стигну, а велики белутак где је Рак Кројач становао лежи одваљен у страну и рачићи по мутној води лутају и плачу.

– Шта је то, побогу! Где је Рак Кројач? – повичу пренеражене рибе, слутећи неку несрећу.

– Однела га у торби нека деца, која су овуда ловила ракове – одговоре рачићи кроз плач. – Сад нећемо никада више очима видети свог драгог оца, Рака Кројача.

Онда и пастрмка и греч и штука ударе у плач; било им је жао што је сироти рак настрадао, а још више што им није хаљинице за забаву сашио.

Малишани, видећи како рибе жале њиховог оца, још више се растуже: – Таман смо му донели бисера, седефа, речног сребра и шареног песка и он почео да их ниже на влакна, а неваљала деца нам га заувек однеше.

Чувши плач рачића и риба, дотрче и жабе и речне змије и сви други становници реке да виде шта је, и тако настане општа жалост.

Баш је Сунце залазило за брег кад се то дешавало. Вода у виру се руменела као да је неко у њу сасуо вина. Вечерњи ветар је лутао кроз трску. А становници реке су и даље крај белутка тужили.

Наједном штука преста плакати и викну:

– Ево долази низ реку Рак Кројач, познајем га по руменкастим маказама што их носи у руци.

Сви се обазру на ту страну и угледају га збиља како се опрезно провлачи између камења, хитајући кући. Стигавши на свој праг рече:

– Срећа моја што сам собом понео маказе, те сам, чим су се деца мало заговорила, расекао торбу и побегао, иначе ме не бисте никад више видели очима.

Какав други лен рак би после овог доживљаја прво легао да се одмори, а Рак Кројач прво узе да доврши започете рибље хаљине. Шио их је док се Месец није јавио, а онда су већ биле готове и преливале се као дуга у безброј боја.

Кад су штука, пастрмка и греч стигли у новим хаљинама, забава у виру је већ била отпочела, жабе су свирале, рибице су играле окретне игре; а Рак Кројач је испод белутка за то време причао својој деци шта је све претрпео док није побегао из торбе.

Додатак 2. Преглед имена хаплотипова и приступни бројеви из Банке гена за *COI* и 16S секвенце које су коришћене за формирање стабла и мреже хаплотипова.

Назив хаплотипа	<i>COI</i> Приступни број	16S Приступни број	Литература
Нар01	KF888296	KF888279	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар02	KF888296	KF888280	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар03	KF888297	KF888279	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар04	KF888298	KF888279	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар05	KF888299	KF888279	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар06	KF888300	KF888279	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар07	KF888296	KF888281	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар08	KF888301	KF888279	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар09	KF888302	KF888279	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар10	KF888303	KF888279	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар11	KF888304	KF888279	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар12	KF888305	KF888279	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар13	KF888296	KF888282	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар14	KF888306	KF888279	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар15	KF888296	KF888283	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар16	KF888307	KF888279	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар17	KF888308	KF888279	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар18	KF888309	KF888279	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар19	KF888296	KF888284	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар20	KF888310	KF888284	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар21	KF888296	KF888285	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар22	KF888311	KF888285	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар23	KF888311	KF888284	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар24	KF888312	KF888284	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар25	KF888313	KF888286	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар26	KF888311	KF888287	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар27	KF888314	KF888288	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.

Нар28	KF888315	KF888288	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар29	KF888316	KF888288	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар30	KF888317	KF888279	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар31	KF888316	KF888279	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар32	KF888315	KF888281	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар33	KF888315	KF888289	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар34	KF888318	KF888279	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар35	KF888319	KF888279	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар36	KF888319	KF888284	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар37	KF888315	KF888284	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар38	KF888315	KF888290	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар39	KF888320	KF888279	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар40	KF888315	KF888291	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар41	KF888321	KF888292	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар42	KF888321	KF888293	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар43	KF888322	KF888293	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар44	KF888323	KF888293	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар45	KF888324	KF888294	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар46	KF888325	KF888295	Schrimpf <i>et al.</i> , 2014.
Нар47	-	-	ова дисертација
Нар48	-	-	ова дисертација
Нар49	-	-	ова дисертација
Нар50	-	-	ова дисертација
Нар51	-	-	ова дисертација
A2C15	KY067213	KY048194	Laggis <i>et al.</i> , 2017.
A2C29	KY067218	KY048194	Laggis <i>et al.</i> , 2017.
A2C33	KY067222	KY048194	Laggis <i>et al.</i> , 2017.
A2C21	KY067215	KY048197	Laggis <i>et al.</i> , 2017.
A2C21	KY067215	KY048194	Laggis <i>et al.</i> , 2017.
A2C28	KY067217	KY048197	Laggis <i>et al.</i> , 2017.
A2C34	KY067223	KY048194	Laggis <i>et al.</i> , 2017.
A1C30	KY067219	KY048198	Laggis <i>et al.</i> , 2017.

---

A2C35	KY067224	KY048194	Laggis <i>et al.</i> , 2017.
A2C21	KY067215	KY048199	Laggis <i>et al.</i> , 2017.
A2C1	KY067207	KY048200	Laggis <i>et al.</i> , 2017.
A16C10	KY067211	KY048193	Laggis <i>et al.</i> , 2017.
A3C32	KY067221	KY048201	Laggis <i>et al.</i> , 2017.
A2C1	KY067207	KY048194	Laggis <i>et al.</i> , 2017.
A2C14	KY067212	KY048194	Laggis <i>et al.</i> , 2017.
A2C2	KY067208	KY048195	Laggis <i>et al.</i> , 2017.
A2C2	KY067208	KY048194	Laggis <i>et al.</i> , 2017.
A2C27	KY067216	KY048194	Laggis <i>et al.</i> , 2017.
A2C31	KY067220	KY048194	Laggis <i>et al.</i> , 2017.
A6C31	KY067220	KY048194	Laggis <i>et al.</i> , 2017.
A2C31	KY067220	KY048200	Laggis <i>et al.</i> , 2017.
A2C1	KY067207	KY048202	Laggis <i>et al.</i> , 2017.
A2C40	KY067225	KY048194	Laggis <i>et al.</i> , 2017.
A2C5	KY067209	KY048194	Laggis <i>et al.</i> , 2017.
A2C8	KY067210	KY048194	Laggis <i>et al.</i> , 2017.
A2C21	KY067215	KY048194	Laggis <i>et al.</i> , 2017.
A2C50	KY067226	KY048194	Laggis <i>et al.</i> , 2017.
A2C52	KY067228	KY048194	Laggis <i>et al.</i> , 2017.
A2C18	KY067214	KY048194	Laggis <i>et al.</i> , 2017.
A2C31	KY067220	KY048194	Laggis <i>et al.</i> , 2017.
A2C31	KY067220	KY048195	Laggis <i>et al.</i> , 2017.
A4C1	KY067207	KY048196	Laggis <i>et al.</i> , 2017.
A4C51	KY067227	KY048196	Laggis <i>et al.</i> , 2017.

---

Додатак 3. Хијерархијски кораци у процени броја генетских кластера (K) из програма STRUCTURE урађени помоћу  $\Delta K$  методе. Средња вредност  $\text{LnP}(K)$ , средња постериорна вероватноћа K; Stdev  $\text{LnP}(K)$  стандардна девијација седам независних понављања;  $\Delta K$ , ad hoc квантитет, предсказивач реалног броја кластера (Evanno *et al.*, 2005), највеће вредности  $\Delta K$  су обојене.

<b>1 КОРАК: сви узорци</b>	<b>K</b>	<b>Mean LnP(K)</b>	<b>Stdev LnP(K)</b>	<b>Delta K</b>
	1	-9424.67	0.58	-
	2	-7290.03	228.50	4.23
	3	-6121.93	76.79	3.85
	4	-5249.80	189.50	1.27
	5	-4619.00	84.82	3.01
	6	-4243.94	74.70	0.35
	<b>7</b>	<b>-3842.54</b>	<b>81.96</b>	<b>28.01</b>
	8	-5736.34	2092.53	1.06
	9	-5417.44	1742.19	0.95
	10	-6745.45	6946.70	-
<b>2 КОРАК: Акумулација Кореница, Акумулација Грлиште</b>	<b>K</b>	<b>Mean LnP(K)</b>	<b>Stdev LnP(K)</b>	<b>Delta K</b>
	1	-719.14	0.63	-
	<b>2</b>	<b>-327.86</b>	<b>1.09</b>	<b>373.21</b>
	3	-342.47	6.71	0.46
	4	-354.00	4.60	0.08
	5	-365.88	3.50	-

## БИБЛИОТЕЧКА ДОКУМЕНТАЦИЈА



### УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОГИЈУ И ЕКОЛОГИЈУ



Радоја Домановића 12, 34000 Крагујевац, Србија

## КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈА

Редни број	
Тип записа	Текстуални штампани материјал
Врста рада	Докторска дисертација
Аутор	Симона Ђуретановић
Ментор	Проф. др Ивана Мегвајер
Наслов рада	Филогенија, филогеографија и конзервација врсте <i>Astacus astacus</i> (Decapoda, Astacidae) на подручју Балканског полуострва
Језик публикације	Српски (ћирилица)
Језик извода	Српски
Земља публиковања	Србија
Година публикације	2019.
Издавач	Ауторски репринт
Место и адреса	Радоја Домановића 12 34000 Крагујевац, Србија
Научна област	Биологија
Научна дисциплина	Хидробиологија
Предметна одредница/кључне речи	Речни рак, филогенија, филогеографија, конзервација, подручје Балканског полуострва
Чува се	У библиотеци Природно-математичког факултета у Крагујевцу, Р. Домановића 12, 34000 Крагујевац, Србија



## Важна напомена

### Извод

Нестанак врста и смањење биодиверзитета представљају најозбиљније глобалне последице угрожавања животне средине. Акватични екосистеми су под интензивним антропогеним утицајем у смислу загађења, прекомерне експлоатације, модификације водотокова, деградације станишта и уноса инвазивних врста. Пад биодиверзитета је далеко већи у слатководним екосистемима него у најугроженијим терестичним екосистемима, а најугроженији су инвертебрати, попут шкољки и слатководних ракова. Чак једној трећини слатководних ракова широм света прети ризик од изумирања.

Ракови су највећи покретни, слатководни бескичмењаци и индикатори су доброг квалитета вода. Познати су као значајне компоненте биодиверзитета, са важном еколошком улогом у правилном функционисању слатководних екосистема и кључном улогом у ланцима исхране.

Речни рак има комплексан историјски и генетички статус који је обликован геолошким догађајима, губитком станишта и загађењем, али је и последица транслокација и реинтродукција, како аутохтоних, тако и алохтоних врста ракова, које су довеле до разбијања природне генетичке структуре врсте, до мешања и губитка популација широм Европе. Широм ареала распрострањења забележено је опадање његових природних популација за 50–70%, па се нашао и на Црвеној листи угрожених врста Међународне уније за очување природе где је класификован као „рањива врста” са трендом смањења броја популација и субпопулација и смањења ареала распрострањења.

Циљеви овог истраживања били су: анализа морфолошке варијабилности популација врсте *Astacus astacus* на истраживаном подручју Балканског полуострва применом методе класичне морфометрије; филогенетичко истраживање популација анализом *16S rRNA* и *COI* гена митохондријалне ДНК; процена нивоа диференцијације популација и стање истраживаних популација анализом нуклеарних маркера – микросателита; процена ризика изумирања применом ESHIPPO crayfish модела (Simić *et al.*, 2015) и одређивање приоритета заштите на истраживаном подручју и дефинисање еволуционо значајних јединица (ESUs) и јединица управљања (MUs).

Анализа 22 морфолошка карактера показала је да постоји диференцијација јединки по локалитетима. Мужјаци су се разликовали у више карактера од женки. Мере карапакса (HEW, ROW, CGW, CPW, CEW) значајно су допринеле дискриминацији између

популација мужјака и између популација женки. Мултиваријантна статистичка анализа морфометријских карактера се још једном показала као корисна за квантификацију величине и облика организама и као добра техника за истраживање географских варијација истих.

Према резултатима филогенетске анализе детектовано је шест хаплотипова у оквиру 15 истраживаних популација. У истраживаним популацијама са територије Србије детектована су четири хаплотипа Нар26, Нар47, Нар48 и Нар49. Нар50 детектован је код популације из Албаније, а Нар51 код истраживаних популација из Словеније. Детектована је висока вредност диверзитета хаплотипова за читав скуп узорака ( $H_d = 0,665$ ).

Највеће вредности очекиване ( $H_e = 0,525$ ) и детектоване хетерозиготности ( $H_o = 0,539$ ) констатоване су у популацији из реке Качер, што указује на велику унутарпопулациону варијабилност. Најнижа генетичка варијабилност детектована је у популацији из акумулације Газиводе ( $H_e = 0,118$ ) и у популацији из акумулације Грлиште ( $H_e = 0,135$ ). Вредности коефицијента инбридинга ( $F_{is}$ ) у популацијама из акумулације Блоке, Преспанског језера и акумулације Кореница незнатно су веће од нуле па се може закључити да инбридинг постоји, али још увек није значајно заступљен, тако да је варијабилност на унутарпопулационом нивоу и даље значајна. Највећи број приватних алела по локусу детектован је у популацији из Преспанског језера. Највеће вредности генетичке удаљености између парова популација ( $F_{st}$ ) детектоване су између популација из акумулације Грлиште и акумулације Газиводе ( $F_{st} = 0,826$ ) и између популација из Преспанског језера и акумулације Газиводе ( $F_{st} = 0,808$ ). Најнижа вредност генетичке удаљености је детектована између популација из Ресничког потока и реке Качер ( $F_{st} = 0,328$ ). STRUCTURE анализа је показала јасну структурираност анализираних популација.

Применом ESHIPPO crayfish модела утврђен је први степен приоритета заштите за популације из Преспанског језера и акумулације Газиводе. Други степен приоритета заштите утврђен је за популације из акумулација Блоке, Кореница и Грлиште и популацију из Кочевске реке. Дефинисане су четири еволуционо значајне јединице (ESUs) и шест јединица управљања (MUs) према Moritz (1994) применом резултата анализе главних координата (PCoA), STRUCTURE анализе и урађених филогенетичких и популационих анализа.

Процењено стање популација речног рака на истраживаном подручју Балканског полуострва указује на постојање потребе за конзервацијом генофонда применом адекватних мера.

<b>Датум прихватања теме од стране ННВ</b>	
<b>Датум одбране</b>	
<b>Чланови комисије</b>	<b>Проф. др Владица Симић</b> <b>Научни саветник др Момир Пауновић</b> <b>Доцент др Ана Петровић</b>



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ  
ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОГИЈУ И ЕКОЛОГИЈУ



Радоја Домановића 12, 34000 Крагујевац, Србија

KEY WORDS DOKUMENTATION

Accession number	
Type of record	Textual material, printed
Contents code	PhD thesis
Author	Simona Đuretanić
Mentor	Prof. dr Ivana Maguire
Title	Phylogeny, phylogeography and conservation of species <i>Astacus astacus</i> (Decapoda, Astacidae) in the area of the Balkan Peninsula
Language of text	Serbian (Roman) (scr)
Language of abstract	Serbian (Roman) / English
Country of publication	Serbia
Publication year	2019.
Publisher	Copyright reprint
Publisher place	Radoja Domanovića 12 34000 Kragujevac, Serbia
Scientific field	Biology
Scientific discipline	Hydrobiology
Key words	The noble crayfish, phylogeny, phylogeography, conservation, the Balkan Peninsula
Holding data	In library of Faculty of Science, Kragujevac 34000 Kragujevac, Serbia, R. Domanovića 12
Note	

## Summary

The disappearance of species and the decline of biodiversity are the most serious global consequences of environmental threats. Aquatic ecosystems are under intense anthropogenic influence in terms of pollution, overexploitation, water course modification, habitat degradation and introduction of invasive species. The decline of biodiversity is far greater in freshwater ecosystems than in the most threatened terrestrial ecosystems, and the most vulnerable are invertebrates, such as freshwater crayfish. Even one-third of freshwater crayfish worldwide are at risk of extinction.

Crayfish are the largest mobile, freshwater invertebrates and indicators of good water quality. They are known as significant components of biodiversity, with an important ecological role in the proper functioning of freshwater ecosystems and the key role in food chains.

The noble crayfish has a complex historical and genetic status shaped by geological events, habitat loss and pollution, but is also a consequence of translocations and reintroduction of both autochthonous and allochthonous species of crayfish that led to the disruption of the species genetic structure, mixing and loss of populations across Europe. Natural subpopulations of the noble crayfish have been declining across Europe for 50-70% and it is classified as a "vulnerable species" in the IUCN Red List of Threatened Species with a decreasing trend of populations and subpopulations and decreasing distribution areas.

The objectives of this study were: to analyze the morphological variability of populations of the species *A. astacus* in the study area of the Balkan Peninsula by using the classical morphometry method; phylogenetic study of populations by analysis of *16S rRNA* and *COI* genes of mitochondrial DNA; evaluation of the differentiation and status of the studied populations by microsatellite markers; assessment of extinction risk by using the ESHIPPO crayfish model (Simić *et al.*, 2015) and defining conservation priorities in the study area and identifying evolutionarily significant units (ESUs) and management units (MUs).

Analysis of twenty-two morphometric characters showed differentiation of individuals by localities. Males differed in more characters than females. Measures of carapax (HEW, ROW, CGW, CPW, CEW) contributed significantly to discrimination between

male populations and between female populations. Once again multivariate analysis of morphometric characters has proved to be useful for quantifying the size and shape of organisms and as a good technique for exploring their geographical variations.

According to the results of phylogenetic analysis, six haplotypes were detected within the 15 studied populations. In the studied populations from Serbia, four haplotypes Hap26, Hap47, Hap48 and Hap49 were detected. Hap50 was detected in the Albanian population and Hap51 in populations from Slovenia. Haplotype diversity for the entire sample set ( $H_d = 0,665$ ) was high.

The highest values of expected ( $H_e = 0,525$ ) and observed heterozygosity ( $H_o = 0,539$ ) were reported in the population from the Kačer River, indicating a large intra-population variability. The lowest genetic variability was detected in the population from the Gazivode Reservoir ( $H_e = 0,118$ ) and in population from the Grlišće Reservoir ( $H_e = 0,135$ ).

The values of the inbreeding coefficient ( $F_{is}$ ) in populations from the Bloke Reservoir, Lake Prespa and Korenica Reservoir are slightly higher than zero, so it can be concluded that inbreeding exists but is not yet significantly represented, so variability at the intra-population level is still significant. The largest number of private alleles per locus was detected in the population from the Lake Prespa. The highest values of genetic distance between pairs of populations ( $F_{st}$ ) were detected between populations from the Grlišće Reservoir and the Gazivode Reservoir ( $F_{st} = 0,826$ ) and between populations from the Lake Prespa and the Gazivode Reservoir ( $F_{st} = 0,808$ ). The lowest genetic distance was detected between populations from the Resnik Creek and the Kačer River ( $F_{st} = 0,328$ ). STRUCTURE analysis showed a clear differentiation of the analyzed populations.

The first level of protection priority was established by using the ESHIPPO crayfish model for populations from the Lake Prespa and Gazivode Reservoir. The second level of protection priority has been established for populations from the Bloke, Korenica and Grlišće Reservoirs and population from the Kočevska River. Four evolutionarily significant units (ESUs) and six management units (MUs) were defined according to Moritz (1994) by using the results of Principal Coordinate Analysis (PCoA), STRUCTURE analysis and phylogenetic and population analysis.

The estimated status of the noble crayfish populations in the study area of the Balkan Peninsula indicates a need for gene pool conservation by applying appropriate measures.

<b>Accepted by Scientific Board on</b>	
<b>Defended on</b>	
<b>Commission</b>	<b>Full Professor, Vladica Simić, PhD</b> <b>Full Research Professor, Momir Paunović,</b> <b>PhD</b> <b>Assistant Professor, Ana Petrović, PhD</b>

**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Симона Р. Буретановић \_\_\_\_\_, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Филогенија, филогеографија и конзервација врсте *Astacus astacus*  
(Decapoda, Astacidae) на подручју Балканског полуострва

која је одбрањена на Природно-математичком факултету  
Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу \_\_\_\_\_, 25.12.2019. године,

Симона Буретановић  
потпис аутора



**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Симона Р. Ђуретановић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Филогенија, филогеографија и конзервација врсте *Astacus astacus*  
(Decapoda, Astacidae) на подручју Балканског полуострва

која је одбрањена на Природно-математичком факултету

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада<sup>2</sup>

У Крагујевцу \_\_\_\_\_, 25.12.2019. године,

  
потпис аутора

---

<sup>2</sup> Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>



## Morphometric variations among *Astacus astacus* populations from different regions of the Balkan Peninsula

Simona Duretanović<sup>1</sup> · Martina Jaklič<sup>2</sup> · Aleksandra Milošković<sup>1</sup> · Nataša Radojković<sup>1</sup> · Milena Radenković<sup>1</sup> · Vladica Simić<sup>1</sup> · Ivana Maguire<sup>3</sup>

Received: 23 June 2016 / Revised: 26 October 2016 / Accepted: 27 October 2016 / Published online: 10 November 2016  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

**Abstract** The morphometric variation among several populations of *Astacus astacus* from different regions of the Balkan Peninsula was studied based on a large set of morphometric parameters per crayfish. Differences in morphometry among populations from ten water bodies in Serbia, Slovenia and Albania were tested using a multiple discriminant analysis. Analyses included twenty-two morphometric parameters per crayfish. The most discriminant characteristics for separating males among populations were weight, head width (HEW), width of the carapace at the hind edges (CEW) and claw length (CLL), and for female populations those were abdomen length (ABL), rostrum width (ROW), total length (TL), claw length (CLL) and claw width (CLW). Our results improve the existing knowledge about the noble crayfish morphology, show clear differentiation between populations from various aquatic ecosystems and reflect geographical separation.

**Keywords** Noble crayfish · Morphometric characteristics · Multivariate statistics · Serbia · Slovenia · Albania

### Introduction

Freshwater ecosystems are characterized by a high spatial complexity, and this heterogeneity affects the distribution of aquatic organisms in riverine landscapes (Hepp et al. 2012). Freshwater crayfish are known as important components of biodiversity in rivers, lakes and wetlands, with crucial ecological role in the appropriate freshwater ecosystem functioning (Holdich 2002; Gherardi 2011), and with an important role in the food webs (Nyström et al. 1996; Usio and Townsend 2004; Sint et al. 2007; Zimmerman 2012). Europe is natively populated by five indigenous crayfish species whose abundance and distribution have been greatly altered and reduced due to climate changes, pollution, habitat degradation, introduction of alien crayfish species and crayfish plague (disease caused by the Oomycete *Aphanomyces astaci* (Schikora, 1906)) (Fevolden and Hessen 1989; Füreder et al. 2006; Souty-Grosset et al. 2006; Holdich et al. 2009; Papavlasopoulou et al. 2014). Also, the natural genetic structure of the species has been greatly impaired, mixed and diminished in large parts of Europe due to the high amount of manmade crayfish translocations and stockings (Grandjean and Souty-Grosset 2000; Schrimpf et al. 2011, 2014; Gross et al. 2013; Makkonen et al. 2015).

One of the native freshwater crayfish species, once widely distributed throughout Europe, including the Balkan Peninsula, is the noble crayfish, *Astacus astacus* (Linnaeus, 1758) (Kouba et al. 2014). Its native range extends from Russia and Ukraine in the east, to the UK and France in the west, to Finland, Sweden and Norway in the north and Greece in the south (Edsman et al. 2010). During the last century, many populations of this species diminished or became extinct (Holdich et al. 2009; Edsman et al. 2010; Schrimpf et al. 2011). Therefore, the noble crayfish is listed as “vulnerable”

✉ Simona Duretanović  
simona@kg.ac.rs; simonakovacevic@gmail.com

<sup>1</sup> Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>2</sup> Department of Organisms and Ecosystems Research, National Institute of Biology, Večna pot 111, 1000 Ljubljana, Slovenia

<sup>3</sup> Department of Biology, Faculty of Science, University of Zagreb, Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

on the IUCN (International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources) Red List of Threatened Species (IUCN 2015; Edsman et al. 2010). In Slovenia, the noble crayfish, along with two other indigenous crayfish species (stone and white-clawed crayfish), and their habitats are protected by national law (Anonymous 2004). They are listed as “vulnerable” on the national Red list of the Species (Anonymous 2002) and are also included in the national monitoring program. In Serbia, this species is classified as “endangered” and is strictly protected species (Anonymous 2010a, b). Morphometric measurements analyzed by multivariate statistical methods offer a good tool to explore differences between single groups of organisms. Moreover, analysis of crayfish morphometric features can be used for the distinction of populations without being as expensive as genetic analysis (Sint et al. 2005; Maguire and Dakić 2011). Traditional multivariate morphometrics, accounting for variation in size and shape, have successfully discriminated many fish stocks (Cadriñ and Friedland 1999) as well as crayfish (Sint et al. 2005, 2007; Maguire and Dakić 2011). The first studies on the noble crayfish biogeography and taxonomy were based on morphological characteristics (Karaman M. S. 1962, 1963; Albrecht 1983).

However, morphometric characteristics of the noble crayfish populations from Serbia, Slovenia and Albania have not yet been investigated. Previous work on the crayfish in Serbia included studies on their distribution (Karaman S. 1929; Karaman M. S. 1962, 1963; Simić et al. 2008), population status, degree of threat (Simić et al. 2008) and conservation strategy (Simić et al. 2015). In Slovenia, the previous crayfish studies were related mainly to the invasive species and their establishment (Jaklič and Vrezec 2011), to the crayfish distribution (Machino 1997; Bedjanić 2004), their physiological response (Simčić et al. 2012a, b, 2014), phylogeny and phylogeography (Trontelj et al. 2005) and presence of *Aphanomyces astaci* (Kušar et al. 2013). Studies in Albania included only the occurrence of epibiotic Branchiobdellida species on the crayfish (Subchev 2011), where some information on the host crayfish species was made available.

The aims of this study were (1) to determine whether populations of the noble crayfish from distant regions of the Balkan Peninsula are morphologically different and (2) to contribute to the knowledge on the morphology of the noble crayfish from this area as the basis for the forthcoming genetic research.

## Materials and methods

We conducted the field work and specimen collection in the three countries (Serbia, Slovenia, and Albania) from the Balkan Peninsula (Fig. 1). Altogether ten populations of *A.*

*astacus* were sampled, with permission of local authorities, seven from Serbia, two from Slovenia and one from Albania. The number of individuals per population is presented in Table 1.

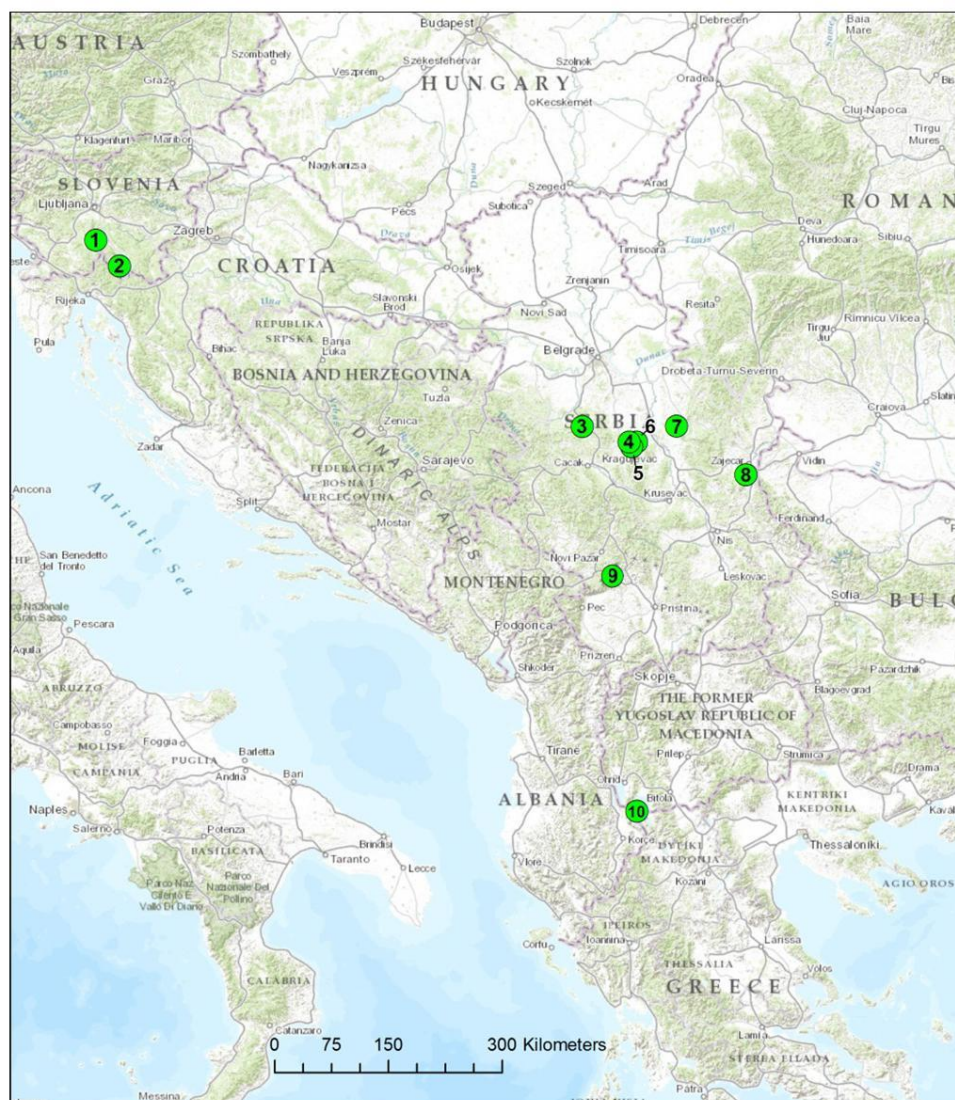
In Serbia, crayfish were sampled by hand, in shallow streams and rivers, or trapped with baited LiNi traps (Westman et al. 1978) that were left in bigger rivers and reservoirs overnights. We used fresh chicken or pork liver as bait. In Slovenia, classical cylindrical crayfish traps (76 × 23 cm) with funnel entrances on both ends were used for sampling, with fresh pork liver as bait (Holdich 2002). The traps were set into the water during the afternoon and collected the following morning. Albanian crayfish were purchased from a fisherman on Lake Prespa. All crayfish were sexed, and only unharmed specimens, without signs of regeneration, were measured according to Sint et al. (2005). Each specimen was also weighted to the nearest 0.01 g with electrical balance. Body mass was expressed as wet weight (WW) in grams (g). After measurement, crayfish were released at the place where they were caught.

We measured 21 morphometric characteristic, adopted from Sint et al. (2005) with a Vernier caliper to the nearest 1.0 mm for each specimen: total length (TL), rostrum length (ROL), rostrum width (ROW), head length (HEL), head width (HEW), areolar length (ARL), areolar width (ARW), abdomen length (ABL), abdomen width (ABW), abdomen height (ABH), telson length (TEL) and telson width (TEW), carapace width (CPW), width at the cervical groove (CGW), width of the carapace at the hind edges (CEW), carapace height (CPH), claw length (CLL), claw width (CLW), claw height (CLH), length of the claw palm (CPL) and length of the claw finger (CFL). The specimens whose total length was less than 70 mm were excluded from analysis in order to avoid immature individuals (Sint et al. 2007).

All of the measured characteristics were normalized for size by dividing them with the corresponding postorbital length ( $POL = HEL + ARL$ ) (Sint et al. 2005; Maguire and Dakić 2011).

## Statistics

Analyses were performed using SPSS 19.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) with significance level set at  $p < 0.05$ . Parametric tests (*t* test, ANOVA with post hoc Bonferroni test) were used when the data met assumptions for such tests (i.e., normality/homoscedasticity) (Zar 1999). Morphometric differentiation among *A. astacus* populations in the Balkan Peninsula was examined and evaluated by analyzing all of the measured variables simultaneously with discriminant functional analysis.



**Fig. 1** Map of sampling location: 1 the Bloščica River; 2 the Kočevska River; 3 the Kačer River; 4 the Milošev fishpond; 5 the Petrovačka River; 6 the Resnički Stream; 7 the Korenica Reservoir; 8 the Grliško Reservoir; 9 the Gazivode Reservoir; 10 Lake Prespa

**Table 1** Geographical coordinates of studied locations and number of specimens [females ( $N_f$ ) and males ( $N_m$ )] per population

Locations/populations	WGS84 coordinates		Number of specimens		
	<i>N</i>	<i>E</i>	$N_f$	$N_m$	Total
Resnički Stream, SRB	44.090175	20.937267	58	34	92
Petrovačka River, SRB	44.052394	20.877971	10	23	33
Kačer River, SRB	44.221652	20.280370	3	15	18
Korenica Reservoir, SRB	44.227491	21.413162	8	5	13
Griško Reservoir, SRB	43.811844	22.231652	6	9	15
Gazivode Reservoir, SRB	42.941469	20.647488	8	16	24
Milošev fishpond, SRB	44.091776	20.849418	12	8	20
Kočevska River, SLO	45.573	14.797	3	12	15
Bloščica River, SLO	45.786	14.516	5	19	24
Lake Prespa, ALB	40.864527	20.943473	16	38	54
Total			129	179	308

## Results

This research included ten populations of *A. astacus* with a total of 308 specimens (179 males, 129 females). Populations with less than seven individuals were excluded from the analysis.

The *t* test showed that males and females were significantly different in measured morphometric characteristics (TL, ROL, ABL, TEL, CLL, CFL, CPL, CLH, CLW, CPW, ABW, TEW and in weight). Consequently, further analyses were carried out separately for both sexes.

One-way ANOVA results showed a significant difference in the majority of the measured morphometric characteristics among the male populations ( $F$  value = 12.16,  $p < 0.001$ ) and also among female populations ( $F$  value = 7.06,  $p < 0.001$ ). Males did not significantly differ among the populations only in the two morphometric characteristics (CLH and ABH), while females were no significantly different among the populations in four characteristics (ABL, CFL, CPH, ABW) ( $p > 0.05$ ). Furthermore, results of Post hoc Bonferroni test indicated that significant differences exist in HEW between males from the Gazivode Reservoir and the Resnički Stream, Petrovačka River, Griško Reservoir, Milošev fishpond, Lake Prespa ( $p < 0.001$ ) and between the Gazivode Reservoir and the Kačer River ( $p = 0.005$ ); in ROW between males from the Bloščica River and the Resnički Stream, Petrovačka River, Milošev fishpond, Lake Prespa, Kočevska River ( $p < 0.001$ ); in CPW between males from the Kočevska River and all the other populations ( $p < 0.001$ ); in ABW between the Gazivode Reservoir and the Resnički Stream ( $p = 0.006$ ), between the Gazivode Reservoir and the Petrovačka River ( $p = 0.001$ ), between the Gazivode Reservoir and the Kačer River ( $p = 0.015$ ) and between males from the Gazivode Reservoir and the Milošev fishpond, Lake Prespa, Kočevska River, Bloščica River ( $p < 0.001$ ).

Results of Post hoc Bonferroni test showed that significant differences for females exist in TL between populations from the Gazivode Reservoir and the Resnički Stream, Petrovačka River, Milošev fishpond ( $p < 0.001$ ) and the Gazivode Reservoir and Lake Prespa ( $p = 0.002$ ); in ROL between the Korenica Reservoir and the Resnički Stream, Milošev fishpond ( $p < 0.001$ ) and the Korenica Reservoir and the Petrovačka River ( $p = 0.001$ ); in TEL between populations from the Gazivode Reservoir and the Resnički Stream, Korenica Reservoir, Milošev fishpond ( $p < 0.001$ ) and between the Gazivode Reservoir and the Petrovačka River ( $p = 0.011$ ); in CPL between populations from Lake Prespa and the Resnički Stream ( $p < 0.001$ ); in ABH between populations from the Korenica Reservoir and the Resnički Stream ( $p = 0.001$ ), the Korenica Reservoir and the Petrovačka River ( $p = 0.045$ ), the Korenica Reservoir and the Gazivode Reservoir ( $p = 0.021$ ), and the Korenica Reservoir and the Milošev fishpond, Lake Prespa ( $p < 0.001$ ); in HEW between populations from the Gazivode Reservoir and the Resnički Stream, Petrovačka River, Milošev fishpond, Lake Prespa ( $p < 0.001$ ); in ROW between populations from the Korenica Reservoir and the Resnički Stream, Petrovačka River, Milošev fishpond, Lake Prespa ( $p < 0.001$ ).

Since significant differences in measured morphometric characteristics between populations, for both males and females, were obtained, we conducted MDA. Multivariate discriminant analysis was performed in order to distinguish which of the measured morphometric characteristics contributes most to the difference among populations. The variables used in the analysis are listed in Table 2.

For male populations the first eight canonical discriminant functions were used in the analysis. The first two discriminant functions account for 52 and 18.4% of the explained variance, respectively, and the canonical R for those functions was 0.960 and 0.898, respectively. The

**Table 2** Standardized canonical discriminant function coefficients for *A. astacus* males and females morphometric characteristics

Males				Females			
Morph. parameter	Function 1	Function 2	Function 3	Morph. parameter	Function 1	Function 2	Function 3
TL	0.260	0.577	0.170	TL	0.738	0.550	-0.062
ROL	-0.212	0.364	-0.372	ROL	0.132	0.169	-0.286
HEL	0.368	0.124	0.219	HEL	0.005	-0.197	-0.137
ABL	-0.433	-0.939	0.130	ABL	-1.216	-0.887	-0.516
TEL	-0.040	0.249	-0.126	TEL	-0.356	0.386	-0.104
CLL	-0.518	0.353	-1.613	CLL	0.153	0.902	-0.560
CFL	0.371	-0.247	0.243	CFL	0.124	-0.529	0.184
CPL	-0.077	0.504	-0.189	CPL	0.007	0.511	-0.239
CLH	0.021	-0.148	-0.024	CLH	0.141	-0.015	-0.119
CLW	-0.201	-0.520	0.428	CLW	-0.441	-0.845	0.245
CPH	0.205	-0.189	-0.376	CPH	0.207	-0.081	-0.338
ABH	0.185	0.097	-0.162	ABH	0.355	-0.223	-0.268
HEW	0.689	0.491	-0.433	HEW	0.440	0.412	0.753
ROW	0.312	0.271	0.462	ROW	0.835	-0.206	0.047
CGW	-0.092	-0.215	-0.212	CGW	-0.147	-0.582	-0.437
CPW	-0.507	0.546	0.523	CPW	-0.216	0.398	0.062
ARW	-0.036	0.151	0.314	ARW	0.054	-0.095	0.283
CEW	0.590	-0.358	0.004	CEW	-0.480	0.308	0.385
ABW	-0.269	-0.302	0.630	ABW	0.036	0.197	-0.313
TEW	-0.233	-0.254	-0.076	TEW	-0.164	-0.085	0.347
Weight	0.959	-0.179	1.131	Weight	-0.192	0.301	1.081
Eigenvalue	11.758	4.159	3.789	Eigenvalue	3.543	3.056	2.016
% of variance	52	18.4	16.8	% of variance	36.1	31.2	20.6
Cumulative %	52	70.4	87.2	Cumulative %	36.1	67.3	87.8
Canonical R	0.96	0.898	0.889	Canonical R	0.883	0.868	0.818

Eigenvalue, percentage of explained variance, cumulative percentage of the variance and canonical correlations are given as well

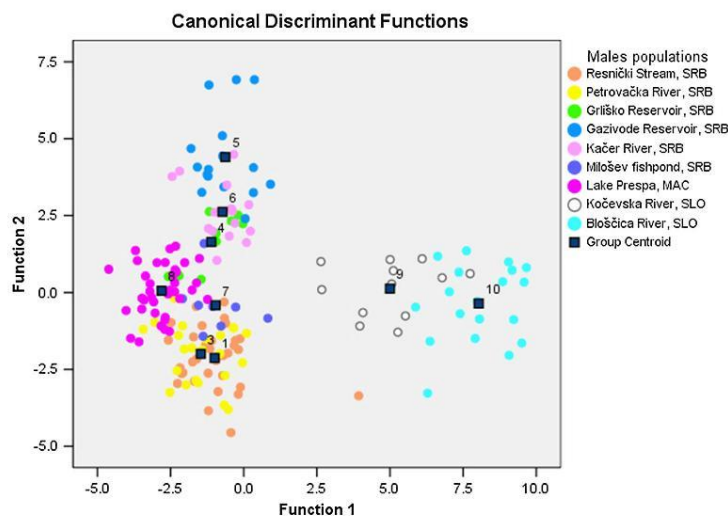
most important parameter for differentiation was weight (loading in discriminant function 1 = 0.959), followed by HEW (loading in discriminant function 1 = 0.689), CEW (loading in discriminant function 1 = 0.590) and CLL (loading in discriminant function 1 = -0.518). The second discriminant function account is weighed mostly by ABL (loading in discriminant function 2 = -0.939), TL (loading in discriminant function 2 = 0.577), CPW (loading in discriminant function 2 = 0.546) and CLW (loading in discriminant function 2 = 0.546).

For female populations, the first five canonical discriminant functions were used in the analysis. Canonical R for the first two discriminant functions had high values, and they were 0.883 and 0.868, respectively. The first discriminant function accounts for 36.1% of the explained variance and is weighed mostly by ABL (loading in discriminant function 1 = -1.216), ROW (loading in discriminant function 1 = 0.835) and TL (loading in discriminant function 1 = 0.738). The second discriminant

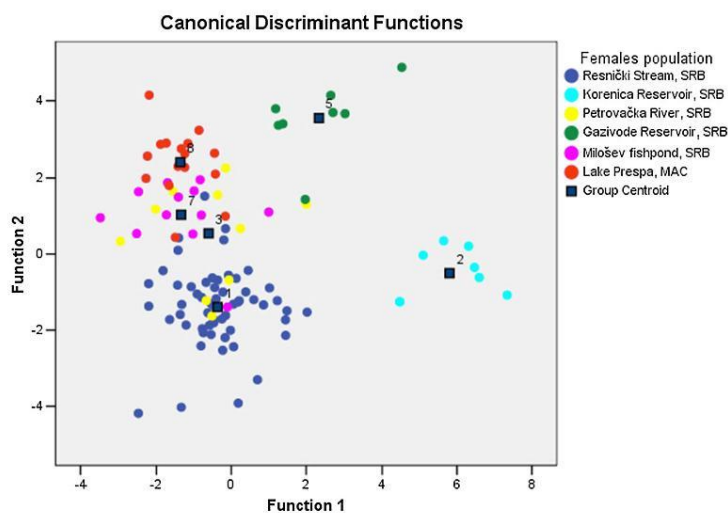
function accounts for 31.2% of the explained variance and is weighed mostly by CLL (loading in discriminant function 2 = 0.902), ABL (loading in discriminant function 2 = -0.887) and CLW (loading in discriminant function 2 = -0.845).

We made plots of the first two discriminant functions for better visualization of separated populations for males (Fig. 2) and females (Fig. 3). For males, the first discriminant function provides discrimination between populations from Slovenia and other populations which have negative values for the first canonical function (Fig. 2). Since the first discriminant function is marked by high positive loadings for weight, HEW and CEW and high negative loadings for CLL, CPW and ABL (Table 2), we may say the higher the values of weight, HEW and CEW are, more likely the crayfish belongs to Slovenian populations, and the smaller the values of CLL, CPW and ABL are, more likely the crayfish belongs to Lake Prespa population and to Serbian populations. The second discriminant function

**Fig. 2** Discrimination of *A. astacus* populations by the first two discriminant functions for males



**Fig. 3** Discrimination of *A. astacus* populations by the first two discriminant functions for females



seems to provide some discrimination between the Gazivode Reservoir population, Lake Prespa population and Petrovačka River population, but there was overlapping to some degree between the males from the Gazivode Reservoir and Kačer River, and males from the Petrovačka River, Resnički Stream and Milošev fishpond.

For females, the first discriminant function provides discrimination between populations from the Gazivode Reservoir and Korenica Reservoir and other populations

which have negative values for the first canonical function (Fig. 3). The second discriminant function provides discrimination between populations from the Gazivode Reservoir and Resnički Stream. The first discriminant function is marked by high positive loadings for TL, ROW and HEW and high negative loadings for ABL, CEW and CLW (Table 2), so we may say the higher the values of TL, ROW and HEW are, more likely the crayfish belongs to the Korenica Reservoir and Gazivode Reservoir, and the



smaller the values of ABL, CEW and CLW are, more likely the crayfish belongs to Lake Prespa population and to Milošev fishpond. The second discriminant function is marked by high positive loadings for CLL, CPL and TL and high negative loadings for ABL, CLW and CGW. The higher the values of CLL, CPL and TL are, more likely the crayfish belongs to population from the Gazivode Reservoir, and the smaller the values of ABL, CLW and CGW are, more likely the crayfish belongs to populations from the Resnički Stream.

The number of the correctly classified cases for males was 94.8 and 94.6% for females.

## Discussion

Morphometrics are useful in order to quantify the size and shape of organisms with the methods of multivariate statistics (Klingenberg 2002). Traditionally, morphometrics was the application of multivariate statistical analyses to sets of quantitative variables such as length, width and height (Adams et al. 2004). Multivariate statistical analysis of morphometric characters is a powerful technique to investigate the geographical variation of stocks (Palma and Andrade 2002). Generally, morphological differentiation can appear as a consequence of genetic differences or environmental factors or their interaction (Pakkasmaa and Piironen 2001). The quantification of specific characteristics of an individual, or a group of individuals, can demonstrate the degree of speciation induced by both biotic and abiotic conditions and contribute to the definition of different stocks of species (Palma and Andrade 2002).

Research by Saila and Flowers (1969), Chambers et al. (1979), Sint et al. (2005, 2006, 2007), Maguire and Dakić (2011) had demonstrated that the analyses of a large morphometric data set per individual are a good tool for distinguish groups of decapods, which was not possible to achieve by analyses of only a few morphometric parameters (Grandjean and Souty-Grosset 2000). Morphometric characterization has also been applied successfully in freshwater and marine fish stock identification (Pakkasmaa and Piironen 2001; Palma and Andrade 2002).

In the present study, for the first time, we applied detailed morphometrics on distinct population of the noble crayfish from different regions of the Balkan Peninsula in order to verify whether there are differences between them. According to Albrecht (1983), the noble crayfish probably survived the last glaciations on the Balkan Peninsula and then spread northward and westward along the Danube drainage system (Schrimpf et al. 2011, 2014). The molecular study of Schrimpf et al. (2011, 2014) indicates high differentiation between populations from the western Balkans and the eastern Black Sea basin (Romania and

Bulgaria) and identifies southeastern Europe as the hotspot of genetic diversity for the noble crayfish. Also, the authors suggest more detailed analysis of southeastern European populations to be conducted since many haplotypes that link the eastern Black Sea basin and western Balkans haplotypes are missing. Obtained results showed that differences exist between populations for both, males and females, in measured morphometric characteristic. Those differences reflect geographical distance, which is similar to findings by Sint et al. (2005) and Maguire and Dakić (2011), for other crayfish species. Similar to the above-mentioned studies, we also found that males differed in more characters than females. The most important character for distinguishing males from different populations, with the highest loading in the discriminant analysis, was weight, which is different from previous studies of Maguire and Dakić (2011) and Sint et al. (2005). On the other hand, for females characteristics with the highest loading were ABL, CLL and CLW, likewise was in study of Maguire and Dakić (2011) for other crayfish species.

In our study, carapace measurements (HEW, ROW, CGW, CPW, CEW) had significantly contributed to discrimination between males and females populations, since their values had the highest loadings in the first and second discriminant functions. According to Sint et al. (2005), an advantage of carapace measurements is that they are neither influenced by loss and regeneration, such as the case with claws, nor by abdominal muscle contractions.

Recorded morphometric differences among Serbian populations were pronounced. Ascertainment differences may have been the result of the isolation of populations since Simić et al. (2008) had estimated that, in the period 1960–2006, the area inhabited by *A. astacus* on the territory of Serbia was reduced by more than 65% and only isolated populations have been registered. Population genetics theory predicts that small isolated populations with low levels of gene flow characteristically show a low genetic diversity within populations and a high genetic differentiation among populations (Grandjean and Souty-Grosset 2000). Besides the aforementioned degradation of habitats, pollution and disease that significantly contributed to population decline, Simić et al. (2008) also noted that *Astacus leptodactylus* behaves in an expansive way and substitutes *A. astacus* in some habitats. The results of Stucki and Romer (2001) also suggest that *A. leptodactylus* is more aggressive than *A. astacus* and is dominant in agonistic interactions.

In our study, the percentage of correctly classified specimens was higher than recorded in research by Sint et al. (2005), but similar to records in research by Maguire and Dakić (2011). The higher was the percentage of correct classification in the discriminant analysis, the greater was the distance between populations. Obtained result showed

that the greatest distance appeared between the male populations from Slovenia and all other populations which is understandable considering the geographical distance between them and the loss of connectivity (Santos and Araújo 2015). When it comes to the female populations, the greatest distance exists between populations from Lake Prespa, Korenica Reservoir and Resnički Stream. This partly reflected the differences in the habitats. Morphometric differences obtained in this study could be a consequence of differences in noble crayfish genome or they may be attributed to their phenotypical plasticity. Part of the differences may be the consequence of aquatic ecosystem types and influences of local environmental factors—e.g., lakes and reservoirs versus rivers and streams (Santos and Araújo 2015). Environmental factors can produce phenotypic plasticity, which is the capacity of a genotype to produce different phenotypes in different environmental conditions (Pakkasmaa and Piironen 2001). It is well known that organisms tend to adapt to their specific environment, and these adaptations can influence both the genotype and the phenotype (Swain and Foote 1999). So to verify if recorded differences are of genetic origin, future studies should include molecular analyses (mitochondrial DNA and microsatellite analyses).

Once again, morphometric characteristics in combination with the discriminant analysis proved to be a good tool for distinguishing population. It is particularly important that this method is not invasive; it is inexpensive and can be easily applied in the field. Still, the knowledge of genetic variations within and between populations is needed as an essential prerequisite for the protection of species (Avisé 2004; Skuza et al. 2016). Molecular phylogenetic research together with sound knowledge of morphometry will be a good basis for future conservation management of this endangered species.

**Acknowledgements** This study was supported by the Ministry of Education, Science, and Technological Development of the Republic of Serbia, Project No. TR31011.

#### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Human and animals rights statement** All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

## References

- Adams D, Rohlf J, Slice D (2004) Geometric morphometrics: ten years of progress following the “revolution”. *Ital J Zool* 71(1):5–16
- Albrecht H (1983) Besiedlungsgeschichte und ursprüngliche holozäne Verbreitung der europäischen Flußkrebse (Decapoda: Astacidae). *Spixiana* 6:61–77
- Anonymous (2002) Pravilnik o uvrstitvi ogroženih rastlinskih in živalskih vrst v rdeči seznam. Uradni list Republike Slovenije, 82/2002: 8893–8975, 42/2010:5990–5993 (in Slovenian)
- Anonymous (2004) Uredba o zavarovanih prostoživečih živalskih vrstah v Sloveniji. Uradni list Republike Slovenije, 46/2004: 5963–6017 in 109/2004, 84/2005, 115/2007, 96/2008, 36/2009, 102/2011 (in Slovenian)
- Anonymous (2010a) Regulation on proclamation and protection of strictly protected and protected plant, animal and fungi species. Appendix 1. Strictly protected species. Official Gazette RS 5/10 (in Serbian)
- Anonymous (2010b) Regulation on proclamation and protection of strictly protected and protected plant, animal and fungi species. Appendix 2. Protected species. Official Gazette RS 5/10 (in Serbian)
- Avisé JC (2004) Molecular markers, natural history and evolution. Sinauer Associates, Sunderland, p 684
- Bedjanič M (2004) Novi podatki o razširjenosti raka navadnega koščaka *Austropotamobius torrentium* (Schränk, 1803) v Sloveniji (Crustacea: Decapoda). *Natura Sloveniae* 6(1):25–33
- Cadrin SX, Friedland KD (1999) The utility of image processing techniques for morphometric analysis and stock identification. *Fish Res* 43(1):129–139
- Chambers CL, Payne JF, Kennedy ML (1979) Geographic variation in the dwarf crayfish, *Cambarellus puer* Hobbs (Decapoda, Cambaridae). *Crustaceana* 36:39–55
- Edsman L, Füreder L, Gherardi F, Souty-Grosset C (2010) *Astacus astacus*. In: IUCN 2010, IUCN red list of threatened species, version 2010.4. <http://www.iucnredlist.org>. Accessed Oct 2015
- Fevolden E, Hessen D (1989) Morphological and genetic differences among recently founded populations of noble crayfish (*Astacus astacus*). *Hereditas* 110:149–158
- Füreder L, Edsman L, Holdich D, Kozak P, Machino Y, Pockl M, Renai B, Reynolds J, Schulz R, Schulz H, Sint D, Taugbol T, Trouilhé MC (2006) Indigenous crayfish. Habitat and threats. In: Souty-Grosset C, Holdich D, Noël P, Reynolds J, Haffner P (eds) Atlas of crayfish in Europe. Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, pp 25–47
- Gherardi F (2011) Towards a sustainable human use of freshwater crayfish (Crustacea, Decapoda, Astacidea). *Knowl Manag Aquat Ecosyst* 401:02
- Grandjean F, Souty-Grosset C (2000) Genetic and morphological variation in the endangered crayfish species *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet) (Crustacea, Astacidae) from the Poitou-Charentes region (France). *Aquat Sci* 62:1–19
- Gross R, Palm S, Köiv K, Prestegard T, Jussila J, Paaver T, Geist J, Kokko H, Karjalainen A, Edsman L (2013) Microsatellite markers reveal clear geographic structuring among threatened noble crayfish (*Astacus astacus*) populations in Northern and Central Europe. *Conserv Genet* 14(4):809–882
- Hepp L, Fornel R, Restello R, Trevisan A, Santos S (2012) Intraspecific morphological variation in a freshwater crustacean *Aegla plana* in southern Brazil: effects of geographical isolation on carapace shape. *J Crustac Biol* 32(4):511–518
- Holdich D (2002) Distribution of crayfish in Europe and some adjoining countries. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 367:611–650
- Holdich D, Reynolds J, Souty-Grosset C, Sibley P (2009) A review of the ever increasing threat to European crayfish from non-indigenous crayfish species. *Knowl Manag Aquat Ecosyst* 11:394–395
- IUCN (2015) IUCN red list of threatened species. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org). Accessed 29 Oct 2015

- Jaklič M, Vrezec A (2011) The first tropical alien crayfish species in European waters: the redclaw *Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1868) (Decapoda, Parastacidae). *Crustaceana* 84(5):651–665
- Karaman S (1929) Die Potamobiiden Jugoslaviens. *Glasnik zemaljskog muzeja u Bosni i Hercegovini* 41:147–150
- Karaman MS (1962) Ein Beitrag zur Systematik der Astacidae (Decapoda). *Crustaceana* 3(3):173–191
- Karaman MS (1963) Studie der Astacidae (Crustacea, Decapoda). *Hydrobiologia* 22(1):111–132
- Klingenberg CP (2002) Morphometrics and the role of the phenotype in studies of the evolution of developmental mechanisms. *Gene* 287(1):3–10
- Kouba A, Petrušek A, Kozák P (2014) Continental-wide distribution of crayfish species in Europe: update and maps. *Knowl Manag Aquat Ecosyst* 413:05
- Kušar D, Vrezec A, Očepek M, Jenčič V (2013) *Aphanomyces astaci* in wild crayfish populations in Slovenia: first report of persistent infection in a stone crayfish *Austropotamobius torrentium* population. *Dis Aquat Org* 103(2):157–169
- Machino Y (1997) Crayfish of the upper Soca and upper Sava rivers, Slovenia. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 347:721–729
- Maguire I, Dakić L (2011) Comparative analyses of *Astacus leptodactylus* morphological characteristics from Croatia and Armenia. *Biologia* 66(3):491–498
- Makkonen J, Kokko H, Jussila J (2015) Mitochondrial cytochrome oxidase I gene analysis indicates a restricted genetic background in Finnish noble crayfish (*Astacus astacus*) stocks. *Knowl Manag Aquat Ecosyst* 416:21
- Nyström P, Brönmark C, Granéli W (1996) Patterns in benthic food webs: a role for omnivorous crayfish? *Freshw Biol* 36(3):631–646
- Pakkasmaa S, Piironen J (2001) Morphological differentiation among local trout (*Salmo trutta*) populations. *Biol J Linn Soc* 72:231–239
- Palma J, Andrade JP (2002) Morphological study of *Diplodus sargus*, *Diplodus puntazzo* and *Lithognathus mormyrus* (Sparidae) in the Eastern Atlantic and Mediterranean Sea. *Fish Res* 57:1–8
- Papavasopoulou I, Perdikaris C, Vardakas L, Paschos I (2014) Enemy at the gates: introduction potential of non-indigenous freshwater crayfish in Greece via the aquarium trade. *Cent Eur J Biol* 9(1):11–18
- Saila SB, Flowers JM (1969) Geographic morphometric variation in the American lobster. *Syst Biol* 18(3):330–338
- Santos ABI, Araújo FG (2015) Evidence of morphological differences between *Asiyanax bimaculatus* (Actinopterygii: Characidae) from reaches above and below dams on a tropical river. *Environ Biol Fishes* 98(1):183–191
- Schrimpf A, Schulz HK, Theissinger K, Pärvolescu L, Schulz R (2011) The first large-scale genetic analysis of the vulnerable noble crayfish *Astacus astacus* reveals low haplotype diversity in central European populations. *Knowl Manag Aquat Ecosyst* 401:35
- Schrimpf A, Theissinger K, Dahlem J, Maguire I, Pärvolescu L, Schulz HK, Schulz R (2014) Phylogeography of noble crayfish (*Astacus astacus*) reveals multiple refugia. *Freshw Biol* 59(4):761–776
- Simčić T, Pajk F, Vrezec A, Brancelj A (2012a) Size scaling of whole-body metabolic activity in the noble crayfish (*Astacus astacus*) estimated from measurements on a single leg. *Freshw Biol* 57(1):39–48
- Simčić T, Pajk F, Brancelj A, Vrezec A (2012b) Preliminary multispecies test of a model for non-lethal estimation of metabolic activity in freshwater crayfish. *Acta Biol Slov* 55(1):15–27
- Simčić T, Pajk F, Jaklič M, Brancelj A, Vrezec A (2014) The thermal tolerance of crayfish could be estimated from respiratory electron transport system activity. *J Therm Biol* 41:21–30
- Simić V, Petrović A, Rajković M, Paunović M (2008) Crayfish of Serbia and Montenegro—the population status and the level of endangerment. *Crustaceana* 81(10):1153–1176
- Simić V, Maguire I, Rajković M, Petrović A (2015) Conservation strategy for the endangered crayfish species of the family Astacidae: the ESHIPPO crayfish model. *Hydrobiologia* 760(1):1–13
- Sint D, Dalla Via J, Füreder L (2005) Morphological variations in *Astacus astacus* L. and *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet) populations. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 376–377:637–652
- Sint D, Dalla Via J, Füreder L (2006) The genus *Austropotamobius* in the Ausserfern region (Tyrol, Austria) with an overlap in the distribution of *A. torrentium* and *A. pallipes* populations. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 380–381:1029–1040
- Sint D, Dalla Via J, Füreder L (2007) Phenotypical characterization of indigenous freshwater crayfish populations. *J Zool* 273(2):210–219
- Skuza L, Keszka S, Panicz R, Śmietana P (2016) Molecular characterization of the noble crayfish (*Astacus astacus* L.) population from Pomeranian lakes (north-western Poland) based on mitochondrial DNA. *Knowl Manag Aquat Ecosyst* 417:13
- Souty-Grosset C, Holdich DM, Noël PY, Reynolds J, Haffner P (2006) Atlas of crayfish in Europe. *Muséum national d'Histoire naturelle, Paris*
- Stucki TP, Romer J (2001) Will *Astacus leptodactylus* displace *Astacus astacus* and *Austropotamobius torrentium* in Lake Ägeri, Switzerland? *Aquat Sci* 63(4):477–489
- Subchev M (2011) First Record of *Branchiobdella Odier*, 1823 (Annelida: Clitellata) in Albania and an overview of the Geographic Distribution of *Branchiobdella hexodontia* Gruber, 1882 in Europe. *Acta Zool Bulg* 63(1):109–112
- Swain DP, Foote CJ (1999) Stocks and chameleons: the use of phenotypic variation in stock identification. *Fish Res* 43(1):113–128
- Trontelj P, Machino Y, Sket B (2005) Phylogenetic and phylogeographic relationships in the crayfish genus *Austropotamobius* inferred from mitochondrial COI gene sequences. *Mol Phylogenet Evol* 34(1):212–226
- Usio N, Townsend CR (2004) Roles of crayfish: consequences of predation and bioturbation for stream invertebrates. *Ecology* 85(3):807–822
- Westman K, Pursiainen M, Vilkmann R (1978) A new folding trap model which prevents crayfish from escaping. *Freshw Crayfish* 4:235–242
- Zar JH (1999) *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, Upper Saddle River
- Zimmerman JKM (2012) Noble crayfish (*Astacus astacus*) in a changing world—implications for management. Dissertation, University of Sweden