

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Anita Tarandek

**USPOREDBA IMUNOSNOG ODGOVORA ZAVIČAJNE I INVAZIVNE STRANE  
VRSTE DESETERNOŽNIH RAKOVA RIJEKE KORANE**

Zagreb, 2021.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za biologiju i ekologiju mekušaca i rakova na Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Sandre Hudina i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2020./2021.

# Sadržaj rada

<b>1. Uvod</b> .....	1
1.1. Slatkovodni ekosustavi i invazivne strane vrste slatkovodnih ekosustava .....	1
1.2. Invazivne strane vrste slatkovodnih ekosustava.....	1
1.3. Invazivne strane vrste slatkovodnih deseteronožnih rakova .....	2
1.4. Invazivne strane i zavičajne vrste deseteronožnih rakova u Hrvatskoj .....	3
1.5. Imunosni odgovor i njegova uloga u invazivnom uspjehu slatkovodnih deseteronožnih rakova .....	6
<b>2. Hipoteza i cilj rada</b> .....	9
<b>3. Materijali i metode</b> .....	10
3.1. Područje istraživanja.....	10
3.2. Uzorkovanje jedinki.....	12
3.3. Laboratorijske analize .....	12
3.3.1. Analiza imunosnog odgovora .....	12
3.3.2. Parametri kondicijskog statusa.....	17
3.4. Statistička obrada podataka.....	18
<b>4. Rezultati</b> .....	19
4.1. Deskriptivna statistička analiza .....	19
4.2. Korelacija između veličine jedinki i parametara kondicijskog statusa i imunosnog odgovora pojedine vrste.....	21
4.3. Korelacija između spolova i parametara kondicijskog statusa i imunosnog odgovora pojedine vrste .....	21
4.3.1. Zavičajna vrsta uskoškari rak.....	21
4.3.2. Invazivna strana vrsta signalni rak .....	23
4.4. Korelacija između vrsta i parametara kondicijskog statusa i imunosnog odgovora.....	24

4.4.1. Parametri kondicije.....	24
4.4.2. Parametri imunosnog odgovora .....	26
<b>5. Rasprava.....</b>	<b>29</b>
<b>6. Zaključak.....</b>	<b>33</b>
<b>7. Zahvale .....</b>	<b>34</b>
<b>8. Popis literature .....</b>	<b>35</b>
<b>9. Sažetak.....</b>	<b>45</b>
<b>10. Summary .....</b>	<b>46</b>
<b>11. Životopis .....</b>	<b>47</b>

# 1. Uvod

## 1.1. Slatkovodni ekosustavi i invazivne strane vrste slatkovodnih ekosustava

Slatkovodni su ekosustavi jedni od najbogatijih ekosustava, odnosno imaju najveći broj vrsta po jedinici površine (Dudgeon i sur. 2006). Njihova raznolikost predstavlja iznimno vrijedan prirodni resurs i imaju važnu ulogu u gospodarstvu, kulturi, znanosti i obrazovanju (Dudgeon i sur. 2006). Unatoč tome što zauzimaju samo 0,8 % površine Zemlje, predstavljaju dom mnogim organizmima. Kao najraznolikiji ekosustavi, slatkovodni su ekosustavi ujedno i najugroženiji na svijetu (Strayer i Dudgeon 2010). Naime, zbog ograničenih mogućnosti rasprostranjenja vrsta u slatkovodnim ekosustavima zbog izoliranosti staništa i njihove ograničene veličine, u slatkovodnim ekosustavima obitava veliki broj endemskih vrsta koje su osjetljivije na promjene okoliša zbog svoje uske ekološke valencije (Dudgeon i sur. 2006). Povrh svega navedenoga, globalni porast broja stanovnika uzrokovao je i porast potrebe za korištenjem i upravljanjem slatkovodnim ekosustavima, stoga degradaciji istih također uvelike doprinosi i antropogeni utjecaj. Među brojnim antropogenim pritiscima ubrajamo zagađenje, pretjerani, nekontrolirani izlov slatkovodnih organizama, otpadne vode i izgradnju brana (Strayer 2006), međutim daleko veći pritisak danas predstavlja unos invazivnih stranih vrsta u slatkovodne ekosustave.

## 1.2. Invazivne strane vrste slatkovodnih ekosustava

Invazivne strane vrste jedan su od dominantnih čimbenika antropogenog poremećaja okoliša s velikim gospodarskim i ekološkim utjecajima. Invazivna strana vrsta je strana vrsta slučajno ili namjerno unesena izvan područja prirodne rasprostranjenosti i čije naseljavanje i/ili širenje ugrožava biološku raznolikost, zdravlje ljudi ili uzrokuje ekonomsku štetu (Zakon o zaštiti prirode, NN 80/13; Uredba (EU) br. 1143/2014 Europskog parlamenta i vijeća 2014). Međunarodna unija za očuvanje prirode („*International Union for Conservation of Nature and Natural Resources*“, IUCN 2021) navodi invazivne strane vrsta kao jedan od vodećih razloga gubitka biološke raznolikosti. U Europskoj Uniji upravljanje invazivnim stranim vrstama

definirano je Uredbom br. 1143/2014 Europskog parlamenta i Vijeća (2014), koja donosi i popis invazivnih stranih vrsta koje izazivaju zabrinutost u Uniju te propisuje potrebu razvoja učinkovitih mjera upravljanja.

Sami putevi unosa i širenja invazivnih stranih vrsta su raznoliki. Mnoge su vrste unesene namjerno na novo stanište, za potrebe akvakulture, kao rezultat trgovine kućnim ljubimcima, upotrebe u biološkim istraživanjima, te kao biokontrola drugih invazivnih stranih vrsta (Pyšek i sur. 2011). S druge strane, brojne su vrste unesene slučajno preko ribarskih mreža, povezivanjem slivova velikih rijeka, prijenosom preko balastnih voda i slično (Floerl i Inglis 2005).

Neovisno o razlozima unosa novih vrsta, činjenica je da su u posljednjih nekoliko desetljeća invazivne strane vrste negativno utjecale na slatkovodne ekosustave. Dosadašnja istraživanja pokazala su kako su invazivne strane vrste glavni razlog nestanka mnogih zavičajnih vrsta (Sala i sur. 2000). Ista istraživanja pokazuju kako je broj i utjecaj invazivnih stranih vrsta puno izraženiji u vodenim ekosustavima za razliku od kopnenih ekosustava. Djelomičan razlog tome je što invazivne strane vrste u vodenim ekosustavima imaju tendenciju bržeg rasprostranjivanja te ih je teško detektirati, a jednom kada su ušle u slatkovodni ekosustav vrlo ih je teško ukloniti i kontrolirati njihovu brojnost (Genovesi 2007).

### 1.3. Invazivne strane vrste slatkovodnih deseteronožnih rakova

Deseteronožni rakovi imaju ključnu ulogu u održavanju strukture zajednica slatkovodnih ekosustava: među najvećim su beskralježnjacima, dugo žive, agresivni su i bioturbacijom te ukopavanjem u sediment i dno za izradu skloništa (Johnson i sur. 2011) utječu na dinamiku transporta sedimenta i stabilnost obala (Faller i sur. 2016). Nadalje, s obzirom na to da su omnivori, rakovi imaju ključnu ulogu u vodenom staništu, prenoseći energiju unutar hranidbene mreže i između vodenih i kopnenih hranidbenih lanaca kao potrošači velikog broja različitih izvora hrane te kao plijen za brojne kralježnjake, od riba do sisavaca (Crehuet i sur. 2007).

Deseteronožni rakovi su jedna od najuspješnijih skupina invazivnih stranih vrsta slatkovodnih ekosustava. Jedna su od najčešće namjerno prenošenih skupina vodenih beskralježnjaka, ponajviše za potrebe akvakulture i akvaristike (Holdich i sur. 2009). U samom

ekosustavu invazivne strane vrste slatkovodnih rakova su u kompeticiji za prostor i hranu sa zavičajnim vrstama rakova te ih tako istiskuju. Obično su agresivnije od zavičajnih vrsta (Söderbäck 1991; Usio i sur. 2001) brže rastu, imaju veći fekunditet i ranije spolno sazrijevaju (Huber i Schubart 2005). Osim toga invazivne strane vrste rakova mogu biti vektori bolesti koje su letalne za zavičajne rakove, poput uzročnika račje kuge, oomicete *Aphanomyces astaci* (Schikora, 1906) (Filipova i sur. 2013). Račja kuga je najopasnija bolest koja zahvaća zajednice slatkovodnih rakova (Gherardi 2007). Iako različite vrste rakova pokazuju bitno drugačiji stupanj osjetljivosti na infekciju, generalno je svaki pojedini rak sklon obolijevanju, a time i podložan izrazito visokoj stopi smrtnosti koju izaziva račja kuga. Međutim same invazivne strane vrste rakova stekle su otpornost na razvoj bolesti, zahvaljujući koevoluciji s patogenom. U slučaju razvoja bolesti, simptomi su kod invazivnih stranih vrsta puno blaži, a manifestiraju se u obliku benignih melaniziranih lezija, iako u određenim okolnostima povišenog stresa sama bolest može biti pogubna čak i za invazivne strane vrste rakova (Aydin i sur. 2014).

#### 1.4. Invazivne strane i zavičajne vrste deseteronožnih rakova u Hrvatskoj

U slatkovodnim ekosustavima Hrvatske dosadašnjim je istraživanjima utvrđena prisutnost tri strane, sjevernoameričke vrste: *Faxonius limosus* (Rafinesque, 1817) – bodljobrati rak, *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) – signalni rak i *Procambarus virginalis* Lyko, 2017 – mramorni rak (Maguire i Klobučar 2003, Maguire i sur. 2008; Samardžić i sur. 2014). Vrsta *Faxonius limosus* u Hrvatskoj je zabilježena po prvi puta 2003. godine (Maguire i Klobučar 2003) u istočnom dijelu države, u Parku prirode Kopački rit, gdje se proširila iz Mađarske rijekom Dunav (Hudina i sur. 2009). Vrsta *Procambarus virginalis* u Hrvatskoj je po prvi puta zabilježena u jezeru Šoderica 2014. godine (Samardžić i sur. 2014).

Signalni rak, *P. leniusculus* najrasprostranjenija je invazivna strana vrsta slatkovodnih deseteronožnih rakova u Europi čije je prisustvo zabilježeno u čak 29 zemalja diljem Europe (Kouba i sur. 2014). Uz *F. limosus* najrasprostranjenija je invazivna strana vrsta rakova u Hrvatskoj (Maguire i sur. 2018). Ime je dobio po karakterističnom plavo-bijelom obojenju na spoju pomičnog i nepomičnog prsta kliješta (Slika 1). U Hrvatskoj je po prvi puta zabilježen 2008. godine u rijeci Muri (Maguire i sur. 2008), gdje se proširio nizvodnim putem iz Austrije gdje je

ilegalno unesen iz Kalifornije (Holdich i sur. 2009). Kasnije 2011. godine, njegovo je prisustvo zabilježeno i u rijeci Dravi (Hudina i sur. 2013) gdje se proširio nizvodnim širenjem kroz rijeku Muru sa brzinom širenja od 18 do 24,4 km godišnje, što je među najvećim zabilježenim brzinama u Europi (Hudina i sur. 2009). Iste 2011. godine signalni je rak pronađen i u rijeci Korani u koju je unesen od strane ljudi (Hudina i sur. 2013). Ovdje predstavlja veliku prijetnju bogatoj zavičajnoj astakofauni (Hudina i sur. 2017). Ovdje je brzina širenja signalnog raka od 1,3 do 1,7 km godišnje (Dragičević i sur. 2020), a samim širenjem istiskuje zavičajnu vrstu uskoškarog raka *Pontastacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) (Hudina i sur. 2013; Rebrina i sur. 2015). Nedavno je 2019. godine prisustvo signalnog raka po prvi puta potvrđeno u susjednoj Bosni i Hercegovini u rijeci Uni (Trožić-Borovac i sur. 2019) što može dovesti do širenja ove vrste u nove vodotoke u Hrvatskoj, tako povećavajući prijetnju zavičajnim vrstama rakova.

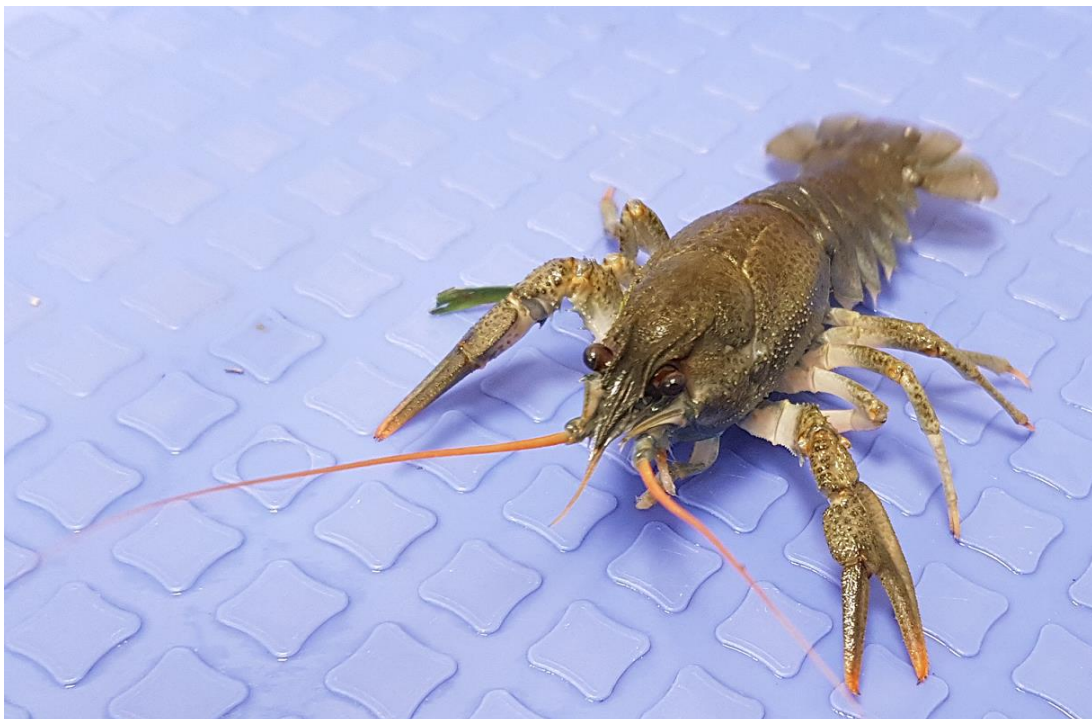


**Slika 1.** Signalni rak, *Pacifastacus leniusculus* (Foto: Sandra Hudina)



U slatkovodnim sustavima Hrvatske dosadašnjim su istraživanjima utvrđene četiri zavičajne vrste slatkovodnih deseteronožnih rakova, *Astacus astacus* (Linnaeus, 1758) – riječni rak, *Pontastacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) – uskoškari rak, *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803) – potočni rak i *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858) – bjelonogi rak (Maguire i Gottstein Matočec 2004), pri čemu tri od četiri navedene vrste dolaze u slivu rijeke Korane gdje je zabilježena prisutnost invazivne strane vrste signalnog raka.

U rijeci Korani signalni rak je u direktnom kontaktu sa zavičajnom vrstom uskoškarog raka. Uskoškari rak, *P. leptodactylus* (Slika 2) rasprostranjen je u središnjoj i istočnoj Hrvatskoj, u rijekama savskog i dravskog slijeva i jedina je zavičajna vrsta slatkovodnih deseteronožnih rakova koja širi areal u Hrvatskoj (Maguire i sur. 2011, 2018) i ostalim Europskim zemljama (Kouba i sur. 2014). Najrobusniji je među zavičajnim vrstama rakova zbog veće mogućnosti adaptacije u odnosu na ostale vrste zavičajnih rakova (Lucić i sur. 2012; Perdikaris i Georgiadis 2017). Zbog visokog fekunditeta, brzog životnog ciklusa i veličine tijela izrazito je kompetitivan te istiskuje ostale zavičajne vrste rakova iz njihovih staništa. Također istraživanja pokazuju kako su određene populacije uskoškarog raka razvile rezistenciju na račju kugu (Kokko et al. 2018). Unatoč tome što je uskoškari rak najrobusniji zavičajni slatkovodni deseteronožni rak i određene su populacije otporne na račju kugu, smatra se kako ga invazivne strane vrste istiskuju. Trenutno je uskoškari rak zavičajna vrsta koja je najviše pod negativnim utjecajem širenja invazivnih stranih vrsta deseteronožnih rakova u Hrvatskoj, signalnog raka u rijeci Korani i bodljibradog raka u Dravi (Dragičević i sur. 2020). Ovi su zaključci temeljeni na većoj agresivnosti invazivnih stranih vrsta rakova naspram uskoškarog raka, što je dokazano u laboratorijskim istraživanjima (Hudina i sur. 2016) i terenskim istraživanjima na rijeci Korani (Hudina i sur. 2017). Iako je uskoškari rak ugrožen antropogenim utjecajem i pojedinim invazivnim stranim vrstama rakova zbog gore navedenih karakteristika i širenja areala rasprostranjenosti, nije zaštićen na globalnoj i nacionalnoj razini (iako je on zavičajna vrsta kojoj trenutno najviše prijete istiskivanje od strane invazivnih stranih vrsta u Korani i Dravi; Dragičević i sur. 2020) dok je na IUCN – ovoj crvenoj listi proglašen kao najmanje zabrinjavajuća vrsta (Gherardi i Souty-Grosset 2017). U pojedinim zemljama Europe, uskoškari je rak zaštićen lokalnim zakonodavstvom, što nije slučaj i u Hrvatskoj, dok su ostale tri zavičajne vrste zaštićene Zakonom o zaštiti prirode (Narodne novine, 80/13) te Pravilnikom o strogo zaštićenim vrstama (Narodne novine, 144/13).



**Slika 2.** Uskoškari rak, *Ponastacus leptodactylus* (Foto: Anđela Miljanović)

### 1.5. Imunosni odgovor i njegova uloga u invazivnom uspjehu slatkovodnih deseteronožnih rakova

Unatoč velikom broju istraživanja vezanih uz biološke invazije i invazije slatkovodnih deseteronožnih rakova zadnjih desetljeća, i dalje nailazimo na nepoznanice kada je u pitanju razumijevanje čimbenika koji određuju uspjeh invazije ovih vrsta. Dosadašnja istraživanja pokazala su kako uspjeh invazije uvelike ovisi o biološkim karakteristikama same vrste, karakteristikama novog okoliša u koji su vrste introducirane i sličnostima novog okoliša s njihovim izvornim okolišem (Marchetti i sur. 2004). Također od velikog utjecaja na invazivni uspjeh je i interakcija između invazivne strane vrste i ostalih vrsta u staništu (Romanuk i sur. 2009). Invazivni uspjeh djelomično ovisi i o mikrobnim zajednicama, odnosno patogenim i nepatogenim mikroorganizmima s kojima je invazivna strana vrsta u kontaktu i koji izazivaju imunosni odgovor (White i Perkins 2012; Phillips i sur. 2010). Stoga je i imunosni odgovor od iznimne važnosti za

invazivni uspjeh jer omogućuje obranu od gore navedenih mikroorganizama i štetnih uvjeta u okolišu.

Imunosni odgovor kod rakova sastoji se od staničnih i humoralnih komponenata. Aktivacija proPO sustava najbitniji je dio humoralnog odgovora (Hauton 2012; Rowley 2016; Cerenius i Söderhäll 2018). Imunosni sustav rakova prepoznaje patogen, tj. antigen, zbog čega se hemociti nakupljaju i inkapsuliraju stranu česticu, dok sustav kaskadnih reakcija aktivacije enzima fenoloksidaze (PO) uzrokuje melanizaciju kapsule i izolaciju strane čestice ili smrt patogena (Rantala i Kortet 2004). PO enzim se u hemocitima nalazi u inaktivnom obliku, profenoloksidaza (proPO) i aktivira se kaskadnim reakcijama serinskih proteaza (Söderhäll 1982). ProPO kaskadu aktivira prisustvo lipopolisaharida stanične stijenke mikroorganizama. Aktivirani PO sudjeluje u pretvorbi fenolnih tvari u međuproizvode kinona, što u konačnici rezultira stvaranjem melanina (Jiravanichpaisal i Söderhäll 2006), vidljivo u obliku tamnih mrlja na karapaksu rakova (Söderhäll 1982). Stoga, kako bismo mjerili jačinu imunosnog odgovora potrebno je kvantificirati imunosne parametre koji su vezani uz proPO sustav, a to su: ukupni broj hemocita, snaga reakcije inkapsulacije i aktivnost enzima PO i ukupni proPO.

Imunosni odgovor odgovoran je za obranu od patogena, te je stoga od iznimne važnosti za organizme. Međutim invazivne strane vrste mogle bi imati koristi i od smanjenog ulaganja u imunosni odgovor. Naime, dospijevanjem u novi okoliš, invazivna strana vrsta može u potpunosti izgubiti svoje prirodne neprijatelje (predatore ili patogene; engl. *enemy release hypothesis*, Colautti i sur. 2004). Posljedično u uvjetima kada obrana od patogena nije neophodna, na novom staništu dolazi do smanjenog ulaganja u imunosni odgovor (Müller-Schärer i sur. 2004) i povećano ulaganje energije u rast i razmnožavanje, što u konačnici pospješuje rast populacija i ubrzava širenje invazivne strane vrste (Colautti i sur. 2004). Prijašnja istraživanja pokazala su kako sjevernoameričke vrste slatkovodnih desetonožnih rakova imaju značajno bolji imunosni odgovor na infekciju patogenom *A. astaci*, uzročnika račje kuge koja je kako je ranije napomenuto letalna za zavičajne vrste rakova. Sjevernoameričke vrste su koevoluirale s uzročnikom bolesti račje kuge (Unestam 1969) te pretpostavlja se kako je jedan od glavnih čimbenika koji doprinosi njihovoj otpornosti stalna prekomjerna ekspresija gena koji kodiraju za profenoloksidazu, dok je kod europskih vrsta potreban vanjski podražaj kako bi se ekspresija potaknula (Cerenius i sur.

2003). Zbog toga je za očekivati kako će invazivne strane vrste rakova poput signalnog raka koji je porijeklom iz Sjeverne Amerike imati bolji imunski odgovor od zavičajnih vrsta.

Unatoč važnoj ulozi imunskog odgovora kao čimbenika opće kondicije jedinki (engl. fitness) koji ujedno ima važnu ulogu u invazivnom uspjehu desetonožnih rakova, postoji mali broj eksperimentalnih radova koji proučavaju ovu tematiku. Također, postoji mali broj radova koji uspoređuju imunski odgovor zavičajnih i invazivnih stranih vrsta. Ovo istraživanje će po prvi puta ispitati razlike u imunskom odgovoru otporne zavičajne vrste (*P. letpodactylus*) i uspješne invazivne strane vrste (*P. leniusculus*) u prirodnom staništu gdje ove vrste dolaze u miješanim populacijama.

## 2. Hipoteza i cilj rada

Signalni rak, kao najuspješnija invazivna strana vrsta u Europi, predstavlja veliku prijetnju zavičajnim vrstama rakova, a posebice jedinoj nezaštićenoj zavičajnoj vrsti slatkovodnih deseteronožnih rakova u Hrvatskoj, uskoškarom raku. Usprkos velikoj robusnosti uskoškara i otpornosti određenih populacija na patogen koji uzrokuje bolest račju kugu, utvrđeno je kako signalni rak istiskuje uskoškara iz zajedničkih populacija u rijeci Korani. Kako bi što bolje upravljali populacijama invazivne strane vrste, od velike je važnosti razumjeti čimbenike koje utječu na njezin invazivni uspjeh, jedan od kojih je i imunosni odgovor. Stoga cilj ovog istraživanja bio je usporediti imunosni odgovor zavičajne i invazivne strane vrste slatkovodnih deseteronožnih rakova te parametre njihove kondicije. Pritom postavili smo hipotezu:

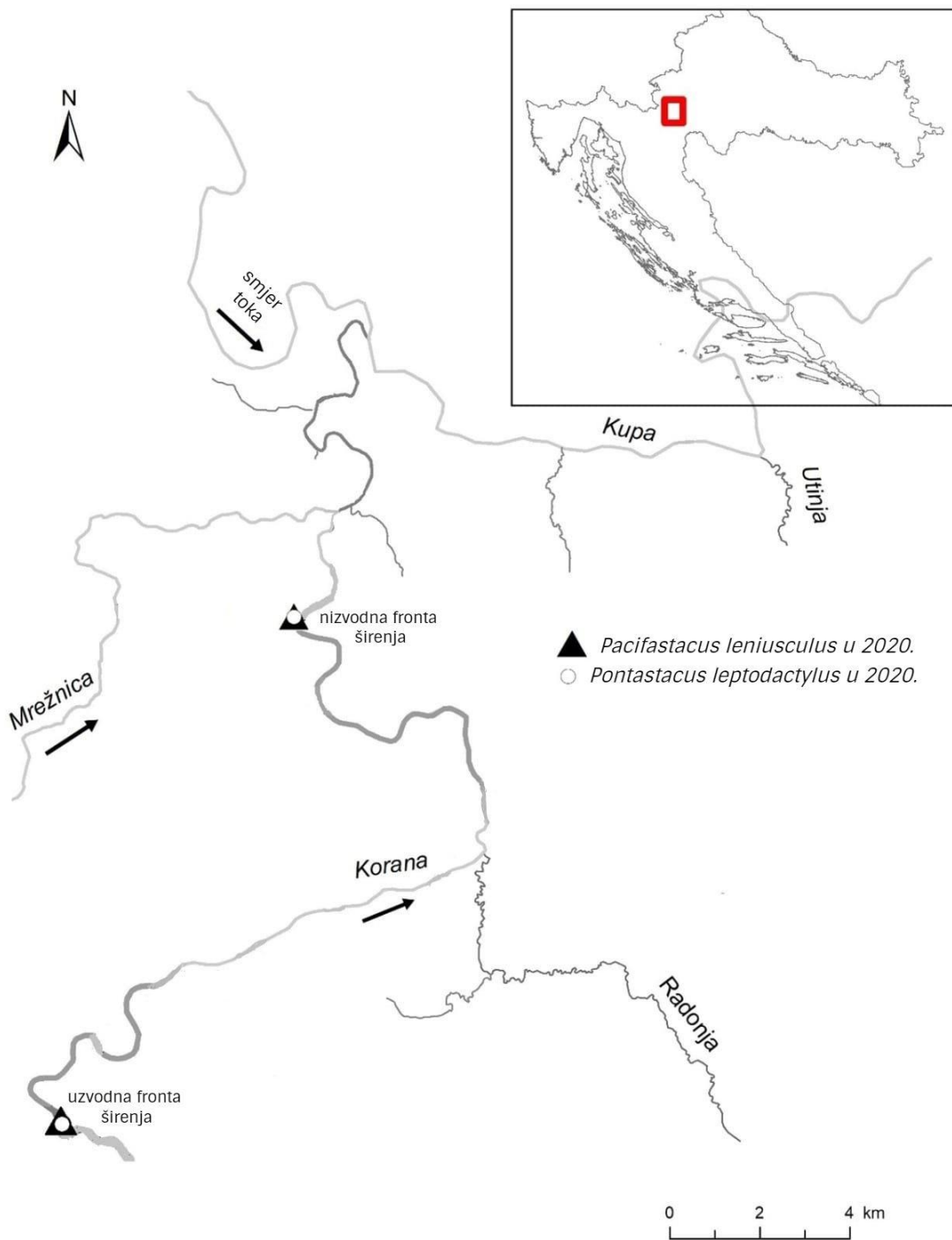
- S obzirom na stalnu aktivnost proPO sustava kod invazivnih stranih vrsta, imunosni odgovor tj. imunosni parametri (snaga reakcije inkapsulacije, ukupni broj hemocita i aktivnost enzima PO i ukupnog proPO) bit će veći kod invazivne strane vrste signalnog raka naspram zavičajne vrste uskoškara.

### 3. Materijali i metode

#### 3.1. Područje istraživanja

Rijeka Korana je krška rijeka središnjeg dijela Hrvatske ukupne dužine toka od 134 km, slivnog područja od 2297 km<sup>2</sup> i prosječnog protoka od 29 m<sup>3</sup>/s. Predstavlja najznačajniji pritek rijeke Kupe i pripada Crnomorskom slijevu. Hidrološki režim Korane ovisi o kišnom razdoblju, zbog čega su vodostaji povišeni u proljeće i jesen, a sniženi tijekom ljeta i zime (Gajić-Čapka i Zaninović 2004). Prevladavajuća klima je blaga kontinentalna i djelomično vlažna sa prosječnom godišnjom temperaturom od 11.1 °C i prosječnom količinom padalina 700 – 1100 mm godišnje. Izvorište rijeke Korane nalazi se u Nacionalnom parku Plitvička jezera, na samom kraju 16 krških jezera te teče sjeverno do porječja s rijekom Kupom u gradu Karlovcu. Kao i za ostale krške rijeke u Hrvatskoj, i za Koranu je karakteristična visoka stopa bioraznolikosti i velik broj endemičnih vrsta (Državni zavod za zaštitu prirode 2009). U slijevu Korane dolaze 3 od 4 zavičajne vrste slatkovodnih deseteronožnih rakova: riječni rak – *Astacus astacus* i potočni rak – *Austropotamobium torrentium* prisutni u gornjim tokovima Korane i njezinim pritokama i uskoškari rak – *Pontastacus leptodactylus* prisutan u donjim tokovima Korane.

Istraživanje je provedeno u donjem dijelu toka rijeke Korane (Slika 3). Prisutnost strane invazivne vrste signalnog raka u rijeci Korani je po prvi put zabilježena istraživanjem Hudine i sur. (2013). Danas, njegova rasprostranjenost u Korani zahvaća oko 30 kilometara donjeg toka rijeke (Dragičević i sur. 2020). Također, utvrđene su nove fronte širenja (Dragičević i sur. 2020), na kojima je zabilježena i prisutnost zavičajne vrste uskoškarog raka (Slika 3).



**Slika 3.** Postaje uzorkovanja signalnog i uskoškaroškog raka unutar nizvodne i uzvodne fronte širenja signalnog raka u rijeci Korani u 2020. godini.

## 3.2. Uzorkovanje jedinki

Jedinke signalnih i uskoškarih rakova uzorkovane su na tri postaje tijekom rujna 2020. godine u razdoblju pojačane aktivnosti rakova (Souty-Grosset i sur. 2006) (Slika 3). Dvije postaje, Ušće i Logorište su iznimno blizu te predstavljaju nizvodnu frontu širenja signalnog raka, dok postaja Donja Perjašica predstavlja uzvodnu frontu širenja, kako je ustanovljeno u istraživanju Dragičević i sur. (2020). Rakovi su lovljeni pomoću vrša za lov rakova, Li-Ni vrše (Westman i sur. 1978). Na svakoj postaji postavljeno je 20 vrša na potezu od 100 m (Maguire 2014) koje su ostavljene u vodotoku preko noći i izvađene sljedeće jutro. Sve ulovljene jedinke su određene do vrste, označene i prenesene na Zoologijski zavod Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu za potrebu provedbe laboratorijskih istraživanja. Nakon svakog terenskog istraživanja vrše su dezinficirane upotrebom Chlormaxa (Genera, Hrvatska) kako bi spriječili potencijalno širenje račje kuge među postajama.

## 3.3. Laboratorijske analize

### 3.3.1. Analiza imunosnog odgovora

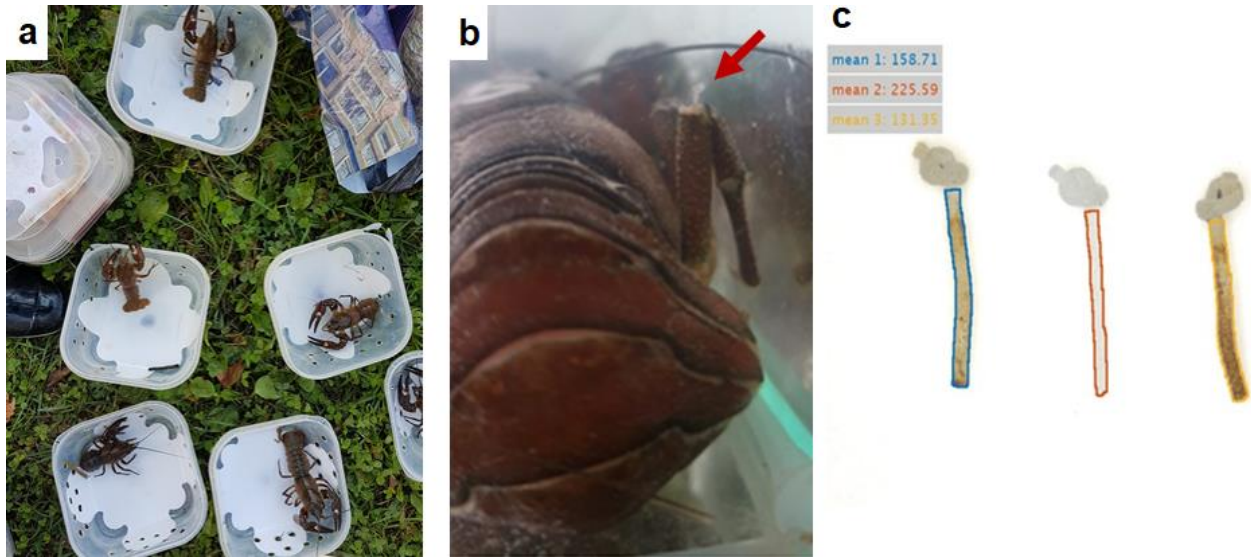
Imunosni odgovor ispitan je primjenom tri standardna pokazatelja imunosnog statusa u rakova: mjerenjem snage reakcije inkapsulacije (Gruber i sur. 2014a; 2014b); mjerenjem ukupnog broja hemocita (Battistella i sur. 1996; Johansson i sur. 2000; Pan i sur. 2008; Ding i sur. 2012; Becking i sur. 2015) i mjerenjem aktivnosti enzima fenoloksidaze (PO) i ukupna profenoloksidaza (proPO) (Sritunyalucksana and Söderhäll 2000; Tanner i sur. 2006; Pan i sur. 2008; Qin i sur. 2019).

#### Analiza snage reakcije inkapsulacije

Kao i kod ostalih beskralježnjaka, reakcija inkapsulacije je i kod rakova jedan od najvažnijih mehanizama obrane. Sintezom melanina sprječava se rast i širenje stranog tijela



(patogena) koji u konačnici bude ubijen (Cerenius i sur. 2003, Vazquez i sur. 2009). Stoga, na terenu neposredno nakon što su jedinke uhvaćene, proveden je imunosni izazov metodom umetanja sterilnog najlonskog implantata (Rantala i Kortet 2004; Rantala i Roff 2007) kako bi se kvantificirala snaga reakcije inkapsulacije (Gruber i sur. 2014b). Najlonski implantati su najprije pripremljeni tako da je najlonski monofilament (Jaxon Satori, Japan; nadalje u tekstu: implantat) promjera 0.22 mm izrezan na dijelove dugačke 4 mm, a svakom dijelu je na jednom kraju zavezan čvor (Gruber i sur. 2014b). Implantati su nakon toga pohranjeni u 96% alkoholu kako bi se očuvala sterilnost. Na terenu je svakom raku umetnut po jedan implantat u zglobovima 5. para nogu hodalica, tako što je napravljena punkcija pomoću škarica (Slika 4 b). Svaka jedinka je nakon toga smještena u perforiranu plastičnu posudicu (18 x 18 x 9 cm; promjer perforacija 0.7 cm; Slika 4 a), kako bi se omogućila cirkulacija vode. Posudice s rakovima su potopljene u rijeci u periodu od 48 h na istom mjestu gdje su rakovi ulovljeni. Nakon 48 h rakovi su preneseni u laboratorij gdje su im izvađeni implantati pomoću škarica i pohranjeni na -20 °C. Analiza snage reakcije inkapsulacije provedena je tako što su oba implantata iz svake jedinke raka postavljena na bijelu površinu pored sterilnog implantata (kontrola) i fotografirana sa obje strane pomoću digitalne kamere povezane sa svjetlosnim mikroskopom (Stemi 305, Zeiss, Njemačka). Nakon toga, korišten je program za obradu digitalnih fotografija (ImageJ, verzija 1.53f, <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>) kako bi se odredile vrijednosti sivih nijansi reflektirajuće svjetlosti (mjera količine nastalog pigmenta melanina tijekom reakcije inkapsulacije; Slika 4 c). Snaga reakcije inkapsulacije dobivena je tako što je oduzeta srednja vrijednost sivih nijansi dvaju implantata od vrijednosti sivih nijansi kontrolnog implantata i preračunata srednja vrijednost dvaju podataka. Zatim je snaga reakcije inkapsulacije za svaku jedinku preračunata tako što je napravljena srednja vrijednost sivih nijansi za oba umetnuta implantata (Gruber i sur. 2014b). Srednju vrijednost oba implantata smo koristili u statističkoj obradi podataka.



**Slika 4.** a – Rakovi u perforiranim posudama, b – rak s implantatom i c – fotografirani implantati i određivanje vrijednosti sivih nijansi reflektirajuće svjetlosti (Foto: a – Anđela Miljanović; b – Paula Dragičević; c – Lucija Abramović i Anita Tarandek).

#### Uzorkovanje hemolimfe

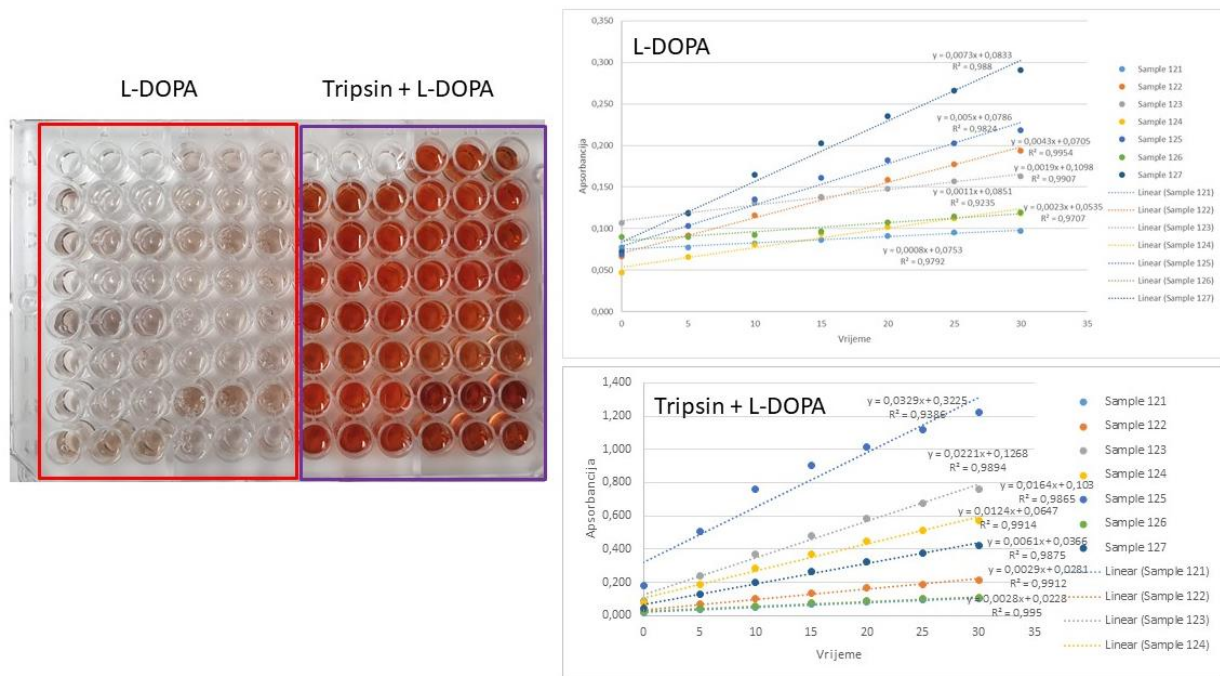
Nakon vađenja implantata rakovima je ustanovljen spol, izmjerena masa, te ukupna dužina i dužina karapaksa i uzeti uzorci hemolimfe. Sterilnom iglom izvađeno je 500  $\mu\text{L}$  hemolimfe iz nogu hodalice, od čega je: i) 100  $\mu\text{L}$  razrijeđeno u 400  $\mu\text{L}$  1 % formalina u svrhu određivanja ukupnog broja hemocita; ii) 400  $\mu\text{L}$  razrijeđeno u 800  $\mu\text{L}$  račje fiziološke otopine (CFS: 0,2 M NaCl, 5,4 mM KCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 2,6 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 6,8; Johansson i Söderhäll 1985) za analizu aktivnosti fenoloksidaze, ukupne profenoloksidaze i koncentracije proteina u hemolimfi. Uzorci hemolife za analizu PO i proPO su odmah nakon uzorkovanja centrifugirani na 10 000 g tokom 10 min na 4 °C kako bi spriječili koagulaciju. Nakon toga stavljeni su na led i sonificirani 10 s, s postupnim povećanjem snage na 50 % (Sonoplus HD 2070, Bandelin, Njemačka) kako bi se hemociti u potpunosti lizirali i ispustili spremljeni proPO u razrijeđenu plazmu. Za kraj uzorci su centrifugirani na 15 000 g tokom 25 min na 4 °C kako bi se ostatci stanica istaložili. Supernatant je nakon toga pohranjen na -80 °C. Nakon uzimanja uzoraka hemolimfe iz rakova, jedinke su žrtvovane i izolirano je tkivo hepatopankreasa i istom je izmjerena masa za analizu parametara kondicijskog statusa rakova.

### Određivanje ukupnog broja hemocita

Uzorci hemolimfe prikupljeni za brojanje ukupnog broja hemocita su pohranjeni na 4 °C kako bi se hemociti fiksirali. Ukupan broj je nakon toga određen korištenjem Bürker-Türkove komorice i Zeiss Standard RA Light Microscope (Giulianini i sur. 2007; Malev i sur. 2010). Za svaku jedinku određena je brojnost hijalinocita i granulocita i ukupan broj hemocita u mililitru hemolimfe uzimajući u obzir razrijeđenje hemolimfe tijekom uzorkovanja. Podatak o ukupnom broju hemocita u mililitru hemolimfe je korišten za statističku obradu podataka.

### Aktivnosti enzima fenoloksidaze (PO) i ukupne profenoloksidaze (proPO) te koncentracija proteina u hemolimfi

Uzorcima hemolimfe za analizu aktivnosti fenoloksidaze i ukupne profenoloksidaze mjerena je koncentracija spektrofotometrijski prema Gollas-Galván i sur. (1999). Kako bi mjerili aktivnost PO, pomiješano je 50 µL supstrata L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA; 3 mg/mL, otopljen u Milli-Q vodi) i 50 µL svakog uzorka hemolimfe na mikroploči u triplikatima. Apsorbancija je mjerena na 490 nm tokom 30 min. Preračunat je prosjek vrijednosti apsorbancije triplikata te su iz prosječnih vrijednosti triplikata svakog uzorka određeni nagibi pravca koji predstavljaju promjenu u apsorbanciji u minuti. Dobivena je aktivnost PO enzima u minuti. Kako bismo kvantificirali proenzim proPO, najprije je bilo potrebno pretvoriti čitavi proPO u aktivnu formu, enzim PO. Stoga je provedena još jedna spektrofotometrijska analiza, gdje je 50 µL svakog uzorka hemolimfe inkubirano sa 50 µL tripsina (djeluje kao aktivator; 1 mg/mL, otopljen u Milli-Q vodi) na mikroploči tokom 3 min na sobnoj temperaturi (Slika 5). Nakon toga je na mikroploču dodano 50 µL supstrata L-DOPA te je mjerena apsorbancija na 490 nm tokom 25 min. Preračunat je prosjek vrijednosti apsorbancije triplikata te su iz prosječnih vrijednosti triplikata svakog uzorka određeni nagibi pravca koji predstavljaju promjenu u apsorbanciji u minuti (Slika 5). Dobivena je aktivnost proPO enzima u minuti. Količina ukupnog proPO mjerena je kao količina proPO nakon reakcije sa tripsinom minus PO aktivnost prije tretiranja tripsinom (Hernández-López i sur. 1996; Gollas-Galván i sur. 1999; Hernández-López i sur. 2003).



**Slika 5.** Primjer mjerenja aktivnosti fenoloksidaze i profenoloksidaze u hemolimfi rakova i izračuna  $\Delta A/\text{min}$ . Svaka točka na grafu predstavlja prosječnu vrijednost apsorbancije u triplikatima uzorka kroz vrijeme (mjerenje svakih 5 minuta). Nagib pravca predstavlja  $\Delta A/\text{min}$ .

Kako bismo standardizirali aktivnost enzima po miligramu proteina (Moreno-García i sur. 2013), mjerena je ukupna koncentracija proteina u hemolimfi prema Bradford (1976). Reakcija otopljenih proteina s reagensom Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) (Serva, Feinbiochemia, Njemačka) vodi do vezanja anionske boje za  $\text{NH}_3$  skupine proteina, što je praćeno promjenom boje reagensa i pojavom apsorpcijskog maksimuma pri 595 nm. Kvantitativno određivanje proteina temeljeno na ovoj reakciji moguće je zbog linearne ovisnosti apsorbancije o masi proteina u rastućem nizu standardnih otopina (albumin iz goveđeg seruma; BSA-*bovine serum albumine*) (Serva, Feinbiochemia, Njemačka) kao i u uzorcima, nakon primjene CBB reagensa (0,01 % Coomassie Brilliant Blue R-250; 4,7 % etanol; 8,5 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). Iz osnovne otopine BSA (5 mg/mL) pripremljen je rastući niz od sedam standardnih otopina BSA u rasponu od 0,125 – 2,0 mg/mL, razrijeđenih u CFS puferu. Volumen od 5  $\mu\text{L}$  pripremljenog standarda/uzorka dodan je triplikatima u jažice na mikroploči, a zatim je u sve preostale jažice dodano po 250  $\mu\text{L}$  CBB reagensa. Nakon dodavanja reagensa pločica je protresena tijekom 5 sekundi kako bi se uzorak i reagens pomiješali,

a zatim je inkubirana tokom 5 minuta na sobnoj temperaturi, te je ponovno protresena i inkubirana 2 minute. Nakon toga izmjerena je apsorbancija pri 595 nm. Pomoću apsorbancije i koncentracije uzoraka dobivena je jednadžba pravca iz koje je preračunata ukupna koncentracija proteina u hemolimfi.

Aktivnosti enzima PO i proPO izražene su kao promjene u apsorbanciji pri 490 nm po minuti i miligramu proteina ( $\Delta A_{490}/\text{min}/\text{mg}$  proteina).

### 3.3.2. Parametri kondicijskog statusa

Uz imunosni odgovor mjerena su dva parametra kondicijskog statusa rakova koji se često koriste kako bismo utvrdili zdravlje i kondiciju jedinki (Streissl i Hoödl 2002; Peig i Green 2010; Lucić i sur. 2012; Rebrina i sur. 2015).

1. Fulton-ov kondicijski faktor prema jednadžbi:

$$\text{FCF} = (W / \text{TL}^3) \times 100$$

gdje je FCF Fulton-ov kondicijski faktor ( $\text{g}/\text{mm}^3$ ), W masa raka (g), a TL ukupna duljina raka (mm) mjerena od rostruma do vrha telzona. Ovaj faktor se koristi kao pokazatelj kondicije jedinke (Ricker 1975);

2. Hepatosomatski indeks prema jednadžbi:

$$\text{HSI} = \text{HW} / \text{BW}$$

gdje je HSI hepatosomatski indeks, HW masa hepatopankreasa raka (g), a BW masa raka (g). Ovaj indeks je pokazatelj energetskog statusa jedinke (Rodríguez-González i sur. 2006).

Podaci o parametrima kondicijskog statusa rakova su korišteni u statističkoj obradi podataka.

### 3.4. Statistička obrada podataka

Statističke obrade podataka izvedene su u programu Statistica (TIBCO Software Inc., SAD). Izmjereni parametri imunosnog odgovora i parametri kondicijskog statusa rakova uspoređeni su između jedinki signalnog i jedinki uskoškarog raka. Zbog pravilnog odabira metoda analize podataka, testirano je odgovara li raspodjela podataka normalnoj raspodjeli. U tu je svrhu proveden Shapiro-Wilk W test normalnosti raspodjele, zbog veće pouzdanosti u odnosu na ostale testove normalnosti (Shapiro i sur. 1968). Ovisno o tome je li raspodjela normalna ili nije, koriste se parametrijske ili neparametrijske metode analize podataka. Unatoč normalnoj raspodjeli dijela podataka, zbog malog broja jedinki u pojedinim analizama (razdvajanje po spolovima), podaci su analizirani korištenjem neparametrijskih metoda, odnosno korištenjem Mann-Whitney U testa. U svim statističkim testovima korištena je razina značajnosti od 5 %,  $p < 0,05$ .

## 4. Rezultati

### 4.1. Deskriptivna statistička analiza

Tijekom provedenog istraživanja ulovljena je ukupno 31 jedinka. Od toga 13 jedinki uskoškara raka (8 mužjaka i 5 ženki) i 18 jedinki signalnog raka (10 mužjaka i 8 ženki) (Tablica 1).

**Tablica 1.** Broj ulovljenih mužjaka i ženki uskoškara raka (*P. leptodactylus*) i signalnog raka (*P. leniusculus*) po postajama.

vrsta	nizvodna fronta		uzvodna fronta	
	mužjaci	ženke	mužjaci	ženke
<i>P. leptodactylus</i>	8	2	0	3
<i>P. leniusculus</i>	8	5	2	3

Rezultati deskriptivne statističke analize parametara kondicijskog statusa rakova i parametara imunskog odgovora prikazani su u Tablici 2.

**Tablica 2.** Rezultati deskriptivne statističke analize (srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija) parametara kondicijskog statusa i parametara imunosnog odgovora uskoškarog raka (*P. leptodactylus*) i signalnog raka (*P. leniusculus*).

parametar	<i>P. leptodactylus</i>		<i>P. leniusculus</i>	
	mužjaci	ženke	mužjaci	ženke
težina (g)	40,3875 $\pm$ 11,7932	28,5560 $\pm$ 9,4420	37,5740 $\pm$ 15,1887	30,9325 $\pm$ 7,5710
ukupna dužina (mm)	107,9000 $\pm$ 9,2221	102,7060 $\pm$ 11,1254	99,6180 $\pm$ 12,1854	99,5100 $\pm$ 9,7571
hepatosomatski indeks	0,0571 $\pm$ 0,0115	0,0592 $\pm$ 0,0113	0,0448 $\pm$ 0,0098	0,0471 $\pm$ 0,0119
Fulton-ov kondicijski faktor (g/mm <sup>3</sup> )	0,0031 $\pm$ 0,0002	0,0025 $\pm$ 0,0001	0,0036 $\pm$ 0,0004	0,0031 $\pm$ 0,0002
snaga reakcije inkapsulacije	46,8767 $\pm$ 8,0154	36,1751 $\pm$ 9,2623	57,6708 $\pm$ 10,6263	51,1079 $\pm$ 8,2191
ukupan broj hemocita	929 921,8750 $\pm$ 793 704,4023	1 119 375,000 $\pm$ 771 449,1487	837 500,0000 $\pm$ 358 251,5653	691 406,2500 $\pm$ 501 311,7559
aktivnost enzima PO ( $\Delta$ A490/min/mg)	0,0047 $\pm$ 0,0044	0,0040 $\pm$ 0,0045	0,0024 $\pm$ 0,0015	0,0016 $\pm$ 0,0013
aktivnost ukupne proPO ( $\Delta$ A490/min/mg)	0,0756 $\pm$ 0,0644	0,1517 $\pm$ 0,0431	0,1988 $\pm$ 0,1438	0,1008 $\pm$ 0,0700



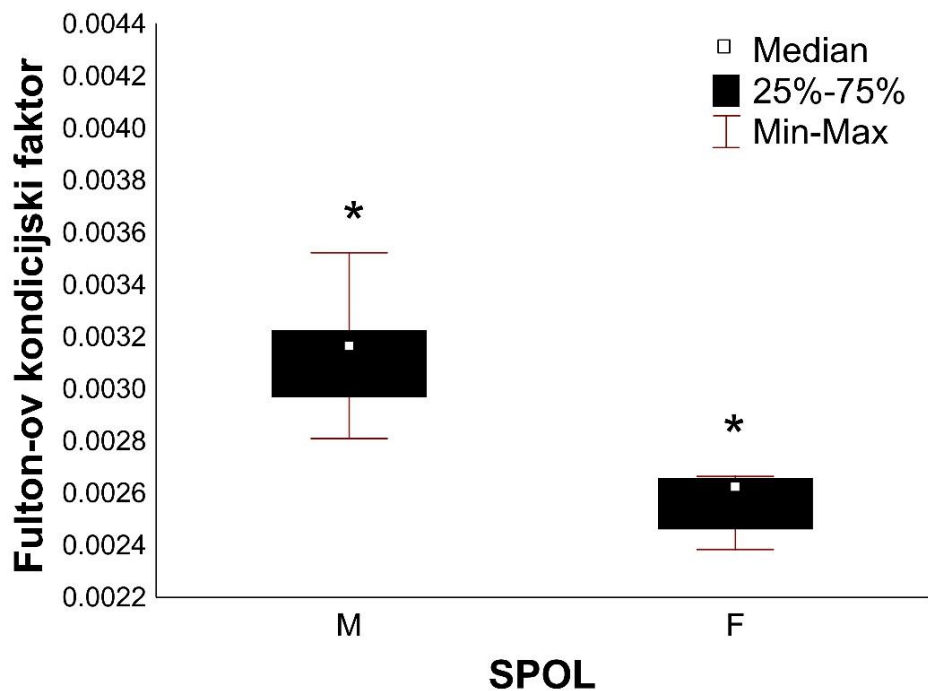
## 4.2. Korelacija između veličine jedinki i parametara kondicijskog statusa i imunosnog odgovora pojedine vrste

Analize su pokazale kako ne postoji statistički značajna korelacija između veličine (ukupna dužina) jedinki uskoškarg raka niti signalnog raka i parametara kondicijskog statusa i imunosnog odgovora jedinki (ukupan broj hemocita, snaga reakcije inkapsulacije, aktivnost enzima PO i ukupni proPO).

## 4.3. Korelacija između spolova i parametara kondicijskog statusa i imunosnog odgovora pojedine vrste

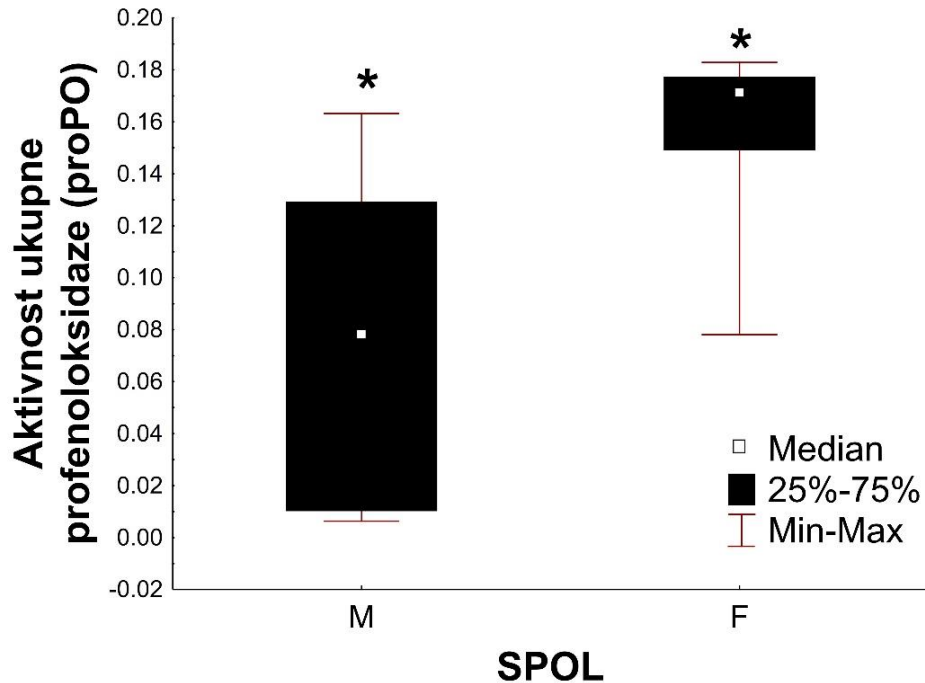
### 4.3.1. Zavičajna vrsta uskoškari rak

Analize su pokazale statistički značajnu razliku u Fulton-ovom kondicijskom faktoru između mužjaka i ženki uskoškarg raka ( $U = 0,0000$ ;  $p = 0,0043$ ;  $N_M = 8$ ;  $N_F = 5$ ) (Slika 6), pri čemu su mužjaci imali statistički značajno veće vrijednosti ovog parametra od ženki.



**Slika 6.** Razlike u kondicijskom indeksu (Fulton-ov kondicijski faktor) između spolova kod zavičajne vrste uskoškarog raka ispitane Mann–Whitney U testom. M – mušjaci, F – ženke. Statistički značajne razlike označene su zvjezdicom (\*).

Također, statistički značajna razlika zabilježena je i u aktivnosti ukupne profenoloksidaze (proPO) između mušjaka i ženki uskoškarog raka ( $U = 6,0000$ ;  $p = 0,0481$ ;  $N_M = 8$ ;  $N_F = 5$ ) (Slika 7), pri čemu su ženke imale statistički značajno veću aktivnost ovog proenzima od mušjaka.

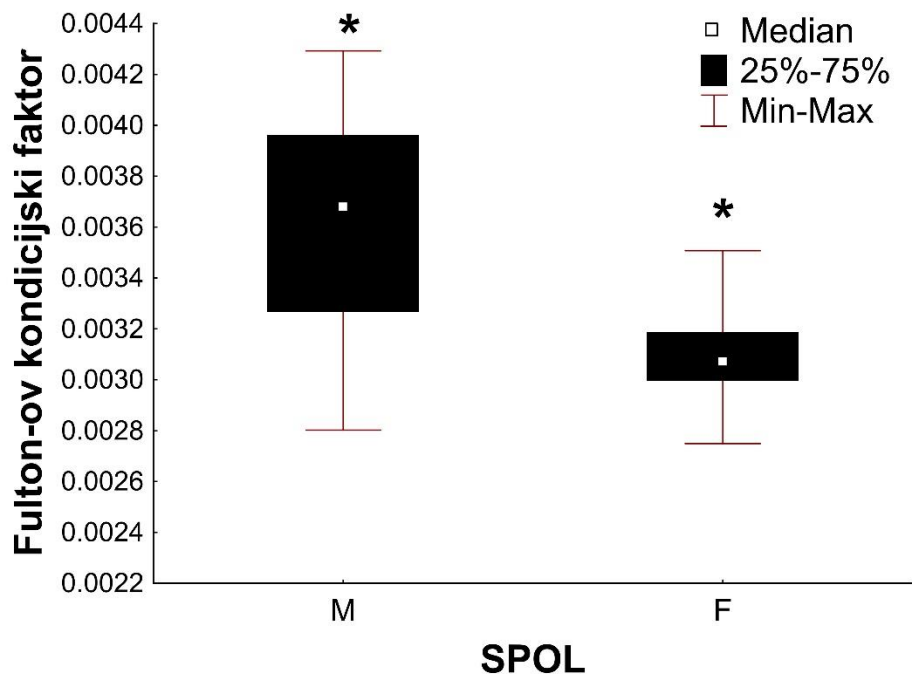


**Slika 7.** Razlike u aktivnosti ukupne profenoloksidaze (proPO), između spolova kod zavičajne vrste uskoškarog raka ispitanе Mann–Whitney U testom. M – mužjaci, F – ženke. Statistički značajne razlike označene su zvjezdicom (\*).

Ostali mjerени parametri kondicije (hepatosomatski indeks) i parametri imunskog odgovora (ukupan broj hemocita, snaga reakcije inkapsulacije i aktivnost enzima PO) nisu se statistički značajno razlikovali između spolova.

#### 4.3.2. Invazivna strana vrsta signalni rak

Kao i kod zavičajne vrste, kod invazivne strane vrste signalnog raka zabilježena je statistički značajna razlika u Fulton-ovom kondicijskom faktoru između mužjaka i ženki ( $U = 12,0000$ ;  $p = 0,0146$ ;  $N_M = 10$ ;  $N_F = 8$ ) (Slika 8), pri čemu su mužjaci imali značajno veće vrijednosti ovog indeksa od ženki.



**Slika 8.** Razlike u kondicijskom indeksu (Fulton-ov kondicijski faktor) između spolova kod invazivne strane vrste signalnog raka ispitane Mann–Whitney U testom. M – mušjaci, F – ženke. Statistički značajne razlike označene su zvjezdicom (\*).

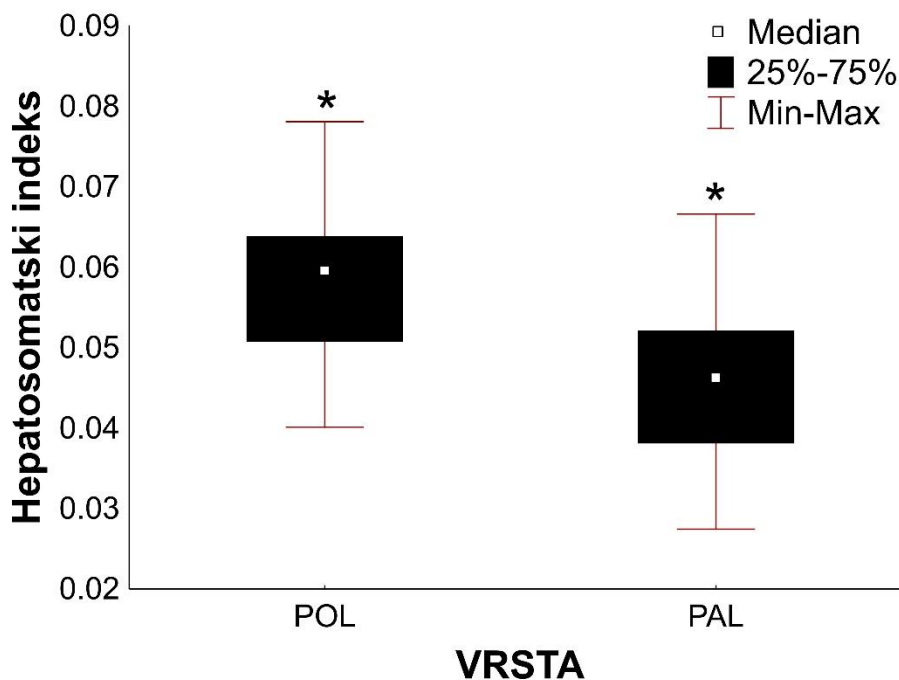
Ostali mjereni parametri kondicije (hepatosomatski indeks), te niti jedan mjereni parametar imunskog odgovora nisu se statistički značajno razlikovali između spolova.

#### 4.4. Korelacija između vrsta i parametara kondicijskog statusa i imunskog odgovora

##### 4.4.1. Parametri kondicije

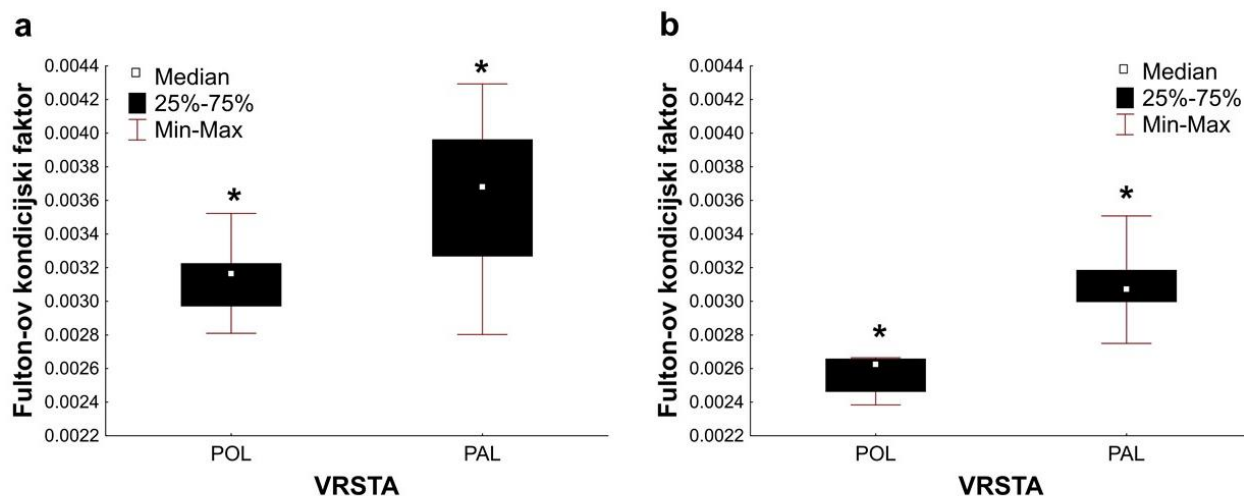
Hepatosomatski indeks nije pokazivao razliku među spolovima, stoga su mušjaci i ženke analizirani zajedno te je gledana razlika između vrsta. Analize su pokazale statistički značajnu razliku hepatosomatskog indeksa između uskoškarog i signalnog raka ( $U = 52,0000$ ;  $p = 0,0098$ ;

$N_{POL} = 13$ ;  $N_{PAL} = 18$ ) (Slika 9), pri čemu je zavičajna vrsta uskoškari rak imao statistički značajno veće vrijednosti ovog parametra od invazivne strane vrste signalnog raka.



**Slika 9.** Razlike u kondicijskom indeksu (hepatosomatski indeks) između zavičajne vrste uskoškariog raka i invazivne strane vrste signalnog raka ispitane Mann–Whitney U testom. POL – uskoškari rak, PAL – signalni rak. Statistički značajne razlike označene su zvjezdicom (\*).

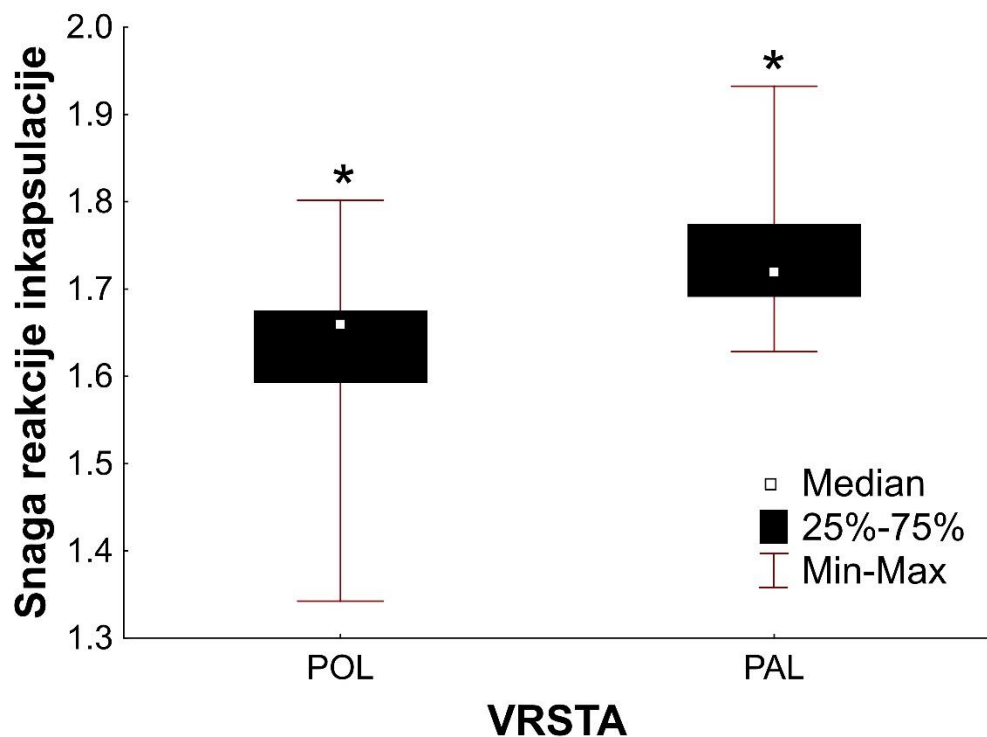
S obzirom da je Fulton-ov kondicijski faktor kod obje vrste pokazivao statistički značajnu razliku između spolova, u ovom su slučaju usporedbe između vrsta napravljene odvojeno po spolovima. Analize su pokazale statistički značajnu razliku u Fulton-ovom kondicijskom faktoru između mužjaka ( $U = 14,0000$ ;  $p = 0,0235$ ;  $N_{POL} = 8$ ;  $N_{PAL} = 10$ ) i ženki ( $U = 0,0000$ ;  $p = 0,0043$ ;  $N_{POL} = 5$ ;  $N_{PAL} = 8$ ) uskoškariog i signalnog raka (Slika 10 a i b), pri čemu su i mužjaci i ženke invazivne strane vrste signalnog raka imali statistički značajno veće vrijednosti ovog parametra od mužjaka i ženki zavičajne vrste uskoškariog raka.



**Slika 10.** a – Razlike u kondicijskom indeksu (Fulton-ov kondicijski faktor) između mužjaka zavičajne vrste uskoškarg raka i invazivne strane vrste signalnog raka ispitane Mann–Whitney U testom, b – Razlike u kondicijskom indeksu (Fulton-ov kondicijski faktor) između ženki zavičajne vrste uskoškarg raka i invazivne strane vrste signalnog raka ispitane Mann–Whitney U testom. POL – uskoškari rak, PAL – signalni rak. Statistički značajne razlike označene su zvjezdicom (\*)

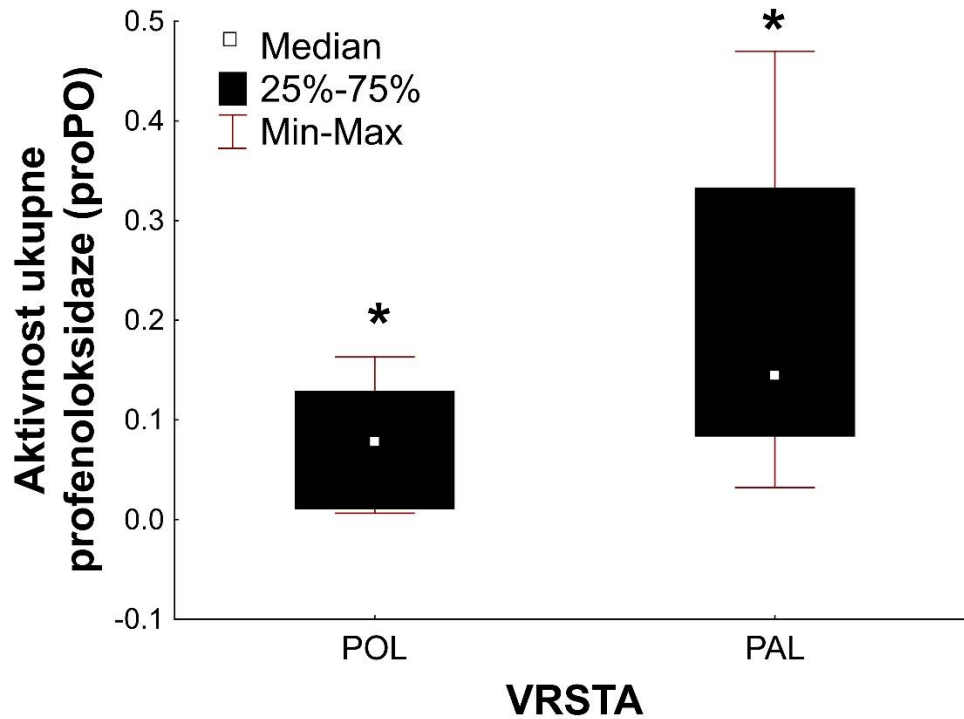
#### 4.4.2. Parametri imunskog odgovora

Snaga reakcije inkapsulacije nije pokazivala razliku među spolovima, stoga su mužjaci i ženke analizirani zajedno te je gledana razlika između vrsta. Analize su pokazale statistički značajnu razliku snage reakcije inkapsulacije između uskoškarg i signalnog raka ( $U = 35,0000$ ;  $p = 0,0011$ ;  $N_{POL} = 13$ ;  $N_{PAL} = 18$ ) (Slika 11), pri čemu je invazivna strana vrsta signalni rak imao statistički značajno veće vrijednosti ovog parametra od zavičajne vrste uskoškarg raka.



**Slika 11.** Razlike u snazi reakcije inkapsulacije između zavičajne vrste uskoškariog raka i invazivne strane vrste signalnog raka ispitane Mann–Whitney U testom. POL – uskoškari rak, PAL – signalni rak. Statistički značajne razlike označene su zvjezdicom (\*).

Analize su pokazale statistički značajnu razliku u aktivnosti ukupne profenoloksidaze (proPO) između mužjaka uskoškariog i signalnog raka ( $U = 17,0000$ ;  $p = 0,0456$ ;  $N_{POL} = 8$ ;  $N_{PAL} = 10$ ) (Slika 12), pri čemu mužjaci signalnog raka imaju znatno veće vrijednosti od mužjaka uskoškariog raka.



**Slika 12.** Razlike u aktivnosti ukupne profenoloksidaze (proPO), između mužjaka zavičajne i invazivne strane vrste ispitane Mann–Whitney U testom. POL – uskoškari rak, PAL – signalni rak. Statistički značajne razlike označene su zvjezdicom (\*).

Za razliku od mužjaka, analize su pokazale kako ne postoji statistički značajna razlika u aktivnosti ukupne profenoloksidaze (proPO) između ženki uskoškarog i signalnog raka.

Ostali mjereni parametri imunološkog odgovora (ukupan broj hemocita i aktivnost enzima PO) nisu se statistički značajno razlikovali između vrsta.



## 5. Rasprava

Invazivni uspjeh vrsta ovisi o više čimbenika među koje ubrajamo i imunosni odgovor koji omogućuje obranu od raznih mikroorganizama, posebice patogenih (Philips i sur. 2010; White i Perkins 2012). Dosadašnja istraživanja pokazuju da sjevernoameričke vrste slatkovodnih deseteronožnih rakova imaju bolji imunosni odgovor na infekciju patogenom *A. astaci*, uzročnikom račje kuge, za razliku od europskih zavičajnih vrsta kod kojih isti patogen dovodi do masovnih izumiranja populacija (Holdich i sur. 2009). Pretpostavka je da su sjevernoameričke vrste koevoluirale sa ovim patogenom koji je u njihovim prirodnim arealima rasprostranjenja sveprisutan, što je rezultiralo boljim imunosnim odgovorom, odnosno stalnom ekspresijom gena koji kodiraju za enzime koji sudjeluju u imunosnoj obrani (Cerenius i sur. 2003). Pokazano je kako se isti geni ekspimiraju kod europskih vrsta tek nakon određenog vanjskog podržaja, što čini imunosni odgovor europskih zavičajnih vrsta slabijim od sjevernoameričkih invazivnih stranih vrsta (Cerenius i sur. 2003). S obzirom da je imunosni odgovor rakova nespecifičan (Vazquez i sur. 2009), onda bi pojačana ekspresija gena morala davati općenito bolju obranu organizma i od ostalih patogena. Iako je imunosni odgovor važan pokazatelj opće kondicije jedinki, ne postoji dostatan broj eksperimentalnih radova koji proučava navedenu temu. Također, proveden je mali broj istraživanja koji uspoređuju imunološki odgovor invazivnih stranih i zavičajnih vrsta (Rigaud i Moret 2003; Céspedes i sur. 2019), što bi moglo dati uvid u mogući dugoročni ishod potencijalne zaraze u miješanim populacijama zavičajnih i stranih invazivnih vrsta u prirodnim populacijama, kao što je slučaj u rijeci Korani.

Istraživanje je provedeno na novo utvrđenim frontama širenja signalnog raka (Dragičević i sur. 2020) gdje je prisutna miješana populacija uskoškarog i signalnog raka. Provedenim istraživanjem zabilježene su značajne razlike između spolova mjerenjem kondicijskih parametara i parametara imunosnog odgovora. Naime, mužjaci uskoškarog raka i signalnog raka imaju statistički značajno veće vrijednosti Fulton-ovog kondicijskog parametra za razliku od ženki obje vrsta, što je posljedica spolnog dimorfizma. Spolni dimorfizam rakova očituje se između ostalog u većem tijelu i klijestima mužjaka u usporedbi sa ženkama, a koja služe u borbama sa ostalim mužjacima i za pridržavanje ženki prilikom parenja (Galeotti i sur. 2006). Stoga za očekivati je kako će vrijednosti Fulton-ovog kondicijskog faktora, koji predstavlja omjer mase i ukupne dužine

jedinke, biti veće kod mužjaka u odnosu na ženke. Nadalje, zabilježene su statistički veće vrijednosti u ukupnoj profenoloksidazi kod ženki uskoškarog raka u usporedbi sa mužjacima uskoškarog raka, dok u slučaju signalnog raka nije zabilježena statistički značajna razlika po spolovima. Jedinke su uzorkovane u periodu kada se pripremaju za parenje. U ovom periodu rakovi, a posebno ženke skladište velike količine energije u hepatopankreasu zbog nadolazećeg perioda inkubacije jaja (Fernandes i sur. 1994) koji je energetska zahtjevan, pa su ženke u ovom periodu u najboljoj kondiciji. Stoga pretpostavljamo da bi i njihov imunski odgovor u ovom periodu trebao biti bolji, što potencijalno objašnjava zašto ženke uskoškarog raka imaju veće vrijednosti ukupne profenoloksidaze od mužjaka. Također istraživanje je pokazalo da su u ovom periodu ženke uskoškarog raka imale veći hepatosomatski indeks od ženki signalnog raka, što ukazuje da ove dvije vrste nisu u istim fazama pripreme za parenje te u konačnici potencijalno objašnjava i nedostatak razlika u profenoloksidazi između mužjaka i ženki signalnog raka.

Glavni cilj ovog istraživanja bio je usporediti imunski odgovor između zavičajne i invazivne strane vrste slatkovodnih deseteronožnih rakova koristeći veći broj parametara imunskog odgovora. S obzirom da je imunski odgovor važna komponenta kondicije jedinke mjerili smo i kondicijske parametre. Zabilježene su statistički značajno veće vrijednosti hepatosomatskog indeksa uskoškarog raka u usporedbi sa signalnim rakom što je vjerojatno rezultat morfoloških razlika između vrsta, odnosno većih kliješta signalnog raka u odnosu na uskoškarog raka (Harlioğlu 1996). S druge strane zabilježene su statistički značajno veće vrijednosti Fulton-ovog kondicijskog parametra i kod mužjaka i kod ženki signalnog raka za razliku od mužjaka i ženki uskoškarog raka. Razlika u kondiciji je vjerojatno rezultat morfoloških razlika između vrsta, stoga samo kondicijski parametri nisu najbolji za uspoređivanje vrsta. S druge strane očekujemo da su imunski parametri pouzdaniji za uspoređivanje vrsta jer ne ovise o morfološkim razlikama. Također obje vrste imaju sličan godišnji ciklus. Vrijeme parenja ovisi o hormonima koji su regulirani temperaturom i fotoperiodom, kod signalnog raka obično u listopadu, a kod uskoškarog između listopada i studenog (Holdich 2002). Nadalje, izlijeganje jaja je kod signalnog raka u periodu od ožujka do srpnja, dok je kod uskoškarog raka nešto kraće, od svibnja do lipnja (Holdich 2002).

Ukupna profenoloksidaza predstavlja ukupni imunski potencijal koji se aktivira prisustvom lipopolisaharida stanične stijenke stranih tijela, tako što serinske proteaze pretvaraju

zimogen profenoloksidazu, koji se nalazi u hemocitima, u aktivni oblik enzima fenoloksidaza (Söderhäll 1982). Kaskadom reakcija u konačnici dolazi do sinteze melanina, krajnjeg koraka u kaskadi proPO sustava. Inkapsulacija je bitan mehanizam obrane od patogena koji dovodi do nakupljanja hemocita i stvaranja kapsule oko stranog tijela, odnosno izolira se patogen melaninom (Vazquez i sur. 2009). S obzirom da je proPO sustav kod sjevernoameričkih vrsta stalno aktivan, za razliku od europske vrste uskoškarog raka gdje je potreban vanjski podražaj kako bi se kaskadni sustav pokrenuo (Cerenius i sur. 2003), očekivali smo kako će signalni rak imati veće vrijednosti snage reakcije inkapsulacije, ukupnog broja hemocita i aktivnosti PO i proPO, za razliku od uskoškarog raka. Istraživanjem su zabilježene statistički značajno veće vrijednosti snage reakcije inkapsulacije kod signalnog raka u usporedbi sa uskoškarim rakom i statistički značajno veće vrijednosti aktivnosti ukupne profenoloksidaze kod mužjaka signalnog raka za razliku od mužjaka uskoškarog raka. Statistički značajne razlike nisu primijećene između vrsta u ukupnom broju hemocita niti u aktivnosti fenoloksidaze, što je suprotno od naših očekivanja. Implantat predstavlja patogena kojeg rakovi onda izoliraju tako što agregiraju hemocite u kojima se nalazi profenoloksidaza koja se aktivira u fenoloksidazu, stoga smo očekivali razlike i u ukupnom broju hemocita i aktivnosti fenoloksidaze. Istraživanja koja objedinjuju sve imunosne parametre koji utječu na imunosni odgovor je malo (Gruber i sur. 2014a) stoga ovo istraživanje uvelike doprinosi holističkom proučavanju imunosnog odgovora. Ustanovljena je veća snaga reakcije inkapsulacije kod signalnog raka i veća aktivnost ukupne profenoloksidaze kod mužjaka signalnog raka što potvrđuje hipotezu da je imunosni odgovor invazivne strane vrste signalnog raka bolji (barem u nekim segmentima) od imunosnog odgovora zavičajne vrste uskoškarog raka.

Razumijevanje imunosnog odgovora kao čimbenika u uspjehu invazije slatkovodnih deseteronožnih rakova i razlike u imunosnom odgovoru invazivnih stranih i zavičajnih vrsta slatkovodnih deseteronožnih rakova ostaje važan predmet istraživanja u biologiji rakova. Kod većine ispitanih parametara signalni rakovi imaju statistički značajno veće vrijednosti u odnosu na uskoškare rakove, što potvrđuje hipotezu da invazivna strana vrsta signalni rak ima jači imunosni odgovor u usporedbi sa zavičajnom vrstom uskoškarog raka. Jači imunosni odgovor, koji je nespecifičan, smatramo da bi trebao donijeti prednost i kod zaraze drugim patogenima što bi u miješanim populacijama kakva je prisutna u Korani, opet dalo kompetitivnu prednost signalnom raku. Daljnja istraživanja biti će usmjerena upravo na ispitivanja da li zabilježena veća snaga inkapsulacije i razlike u ukupnoj profenoloksidazi kao imunosnom potencijalu znače zapravo bolju

obranu i od drugih patogena što ćemo ispitivati kontroliranim eksperimentalnim izlaganjima rakova drugim patogenima.

Populacije uskoškarog raka u rijeci Korani počele su se smanjivati nakon unosa signalnog raka (Hudina i sur. 2017; Dragičević i sur. 2020). Svojim širenjem u uzvodnom i nizvodnom smjeru u rijeci Korani, signalni rak sve više potiskuje uskoškarog raka, pa tako populacije uskoškarog raka koje su bile prisutne u 2012. god. u središtu invazije, danas su potpuno istisnute. Unatoč robusnosti uskoškarog raka i otpornosti određenih populacija na patogen koji uzrokuje bolest račju kugu, prijašnja istraživanja potvrdila su da signalni rak istiskuje uskoškarog raka iz zajedničkih populacija u rijeci Korani. Međutim patogen, odnosno prijenos bolesti račje kuge nije glavni mehanizam kojim signalni rak istiskuje uskoškarog raka. Populacije signalnog raka u rijeci Korani su zdrave, a patogen *A. astaci* je zabilježen u vrlo malom postotku jedinki i u vrlo niskim koncentracijama:  $A_0$  i  $A_1$  razina zaraze prema Vrålstad i sur. (2009) (Dragičević i sur. neobjavljeni rezultati). Stoga smatramo kako tako niske koncentracije nisu pouzdane da bi se proglasila prisutnost patogena u populaciji signalnog raka u rijeci Korani. Zbog svega navedenoga, druge karakteristike signalnog raka, poput većeg fekunditeta i agresivnosti potencijalno doprinose istiskivanju uskoškarog raka (Söderbäck 1991; Usio i sur. 2001; Huber i Schubart 2005). Uz to, ovo istraživanje pokazuje kako i imunosni odgovor signalnog raka potencijalno doprinosi kompetitivnoj prednosti nad zavičajnom vrstom jer omogućava bolju obranu organizma od svih potencijalnih patogena u okolišu.

## 6. Zaključak

Provedeno istraživanje je pokazalo da se imunosni odgovor invazivne strane vrste signalnog raka značajno razlikuje od imunosnog odgovora zavičajne vrste uskoškarog raka. Razlike smo pokazali uspoređujući parametre imunosnog odgovora: ukupan broj hemocita, snaga reakcije inkapsulacije, aktivnost enzima fenoloksidaza i ukupna profenoloksidaza te kondicijske parametre: hepatosomatski indeks i Fulton-ov kondicijski faktor, s obzirom da je imunosni odgovor važna komponenta kondicije jedinki. Značajno veće vrijednosti su zabilježene kod signalnog raka u parametrima: Fulton-ov kondicijski faktor, snaga reakcije inkapsulacije i aktivnost ukupne profenoloksidaze, koje upućuju na bolji imunosni odgovor invazivne strane vrste signalnog raka u odnosu na zavičajnu vrstu uskoškarog raka. Također bolji imunosni odgovor signalnog raka potencijalno doprinosi kompetitivnoj prednosti signalnog raka nad uskoškarim, na području rijeke Korane. Ove spoznaje potvrđuju prijašnja istraživanja koja pretpostavljaju da je imunosni odgovor bolji kod invazivnih stranih vrsta u odnosu na zavičajne vrste i da je imunosni odgovor jedan od bitnih čimbenika koji doprinosi invazivnom uspjehu jedne od najuspješnijih invazivnih vrsta Europe.

## 7. Zahvale

Prvenstveno, veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Sandri Hudina bez koje ovaj rad ne bi bio moguć. Zahvaljujem se na pomoći prilikom izrade i pisanja ovog rada, a najviše od svega zahvaljujem se na svim pruženim mogućnostima i velikom povjerenju kojeg je imala u mene od samog početka studija.

Posebno se zahvaljujem asistentici Pauli Dragičević na svim savjetima, ustupljenoj literaturi, izrazitoj susretljivosti i pomoći prilikom izrade rada.

Veliko hvala kolegici Luciji Abramović uz čiju sam pomoć izradila praktični dio ovog rada.

Također zahvaljujem se prof. dr. sc. Ivani Maguire, asistentici Leoni Lovrenčić, Ljudevitu Luki Boštjančiću i Leni Bonassin na pomoći u laboratoriju.

I na kraju, željela bih se zahvaliti roditeljima Violeti i Vladimiru, bratu Darku i svim prijateljima na velikom strpljenju i pruženoj podršci.

Ovo istraživanje dio je projekta „Promjene sastava patogena i imunološkog odgovora tijekom širenja areala uspješnih invazivnih vrsta slatkovodnih rakova“ financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ UIP-2017-05-1720).

## 8. Popis literature

- Aydin, H., Kokko, H., Makkonen, J., Kortet, R., Kukkonen, H. and Jussila, J. (2014). The signal crayfish is vulnerable to both the As and the PsI-isolates of the crayfish plague. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, (413), p.3.
- Battistella, S., Bonivento, P. and Amirante, G.A. (1996). Hemocytes and immunological reactions in crustaceans. *Italian Journal of Zoology*, 63(4), pp.337–343.
- Becking, T., Mrugała, A., Delaunay, C., Svoboda, J., Raimond, M., Viljamaa-Dirks, S., Petrusek, A., Grandjean, F. and Braquart-Varnier, C. (2015). Effect of experimental exposure to differently virulent *Aphanomyces astaci* strains on the immune response of the noble crayfish *Astacus astacus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132, pp.115–124.
- Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), pp.248–254.
- Cerenius, L., Bangyeekhun, E., Keyser, P., Soderhall, I. and Soderhall, K. (2003). Host prophenoloxidase expression in freshwater crayfish is linked to increased resistance to the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*. *Cellular Microbiology*, 5(5), pp.353–357.
- Cerenius, L. and Söderhäll, K. (2018). Crayfish immunity – Recent findings. *Developmental & Comparative Immunology*, 80, pp.94–98.
- Céspedes, V., Stoks, R., Green, A.J. and Sánchez, M.I. (2019). Eco-immunology of native and invasive water bugs in response to water mite parasites: insights from phenoloxidase activity. *Biological Invasions*, 21(7), pp.2431–2445.
- Colautti, R.I., Ricciardi, A., Grigorovich, I.A. and MacIsaac, H.J. (2004). Is invasion success explained by the enemy release hypothesis? *Ecology Letters*, 7(8), pp.721–733.
- Crehuet, M., Alcorlo, P., Bravo-Utrera, M.A., Baltanás, A. and Montes, C. (2007). Assessing the trophic ecology of crayfish: a case study of the invasive *Procambarus clarkii*. *Biological*

*invaders in inland waters: Profiles, distribution, and threats*, pp.559–576.

Ding, Z., Du, J., Ou, J., Li, W., Wu, T., Xiu, Y., Meng, Q., Ren, Q., Gu, W., Xue, H., Tang, J. and Wang, W. (2012). Classification of circulating hemocytes from the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* and their susceptibility to the novel pathogen *Spiroplasma eriocheiris* in vitro. *Aquaculture*, 356, pp.371–380.

Dragičević, P., Faller, M., Kutleša, P. and Hudina, S. (2020). Update on the signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) range expansion in Croatia: a 10-year report. *BioInvasions Records*, 9(4), pp.793–807.

Državni zavod za zaštitu prirode (2009) Bioraznolikost Hrvatske. Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb, Hrvatska, 45 pp.

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. and Sullivan, C.A. (2005). Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews*, 81(02), p.163.

Faller, M., Harvey, G.L., Henshaw, A.J., Bertoldi, W., Bruno, M.C. and England, J. (2016). River bank burrowing by invasive crayfish: Spatial distribution, biophysical controls and biogeomorphic significance. *Science of The Total Environment*, 569, pp.1190–1200.

Fernandes, M.A.S., Mendonça, M.I.R., Marques, J.C. and Madeira, V.M.C. (1994). Seasonal changes in the biochemical composition and energy content of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Girard) in the lower Mondego river valley, Portugal. *Journal of Crustacean Biology*, 14(4), pp.736–743.

Filipová, L., Petrusek, A., Matasová, K., Delaunay, C. and 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), p.e70157.

Floerl, O. and Inglis, G.J. (2005). Starting the invasion pathway: the interaction between source populations and human transport vectors. *Biological Invasions*, 7(4), pp.589–606.



- Gajić-Čapka, M. and Zaninović, K. (2004). Climate conditions in the Sava, Drava and the Danube River basins. *Croatian Waters*, 12(49), pp.297–312.
- Galeotti, P., Rubolini, D., Fea, G., Ghia, D., Nardi, P.A., Gherardi, F. and Fasola, M. (2006). Female freshwater crayfish adjust egg and clutch size in relation to multiple male traits. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1590), pp.1105–1110.
- Genovesi, P. (2007). Towards a European strategy to halt biological invasions in inland waters. *Biological invaders in inland waters: Profiles, distribution, and threats*, pp.627–637.
- Gherardi, F. (2007). Understanding the impact of invasive crayfish. *Biological invaders in inland waters: Profiles, distribution, and threats*, pp.507–542.
- Gherardi, F. and Souty-Grosset, C. (2017). *Pontastacus leptodactylus* (amended version of 2016 assessment). *The IUCN Red List of Threatened Species 2017*, p.e.T153745A120103207.
- Giulianini, P.G., Bierti, M., Lorenzon, S., Battistella, S. and Ferrero, E.A. (2007). Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from the freshwater crayfish *Astacus leptodactylus*: Cell types and their role after in vivo artificial non-self challenge. *Micron*, 38(1), pp.49–57.
- Gollas-Galván, T., Hernández-López, J. and Vargas-Albores, F. (1999). Prophenoloxidase from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) hemocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 122(1), pp.77–82.
- Gruber, C., Kortet, R., Vainikka, A., Hyvärinen, P., Rantala, M.J., Pikkarainen, A., Jussila, J., Makkonen, J., Kokko, H. and Hirvonen, H. (2014a). Variation in Resistance to the Invasive Crayfish Plague and Immune Defence in the Native Noble Crayfish. *Annales Zoologici Fennici*, 51(4), pp.371–389.
- Gruber, C., Vainikka, A., Hirvonen, H., Rantala, M.J. and Kortet, R. (2014b). Endogenous Seasonal Variation in the Encapsulation Response of the Noble Crayfish (*Astacus astacus*). *Annales Zoologici Fennici*, 51(5), pp.433–444.
- Harlioğlu, M.M. (1996). *Comparative biology of the signal crayfish, Pacifastacus leniusculus*

(*Dana*), and the narrow-clawed crayfish, *Astacus leptodactylus* Eschscholtz. [Doctoral dissertation, University of Nottingham]

Hauton, C. (2012). The scope of the crustacean immune system for disease control. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(2), pp.251–260.

Hernández-López, J., Gollas-Galván, T., Gómez-Jiménez, S., Portillo-Clark, G. and Vargas-Albores, F. (2003). In the spiny lobster (*Panulirus interruptus*) the prophenoloxidase is located in plasma not in haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, 14(2), pp.105–114.

Hernández-López, J., Gollas-Galván, T. and Vargas-Albores, F. (1996). Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp *Penaeus californiensis* Holmes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 113(1), pp.61–66.

Holdich, D.M. (2002). *Biology of freshwater crayfish*. Oxford England: Blackwell Science, pp.97, 478–481, 511–518.

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*, (394-395), p.11.

Huber, M.G.J. and Schubart, C.D. (2005). Distribution and reproductive biology of *Austropotamobius torrentium* in Bavaria and documentation of a contact zone with the alien crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, (376-377), pp.759–776.

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

Hudina, S., Hock, K., Radović, A., Klobučar, G., Petković, J., Jelić, M. and Maguire, I. (2016). Species-specific differences in dynamics of agonistic interactions may contribute to the competitive advantage of the invasive signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) over the native narrow-clawed crayfish (*Astacus leptodactylus*). *Marine and Freshwater Behaviour*

- and Physiology*, 49(3), pp.147–157.
- Hudina, S., Kutleša, P., Trgovčić, K. and Duplić, A. (2017). Dynamics of range expansion of the signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) in a recently invaded region in Croatia. *Aquatic Invasions*, 12(1), pp.67–75.
- Hudina, S., Žganec, K., Lucić, A., Trgovčić, K. and Maguire, I. (2013). Recent invasion of the karstic river systems in Croatia through illegal introductions of the signal crayfish. *Freshwater Crayfish*, 19(1), pp.21–27.
- IUCN 2021. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2021-1. <https://www.iucnredlist.org>. pristupljeno 30.05.2021.
- Jiravanichpaisal, P., Lee, B.L. and Söderhäll, K. (2006). Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*, 211(4), pp.213–236.
- Johansson, M.W., Keyser, P., Sritunyaluksana, K. and Söderhäll, K. (2000). Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*, 191(1-3), pp.45–52.
- Johansson, M.W. and Söderhäll, K. (1985). Exocytosis of the prophenoloxidase activating system from crayfish haemocytes. *Journal of Comparative Physiology B*, 156(2), pp.175–181.
- Johnson, M.F., Rice, S.P. and Reid, I. (2011). Increase in coarse sediment transport associated with disturbance of gravel river beds by signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*). *Earth Surface Processes and Landforms*, 36(12), pp.1680–1692.
- Kokko, H., Harlioglu, M.M., Aydin, H., Makkonen, J., Gökmen, G., Aksu, Ö. and Jussila, J. (2018). Observations of crayfish plague infections in commercially important narrow-clawed crayfish populations in Turkey. *Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems*, (413), p.10.
- Lucić, A., Hudina, S., Faller, M. and Cerjanec, D. (2012). A comparative study of the physiological condition of native and invasive crayfish in Croatian rivers. *Biologia*, 67(1), pp.172–179.

- Maguire, I. (2014). Nacionalni programi za praćenje stanja očuvanosti vrsta i staništa u Hrvatskoj. Plemeniti ili riječni rak *Astacus astacus* (Linnaeus, 1758). Državni zavod za zaštitu prirode, Croatia, 28 pp.
- Maguire, I. and Gottstein-Matočec, S. (2004). The Distribution Pattern of Freshwater Crayfish in Croatia. *Crustaceana*, 77(1), pp.25–48.
- Maguire, I., Jelić, M. and Klobučar, G. (2011). Update on the distribution of freshwater crayfish in Croatia. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, (401), p.31.
- Maguire, I., Klobučar, G., Marčić, Z. and Zanella, D. (2008). The first record of *Pacifastacus leniusculus* in Croatia. *Crayfish news*, 30(4), pp.4–4.
- Maguire, I., Klobučar, G., Žganec, K., Jelić, M., Lucić, A. and Hudina, S. (2018). Recent changes in distribution pattern of freshwater crayfish in Croatia – threats and perspectives. *Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems*, (419), p.2.
- Maguire, I. and Klobučar, G.I.V. (2003). Appearance of *Orconectes limosus* in Croatia. *Crayfish news*, 25(3), pp.7–7.
- Malev, O., Šrut, M., Maguire, I., Štambuk, A., Ferrero, E.A., Lorenzon, S. and Klobučar, G.I.V. (2010). Genotoxic, physiological and immunological effects caused by temperature increase, air exposure or food deprivation in freshwater crayfish *Astacus leptodactylus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 152(4), pp.433–443.
- Marchetti, M.P., Moyle, P.B. and Levine, R. (2004). Alien fishes in California watersheds: Characteristics of successful and failed invaders. *Ecological Applications*, 14(2), pp.587–596.
- Moreno-García, M., Córdoba-Aguilar, A., Condé, R. and Lanz-Mendoza, H. (2012). Current immunity markers in insect ecological immunology: assumed trade-offs and methodological issues. *Bulletin of Entomological Research*, 103(2), pp.127–139.
- Müller-Schärer, H., Schaffner, U. and Steinger, T. (2004). Evolution in invasive plants:

- implications for biological control. *Trends in Ecology & Evolution*, 19(8), pp.417–422.
- NN 80/13 Zakon o zaštiti prirode Republike Hrvatske, Narodne novine 80, 2013.
- NN 144/2013 Pravilnik o strogo zaštićenim vrstama, Narodne novine 80, 2013.
- Pan, L.-Q., Hu, F.-W., Jing, F.-T. and Liu, H.-J. (2008). The effect of different acclimation temperatures on the prophenoloxidase system and other defence parameters in *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 25(1-2), pp.137–142.
- Perdikaris, C. and Georgiadis, C. (2017). Co-occurrence of narrow-clawed crayfish (*Astacus leptodactylus sensu lato*) and noble crayfish (*Astacus astacus* L.) in the southwestern Balkans: The case of Lake Pamvotida (NW Greece). *North-Western Journal of Zoology*, 13(1), pp.18–26.
- Phillips, B.L., Kelehear, C., Pizzatto, L., Brown, G.P., Barton, D. and Shine, R. (2010). Parasites and pathogens lag behind their host during periods of host range advance. *Ecology*, 91(3), pp.872–881.
- Pyšek, P., Jarošík, V. and Pergl, J. (2011). Alien Plants Introduced by Different Pathways Differ in Invasion Success: Unintentional Introductions as a Threat to Natural Areas. *PLoS ONE*, 6(9), p.e24890.
- Qin, Z., Sarath Babu, V., Lin, H., Dai, Y., Kou, H., Chen, L., Li, J., Zhao, L. and Lin, L. (2019). The immune function of prophenoloxidase from red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) in response to bacterial infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 92, pp.83–90.
- Rantala, M.J. (2004). Male dominance and immunocompetence in a field cricket. *Behavioral Ecology*, 15(2), pp.187–191.
- Rantala, M.J. and Roff, D.A. (2007). Inbreeding and extreme outbreeding cause sex differences in immune defence and life history traits in *Epirrita autumnata*. *Heredity*, 98(5), pp.329–336.
- Rebrina, F., Skejo, J., Lucić, A. and Hudina, S. (2015). Trait variability of the signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) in a recently invaded region reflects potential benefits and trade-offs during dispersal. *Aquatic Invasions*, 10(1), pp.41–50.

- Ricker, W.E. (1975). *Computation and interpretation of biological statistics of fish populations*. Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada.
- Rigaud, T. and Moret, Y. (2003). Differential phenoloxidase activity between native and invasive gammarids infected by local acanthocephalans: differential immunosuppression? *Parasitology*, 127(6), pp.571–577.
- Rodríguez-González, H., Hernández-Llamas, A., Villarreal, H., Saucedo, P.E., García-Ulloa, M. and Rodríguez-Jaramillo, C. (2006). Gonadal development and biochemical composition of female crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae) in relation to the Gonadosomatic Index at first maturation. *Aquaculture*, 254(1-4), pp.637–645.
- Romanuk, T.N., Zhou, Y., Brose, U., Berlow, E.L., Williams, R.J. and Martinez, N.D. (2009). Predicting invasion success in complex ecological networks. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1524), pp.1743–1754.
- Rowley, A.F. (2016). The Immune System of Crustaceans. *Encyclopedia of Immunobiology*, pp.437–453.
- Sala, O.E. (2000). Global Biodiversity Scenarios for the Year 2100. *Science*, 287(5459), pp.1770–1774.
- Samardžić, M., Lucić, A., Maguire, I. and Hudina, S. (2014). The First Record of the Marbled Crayfish (*Procambarus fallax* (Hagen, 1870) f. *virginalis*) in Croatia. *Crayfish News*, 36(4), pp.4–4.
- Shapiro, S.S., Wilk, M.B. and Chen, H.J. (1968). A comparative study of various tests for normality. *Journal of the American statistical association*, 63(324), pp.1343–1372.
- 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), pp.1321–1325.
- Söderhäll, K. (1982). Prophenoloxidase activating system and melanization - a recognition mechanism of arthropods. A review. *Developmental & Comparative Immunology*, 6(4),

pp.601–611.

Souty-Grosset, C., Holdich, D.M., Noel, P.Y., Reynolds, J.D. and Haffner, P. (2006). *Atlas of crayfish in Europe*. Paris: Muséum National D'histoire Naturelle, p.188.

Sritunyalucksana, K. and Söderhäll, K. (2000). The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture*, 191(1-3), pp.53–69.

Strayer, D.L. (2006). Challenges for freshwater invertebrate conservation. *Journal of the North American Benthological Society*, 25(2), pp.271–287.

Strayer, D.L. and Dudgeon, D. (2010). Freshwater biodiversity conservation: recent progress and future challenges. *Journal of the North American Benthological Society*, 29(1), pp.344–358.

Streissl, F. and Hödl, W. (2002). Growth, morphometrics, size at maturity, sexual dimorphism and condition index of Austropotamobius torrentium Schrank. *Hydrobiologia*, 477, pp.201–208.

Tanner, C.A., Burnett, L.E. and Burnett, K.G. (2006). The effects of hypoxia and pH on phenoloxidase activity in the Atlantic blue crab, *Callinectes sapidus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 144(2), pp.218–223.

Trožić-Borovac, S., Škrijelj, R., Đug, S., Mušović, A., Šljuka, S., Borovac, B. and Gajević, M. (2019). Negative effects of introducing allochthonous species *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) into aquatic ecosystems of Bosnia and Herzegovina [Abstract]. In: *Book of Abstracts. 3rd Symposium of Freshwater Biology*. Croatian Association of Freshwater Ecologists, Zagreb, Croatia, p.33.

Unestam, T. (1969). Resistance to the crayfish plague in some American, Japanese and European crayfishes. *Report of the Institute of Freshwater Research, Drottningholm*, 49, pp.202–209.

- Uredba (EU) br. 1143/2014 Europskog parlamenta i Vijeća o sprječavanju i upravljanju unošenja i širenja invazivnih stranih vrsta (2014), Službeni list Europske unije L317, 35-55.
- Usio, N., Konishi, M. and Nakano, S. (2001). Species Displacement Between an Introduced and A “vulnerable” Crayfish: The Role of Aggressive Interactions and Shelter Competition. *Biological Invasions*, 3(2), pp.179–185.
- Vazquez, L., Alpuche, J., Maldonado, G., Agundis, C., Pereyra-Morales, A. and Zenteno, E. (2009). Review: Immunity mechanisms in crustaceans. *Innate Immunity*, 15(3), pp.179–188.
- Vrålstad, T., Knutsen, A.K., Tengs, T. and Holst-Jensen, A. (2009). A quantitative TaqMan® MGB real-time polymerase chain reaction based assay for detection of the causative agent of crayfish plague *Aphanomyces astaci*. *Veterinary Microbiology*, 137(1-2), pp.146–155.
- Westman, K., Pursiainen, M. and Vilkmann, R. (1978). A new folding trap model which prevents crayfish from escaping. *Freshwater Crayfish*, 4(1), pp.235–242.
- White, T.A. and Perkins, S.E. (2012). The ecoimmunology of invasive species. *Functional Ecology*, 26(6), pp.1313–1323.



## 9. Sažetak

### Usporedba imunosnog odgovora zavičajne i invazivne strane vrste desetersonožnih rakova rijeke Korane

Anita Tarandek

Imunosni odgovor je odgovoran za obranu organizama od patogena i štetnih uvjeta u okolišu, te je od iznimne važnosti za organizme. Uz to imunostni odgovor jedan je od čimbenika o kojima ovisi invazivni uspjeh vrsta. U ovom istraživanju smo po prvi puta usporedili razlike u imunostnom odgovoru otporne zavičajne vrste, uskoškara raka (*Pontastacus letpodactylus*) i uspješne invazivne strane vrste, signalnog raka (*Pacifastacus leniusculus*) iz rijeke Korane, gdje ove vrste dolaze u miješanim populacijama. Istraživanje smo proveli uspoređujući parametre imunostnog odgovora: ukupan broj hemocita, snaga reakcije inkapsulacije, aktivnost enzima fenoloksidaza (PO) i ukupna profenoloksidaza (proPO) te kondicijske parametre: hepatosomatski indeks i Fulton-ov kondicijski faktor, s obzirom da je imunostni odgovor važna komponenta kondicije jedinki. Veće vrijednosti su zabilježene kod signalnog raka u sljedećim parametrima: Fulton-ov kondicijski faktor, snaga reakcije inkapsulacije i aktivnost ukupne profenoloksidaze zbog čega smo zaključili da invazivna strana vrsta signalni rak ima bolji imunostni odgovor u usporedbi sa zavičajnom vrstom uskoškara raka. Bolji imunostni odgovor signalnog raka uz ostale karakteristike poput većeg fekunditeta i agresivnosti potencijalno doprinosi istiskivanju populacija uskoškara raka u miješanim populacijama na području rijeke Korane. Ovim potvrđujemo prijašnja istraživanja koja pretpostavljaju da je imunostni odgovor bolji kod invazivnih stranih vrsta u odnosu na zavičajne vrste i da je imunostni odgovor jedan od bitnih čimbenika koji doprinosi invazivnom uspjehu jedne od najuspješnijih invazivnih vrsta Europe.

**Ključne riječi:** imunostni odgovor, signalni rak, uskoškari rak, rijeka Korana

## 10. Summary

### Comparison of the immune response of native and invasive alien species of decapod crayfish of the Korana river

Anita Tarandek

The immune response is responsible for protecting organisms against pathogens and harmful environmental conditions, hence it is of great importance to organisms. Consequently, the immune response is one of the drivers of invasion success of a species. In this study, we compared for the first time the differences in the immune response of the resistant native species, the narrow-clawed crayfish (*Pontastacus lepodactylus*) and the successful invasive alien species, the signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) from the Korana river, where these species occur in mixed populations. We conducted the study by comparing immune response parameters: total hemocyte count, strength of the encapsulation response and enzyme activity of phenoloxidase (PO) and total prophenoloxidase (proPO) and body condition parameters: hepatosomatic index and Fulton's condition factor, since the immune response is considered as an important fitness component. Significantly higher values were observed in the signal crayfish for the following parameters: Fulton's condition factor, strength of the encapsulation response and total prophenoloxidase. Thus, the invasive signal crayfish had a better immune response in comparison to the native narrow-clawed crayfish. The better immune response of the signal crayfish along with other characteristics such as higher fecundity and aggressiveness potentially contributes to the observed displacement of populations of the narrow-clawed crayfish from mixed populations in the Korana river. This finding is in line with previous studies that suggest that the immune response of invasive alien species is advantageous in comparison to the native species and that the immune response is one of the important factors contributing to the invasion success of one of Europe's most successful aquatic invaders.

**Key words:** immune response, signal crayfish, narrow-clawed crayfish, Korana river

## 11. Životopis

### Osobni podaci

Ime i prezime: Anita Tarandek

Adresa: Poljanski Lug 38, Vrbovec

Datum i mjesto rođenja: 28.01.1998. Bitola, Makedonija

### Obrazovanje

2020-danas – Diplomski studij Eksperimentalne biologije – Zoologija, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb, Hrvatska

2017-2020 – Preddiplomski studij Biologije (univ. bacc. biol.) Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb, Hrvatska

2012-2016 – Opća gimnazija „Josip Broz Tito“, Bitola, Makedonija

### Iskustvo

2021 – predsjednica Udruge studenata biologije - BIUS

2019 – 3. Simpozij o biologiji slatkih voda, usmena prezentacija: „The effects of three psychoactive compounds on behavior of the invasive signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852).”

2019 – „Smotra Sveučilišta u Zagrebu“

2018-2021 – „Noć Biologije“