

Usporedba stope metabolizma podzemnih i nadzemnih populacija rakova porodice Asellidae

Tomić, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2025

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:100189>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-13**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Lucija Tomić

**Usporedba stope metabolizma podzemnih i
nadzemnih populacija rakova porodice**

Asellidae

Diplomski rad

Zagreb, 2025.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Lucija Tomić

**Comparison of metabolic rates between
subterranean and surface asellid crustaceans**

Master thesis

Zagreb, 2025.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za molekularnu biologiju na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Tvrka Dražine, te komentorstvom dr. sc. Helene Bilandžije. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

ZAHVALE

Za istraživanje i izradu ovog rada, najprije bih zahvalila Jani Bedek. Hvala za puno strpljenja i utješnih riječi kada sam nailazila na prepreke i kada je bilo teško nastaviti dalje.

Hvala komentorici Heleni i mentoru Tvrtku na razumijevanju i usmjeravanju tijekom pisanja rada.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima na neizmjernoj podršci i ljubavi.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek
rad

Diplomski

Usporedba stope metabolizma podzemnih i nadzemnih populacija rakova porodice Asellidae

Lucija Tomić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Ovaj diplomski rad istražuje stope metabolizma kod nadzemnih i podzemnih vrsta rakova porodice Asellidae: *Asellus aquaticus*, *Proasellus anophthalmus* i *Proasellus coxalis*. Uzorci su sakupljeni s različitih prirodnih lokacija i održavani u kontroliranim laboratorijskim uvjetima. Stopa metabolizma mjerila se u obliku potrošnje kisika pomoću uređaja - respirometra PyroScience FireSting-O2. Istražio se i utjecaj različitih svjetlosnih uvjeta na potrošnju kisika te potrošnja kisika kod različitih spolova. Podaci o potrošnji kisika alometrijski su obrađeni i analizirani statističkim testovima. Zaključeno je da se stopa metabolizma ne razlikuje kod nadzemnih i podzemnih populacija rakova *A. aquaticus*. Stopa metabolizma bila je viša kod podzemne vrste *P. anophthalmus* u usporedbi s nadzemnom vrstom *P. coxalis*. Također, zaključeno je da utjecaj mraka ne mijenja potrošnju kisika kod nadzemnih skupina rakova *A. aquaticus* i *P. coxalis*. Utjecaj svjetla na podzemnoj skupini rakova *A. aquaticus* snizio je stopu metabolizma. Podzemni rakovi pokazali su plastičnost u stopi metabolizma pri uvjetima izmjene svjetla i mraka, dok nadzemni rakovi nisu. Rezultati pokazuju raznoliko djelovanje okolišnih uvjeta na stopu metabolizma podzemnih i nadzemnih populacija rakova.

Ključne riječi: potrošnja kisika, *Asellus*, *Proasellus*, svjetlosni uvjeti, temperatura (38 stranica, 16 slika, 2 tablice, 103 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: izv. prof. dr. sc. Tvrtko Dražina

Komentor: dr. sc. Helena Bilandžija

Ocjenitelji:

Izv. prof. dr. sc. Tvrtko Dražina

Prof. dr. sc. Ivana Maguire

Doc. dr. sc. Josip Skejo

Zamjena: izv. prof. dr. sc. Sanda Hudina

Rad prihvaćen: 6.2.2025.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology
thesis

Master

Comparison of metabolic rates between subterranean and surface asellid crustaceans

Lucija Tomić

Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

This master's thesis investigates the metabolic rates between surface and subterranean species of crustaceans from the family Asellidae, specifically in the species *Asellus aquaticus*, *Proasellus anophthalmus*, and *Proasellus coxalis*. Samples were collected from various natural locations and maintained under specific laboratory conditions. Oxygen consumption was measured using the respirometer device PyroScience FireSting-O2. The study also examined the impact of different light conditions on oxygen consumption and the oxygen consumption between opposite sexes. Data on oxygen consumption were processed allometrically and analyzed using statistical tests. It was concluded that the metabolic rate does not differ between surface and subterranean populations of *A. aquaticus*. However, the metabolic rate was higher in the subterranean species *P. anophthalmus* compared to the surface species *P. coxalis*. Additionally, the results showed that darkness did not affect oxygen consumption in the surface-dwelling groups *A. aquaticus* and *P. coxalis*. In contrast, exposure to light reduced the metabolic rate in the subterranean group of *A. aquaticus*. Subterranean crustaceans exhibited metabolic plasticity under alternating light and dark conditions, whereas surface-dwelling crustaceans did not. The results highlight the diverse effects of ecology and environmental conditions on the metabolic rates of subterranean and surface crustaceans.

Keywords: oxygen consumption, *Asellus*, *Proasellus*, light conditions, temperature

(38 pages, 16 figures, 2 tables, 103 references, original in: croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Assoc. Prof. Tvrtko Dražina, PhD

Co-mentor: Helena Bilandžija, PhD

Reviewers:

Assoc. Prof. Tvrtko Dražina, PhD

Prof. Ivana Maguire, PhD

Assist. Prof. Josip Skejo, PhD

Substitute: Assoc. Prof. Sandra Hudina

Thesis accepted: 6.2.2025.

KRATICE

AALC – nadzemni *Asellus aquaticus* iz potoka Lummelunda

AALS – podzemni *A. aquaticus* iz ponora Lummelunda

AAPC – podzemni *A. aquaticus* iz Planinske jame

AAPS – nadzemni *A. aquaticus* iz rijeke Unice

AASC – podzemni *A. aquaticus* iz ponora Sušik

AASS – nadzemni *A. aquaticus* iz potoka Sušik

DD – laboratorijski uvjeti konstantnog mraka (eng. *dark – dark*)

G0 – izvorna generacija s lokaliteta

G1 – prva laboratorijski uzgojena generacija

LD – laboratorijski uvjeti izmjene svjetla i mraka (eng. *light – dark*)

PAMO – podzemni *Proasellus anophtalmus* iz Močiljske špilje

PCVR – nadzemni *P. coxalis* iz Vranskog jezera

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Podzemna staništa i prilagodbe.....	1
1.2. Metabolizam špiljskih životinja	3
1.3. Asellidae	4
2. Cilj istraživanja.....	7
3. Materijali i metode.....	7
3.1. Eksperimentalne životinje	7
3.2. Pripreme za eksperimente i eksperimentalna procedura.....	8
3.3. Obrada podataka	11
3.4. Proces uhodavanja metode.....	11
3.5. Podzemne i nadzemne populacije rakova pripremljene za eksperiment 1.....	11
3.6. Podzemne i nadzemne populacije rakova pripremljene za eksperiment 2.....	13
4. Rezultati	14
4.1. Uhodavanje metode.....	14
4.2. Usporedba potrošnje kisika podzemnih i nadzemnih populacija rakova.....	18
4.3. Utjecaj mraka na potrošnju kisika	22
4.3.1. Utjecaj mraka na potrošnju kisika kod nadzemnih populacija rakova	22
4.3.2. Utjecaj svjetla na potrošnju kisika kod podzemnih populacija rakova.....	24
5. Rasprava	25
6. Zaključak	27
7. Literatura	28
8. ŽIVOTOPIS.....	37
PRILOZI.....	38

1. Uvod

1.1. Podzemna staništa i prilagodbe

Podzemna staništa područja su pod površinom koje čine predjeli ispunjeni zrakom i predjeli ispunjeni vodom. Ono što sva podzemna staništa povezuje su trajni nedostatak svjetla, ograničena produkcija energije te smanjena okolišna varijabilnost u usporedbi s površinom (Culver i Pipan 2009). S obzirom na unos energije, koja se u podzemnim staništima nalazi u obliku mrtve i otopljene organske tvari, mikroorganizama i guana, špilje se smatraju oligotrofnim staništem, osobito u unutarnjim i izoliranim dijelovima (Gnaspini i Trajano 2000, Simon i sur. 2007, Culver i Pipan 2009a, Culver i Pipan 2019). Dva su moguća načina koja energijom opskrbljuju hranidbene mreže takvih staništa. Jedan način je putem kemoautotrofije, gdje kemoautotrofni prokarioti metaboličkim putevima dobivaju energiju iz kemijskih procesa i tako stvaraju biomasu (Engel 2007). Drugi, češći način je dolazak energije s gravitacijom kroz pukotine na stropu i sam ulaz špilje, vjetrom, vodom, ili preko životinja kao što su šišmiši, ravnokrilci ili glodavci (Culver i Pipan 2019). Okolišni uvjeti u podzemnim staništima su generalno stabilni tijekom cijele godine, s malim kolebanjima temperature i vlage, dok strujanje zraka i razina vode ovise o površinskim uvjetima (White i sur. 2019). Temperatura zraka i podzemnih voda usko korelira sa srednjom vrijednosti godišnje temperature na površini (Badino 2004).

U podzemnim vodama živi preko 7000 životinjskih vrsta, a uglavnom su to člankonošci (Stein i sur. 2012, Chen i sur. 2017, Baković i sur. 2022). Obligatorne vodene špiljske organizme koji čitav životni ciklus završe u špilji nazivamo stigobiontima. Klasičan je primjer čovječja ribica *Proteus anguinus* Laurenti, 1768. Stigofili su organizmi koji mogu zatvoriti životni ciklus u špilji, ali i na površini. Kopnena fauna se na isti način može podijeliti te razlikujemo troglobionte kao obligatorne kopnene špiljske organizme koji su životnim ciklusom potpuno vezani za podzemlje. Troglofili su kopneni organizmi koji se mogu reproducirati i uspostaviti stabilne populacije u špilji i izvan nje (Culver i Pipan 2013).

S obzirom da je distribucija podzemne faune ograničena, proces specijacije dovodi do nastanka novih svojti te je stopa endemizma često velika. Time mnoge špiljske imaju veliku filogenetsku i konzervacijsku vrijednost (Zagmajster i sur. 2018, Culver i Pipan 2013).

Podzemlje karakteriziraju drugačiji okolišni uvjeti u odnosu na nadzemna staništa, a tim relativno ekstremnim uvjetima podzemni organizmi su se na različite načine prilagodili. Morfološke, bihevioralne i fiziološke promjene u organizmima uzrokovane špiljskim uvjetima, nazivamo troglomorfije (Christiansen 1962, White i sur. 2019). S obzirom na konstantnu tamu, troglomorfije možemo podijeliti na direktno i indirektno povezane sa svjetlom. Direktno povezane one su koje se tiču promjena u morfologiji: regresija (potpuni nedostatak) očiju, odnosno anoftalmija; regresija u

pigmentaciji (albinizam); promjene u ponašanju; regresija u toleranciji na UV svjetlo; regresija u cirkadijalnoj aktivnosti i ritmu i dr. Osim navedenih bihevioralnih promjena, kod nekih vrsta primijećeno je poboljšanje u lovu. Usporedbom lovljenja i hranjenja podzemnih i površinskih vodozemaca *P. anguinus* odnosno *Euproctus asper* (Dugès, 1852), Uiblein i sur. (1992) su zaključili kako je vrsta *P. anguinus* puno uspješnija u lovu u mraku, preciznije locira i brže ugrabi plijen u odnosu na proučavanu nadzemnu svojtu. Bolji uspjeh u lovu i hranjenju imaju i ribe, špiljske meksičke tetre *Astyanax mexicanus* (De Filippi, 1853) u usporedbi s površinskim svojutama tetri. One su razvile posebne strategije i metode lova u mraku: špiljske tetre hrane se pod nižim kutevima položaja tijela u odnosu na površinu vode (38° - 49°), a površinske pod višim kutevima (74°) (Kowalko i sur. 2013). Također, još jedna prilagodba za hranjenje i lovljenje u mraku jest privlačnost vibrirajućim objektima u vodi. Ovu pojavu više upražnjavaju špiljske od površinskih tetri, a princip vibracija sličan je frekvencijama koje stvaraju mali beskralježnjaci dok plivaju u vodi (Yoshizawa i sur. 2010). Dodatno, povezane troglomorfije sa svjetlom su one u kojima je došlo do povećanja sposobnosti u osjetilima, poput produljenja ticala kod beskralježnjaka, povećanje broja receptora za dodir i sl. (White i sur. 2019). Troglomorfije nastale zbog smanjene dostupnosti hrane se prvenstveno očituju u smanjenoj stopi metabolizma, duljem životnom vijeku u odnosu na nadzemne srodnike, nižem stupnju reprodukcije, povećanom volumenu jajašaca, skraćenom postembrionalnom razvoju, povećanom udjelu lipida i dr. (White i sur. 2019). Kako određene troglomorfne značajke karakterizira povećanje i produljenje osjetilnih i tjelesnih privjesaka za hodanje, te prilagodbe nazivamo konstruktivnima. I konstruktivne i regresivne troglomorfne značajke pridonose povećanju fitnesa u špiljskom okolišu (Jeffery i Protas 2012, White i sur. 2019).

Troglomorfije su slične u različitim i taksonomski udaljenim grupama organizama (Poulson i White 1969). Navedene promjene odvile su se pod selekcijskim pritiskom, neovisno o lokalitetima (Poulson i White 1969, Hüppop 2000). Primjer kod riba jesu špiljske ribe porodice Amblyopsidae koje imaju dulje i uže glave i tijelo od nadzemnih riba iste porodice (Hart i sur. 2020). U redovima rakova veslonožaca (Copepoda) i ljuskara (Ostracoda) oči su reducirane na manja područja s nešto pigmenta. Slična redukcija se dogodila i u sastavljenom oku slatkovodnih jednakonožnih rakova (Isopoda; Schram 1986). Redukcija oka vidljiva je i u redovima rašljonožaca (Mysida) i deseteronožnim rakovima (Decapoda), čija je očna stapka skraćena te je naknadno došlo do smanjenja i gubitka vidnih struktura - omatidija (Wilkens i sur. 1991, Mejía-Ortíz i Hartnoll 2005). Poznata su i istraživanja na podzemnim i površinskim populacijama slatkovodnih rakušaca vrste *Gammarus minus* Say, 1818, gdje je podzemna populacija pokazala produljene tjelesne privjeske i redukciju očiju i pigmenta. Tu je također zabilježena jaka korelacija između broja jajašaca i komponenata tjelesne kondicije bitne za razmnožavanje (fekunditet), s relativnom veličinom očiju i tjelesnih privjesaka (Culver 1994, Culver i Pipan 2013). Nadalje, određeni nadzemni srodnici (rodovi *Astyanax*, *Asellus*) u laboratorijskim se

uvjetima mogu razmnožavati s podzemnim vrstama što znači da još nije nastupila potpuna reproduktivna izolacija (Konec i sur. 2015, Mojaddidi i sur. 2018).

1.2. Metabolizam špiljskih životinja

Poznato je da špiljski organizmi uglavnom imaju nižu stopu metabolizma od nadzemnih srodnika (Hervant i sur. 1997, Di Lorenzo i sur. 2015). Stopa metabolizma može se objasniti kao sva energija koju organizam utroši kroz određeni period. Jedan od dobrih indeksa u istraživanju aerobnog metabolizma je potrošnja kisika (Hervant i sur. 1998). Potrošnja kisika može se kvantificirati kao volumen potrošenog kisika u vremenu (Lampert 1984). Ona također varira između svojti i na nju utječu različiti faktori kao što su okolišni uvjeti (npr. temperatura), tjelesna masa i razina fizičke aktivnosti (Culver i Poulson 1971). Smatra se da se niža stopa metabolizma špiljskih organizama razvila kao prilagodba na špiljske uvjete poput nepredvidivih perioda bez hrane te hipoksiju i/ili anoksiju. Provedena su brojna istraživanja uspoređivanja stope metabolizma između špiljskih i nadzemnih vrsta, što kralježnjaka, što beskralježnjaka. Razlikujemo standardnu stopu metabolizma (najniža potrebna energija kako bi se održala homeostaza i integritet organizma (Jusup i sur. 2017)) i rutinsku (srednja vrijednost stope metabolizma u normalnim uvjetima organizma (Norin i Clark 2016)). Poulson (1963) je uspoređivao standardnu i rutinsku stopu metabolizma između stigobionata i ne-stigobionata porodice riba *Amblyopsidae* (*Actinopterygii*). Dokazao je da stigobionti imaju za barem trećinu nižu i standardnu i rutinsku stopu metabolizma u usporedbi s ne-stigobiontima. U uvjetima smanjenog kisika, u vodenih beskralježnjaka postoje razlike u potrošnji kisika i u ventilacijskim aktivnostima (broj udaraca pleopoda po minuti). Dokazano je, primjerice, da podezmni slatkovodni rakušac iz roda *Niphargus* i podzemni jednakonožni rak iz roda *Stenasellus* u uvjetima hipoksije imaju visok stupanj preživljavanja. Točnije, u značajnoj hipoksiji (razina otopljenog kisika je manja od 0,01 mg/L O₂) ove vrste mogu preživjeti i do dva dana (Malard i Hervant 1999). Visok stupanj preživljavanja očituje se u skladištenom glikogenu i kreatin – fosfatu te u sposobnosti sniženja stope metabolizma. Simčić i Sket (2019) u svojim su istraživanjima stope metabolizma dokazali kako nema značajne razlike u potrošnjama kisika između istih rodova nadzemne i podzemne vrste; *Niphargus zagrebensis* S. Karaman, 1950 vs. *Niphargus stygius* Schiødte, 1847. Hervant i Renault (2002) dokazali su da podzemni jednakonožni rak *Stenasellus virei* Dollfus, 1897 ima nižu standardnu stopu metabolizma od nadzemnog jednakonožnog raka *A. aquaticus* zahvaljujući uskladištenim zaliham arginin fosfata, proteina i triglicerida. Nadzemni jednakonožni rak *A. aquaticus* i rakušac *Gammarus fossarum* (Koch, 1836) u usporednom istraživanju pokazali su pojačanu aktivnost i hiperventilaciju u stanju hipoksije u odnosu na podzemne vrste *Niphargus virei* Chevreux, 1896, *Niphargus rhenorhodanensis* Schellenberg, 1937 i *Stenasellus virei* (Hervant i Mathieu 1995, Hervant i sur. 1998, Malard i Hervant 1999). Jemec i sur. (2017) istraživali su fiziološke razlike između podzemnih i nadzemnih populacija raka *A. aquaticus* te dokazali da podzemne populacije imaju sniženu potrošnju kisika i sniženu lokomotornu aktivnost. Edwards i Learner (1960) dokazali su da *A. aquaticus* iz brzog vodotoka ima za 1,5 puta višu stopu metabolizma u odnosu na *A.*

aquaticus koji nastanjuje sporije vodotoke. Dodatno, dokazali su da kod *A. aquaticus* nema značajne razlike u potrošnji kisika između spolova, iako je pri višoj temperaturi potrošnja bila za 1,5 puta veća nego pri nižoj (Edwards i Learner 1960). Promjene stope metabolizma zabilježene su kod vrsta roda *Proasellus*, gdje se utvrdilo da temperatura značajno utječe na potrošnju kisika (Griebler i Avramov 2015, Di Lorenzo i Reboleira 2022). Pri višim temperaturama (22,5° C) potrošnja kisika bila je niža za 75% kod odraslih jedinki, dok je na nižim temperaturama (17° C) stopa bila viša. Isto istraživanje zaključilo je da različite vrste roda *Proasellus* imaju različite stope metabolizma; *P. lusitanicus* ima manju potrošnju kisika od *Proasellus valdensis* (Chappuis, 1948), iako su filogenetski bliske (Di Lorenzo i sur. 2022).

1.3. Asellidae

Rakovi porodice Asellidae pripadaju podredu Asellota, redu Isopoda, nadredu Peracarida, razredu Malacostraca, koljenu Arthropoda. Podred Asellota nastanjuje širok spektar vodenih staništa, lagano bočata i slatkovodna površinska staništa te slatkovodna podzemna staništa (Verovnik i sur. 2005). Porodica Asellidae broji 90 vrsta (WoRMs 2024). Tijelo jednakonožnih rakova dorzoventralno je spljošteno i pigmentirano, dok su obligatorni špiljski rakovi bez pigmenta (albino) (Kovalenko i sur. 2012). Tijelo im je sastavljeno od segmenata glave – *cephalon*, prsa – *pereion* i zatka – *pleon*. Na glavi se nalaze sastavljene oči, dva para uniramnih ticala i tri para usnih organa: gornja čeljust – *mandibula*, dva para donjih čeljusti – *maxilla* i *maxillule*, i čeljusne noge – *maxillipedi*. Prsa čini 7 pereona i svaki nosi po par pereopoda. Glava je spojena s prvim pereonom u glavopršnjak – *cephalopereion*. Pereiopodi su člankoviti tjelesni privjesci za hodanje i prihvaćanje te veličinom rastu od početka do završetka prsa. Zadak je prilično kratak, sastoji se od 5 pleona i nosi privjeske pleopode. Pleopodi su biramni i modificirani za plivanje i izmjenu plinova te nose uropode. Uropodi zajedno s telzonom služe određivanju pravca kretanja (Mejia-Ortiz 2019). Kod nekih grupa pleon je stopljen sa telsonom u pleotelson. Drugi pleopod mužjaka preinačen je u spremnik spolnih stanica kojim ih polaže u ženku. Završetak istog sekundarnog pleopoda endopoda sadrži prijenosnu cjevčicu kanulu – *cannula*. Kanula je jedinstvene konstrukcije kod svake vrste te se identifikacija većine vrsta porodice Asellidae može vršiti pregledavajući tu strukturu (Vick i sur. 2009, Rogers i Lewis 2019).

Rakovi porodice Asellidae po ishrani su omnivori i detritivori (Økland 1978). Imaju bitnu ulogu u recikliranju nutrijenata i stvaranju biomase. Njihovi su predatori ribe, kukci i ptice (Bjelk i Herrmann 2005). Kod određenih vrsta zabilježena je visoka tolerancija na organske i kemijske polutante te sposobnost bioakumulacije metala (Aston i Milner 1980).

Reprodukcija. Muški spolni sustav sastoji se od para testisa u središnjem dijelu prsa i odvodnih cjevčica koje završavaju ispred prvog para pleopoda. Ženka ima dorzalno smještene parne jajnike i jajovode čiji

su otvori na 5. pereimeri (Brusca 1984). Netom prije nego li se mužjak nogama uhvati za ženku, okrene ju prema trbuhu kako bi provjerio nosi li u tobolcu već oplodena jajašca ili ne (Racovitza 1920). Tijekom parenja (proljeće i rano ljeto), mužjaci su 4. parom nogu pričvršćeni za ženke u prekopulacijski par – amplexus. Mužjak u više navrata pleopodima ubacuje spermatofore u ženku i nakon toga ju otpušta. Fertilizacija je moguća u vrlo kratkom roku, od 24 sata, kada su otvori jajovoda ženki otvoreni, točno kada svoj egzoskelet presvuče posteriorno do 5. pereona (Brusca 1984). Nakon inseminacije i oplodnje, jajašca su smještena u tobolac na trbušnoj strani ženke koji je nastao iz preklapajućih ležnih ploča - oostegita (Brusca i Iverson 1985). Razlika u spolovima najočitija je kada je ženka gravidna jer tada ženke djeluju deblje u području pereona 2 – 6, zbog uvećanog tobolca u kojem se razvijaju embriji (Unwin i sur. 1920).

Razvoj. Embionalna jajašca su centrolecitalna, velika i puna žumanjka. Okružena su korionskom i vitelina membranom. Brazdaju se holoblastično. Embriji se neposredno razvijaju u tobolcu otprilike mjesec dana te nakon što dosegnu dužinu od 1 mm, izlaze van. Mladunci prolaze kroz dvije faze presvlačenja, kada se prednja i stražnja polovica tijela postepeno svlače. Prvo se svlači stražnja polovica tijela do 5. pereimere i dolazi do stvrdnjavanja egzoskeleta na istom dijelu. Zatim se svlači prednja polovica tijela do 4. pereimere. Trajanje cijelog presvlačenja traje 24 sata. Spolna zrelost nastupa između 1,5 i 3 mjeseca starosti, a dužina im je tada otprilike 3 – 4 mm (Lafuente i sur. 2021).

Fenotipska plastičnost. Budući da određene vrste porodice Asellidae nastanjuju različita staništa, dokumentirana je njihova fenotipska varijabilnost u okolišu u kojem se nalaze. Široka distribucija znak je da ovi rakovi posjeduju visok kapacitet za fenotipske promjene i genetske adaptacije (Sworobowicz i sur. 2015). Kako i u špiljama dolazi do manjih varijacija u temperaturi, špiljski organizmi su se aklimatizirali i na te promjene (Pallarées i sur. 2020). Poznato je da, s obzirom na to koliko su velike temperaturne varijacije u prostoru, ektotermni organizmi mogu se proporcionalno aklimatizirati. No, zabilježeno je da su neke stigobionske vrste možda izgubile sposobnost termalne aklimatizacije kako bi se prilagodile podzemnim vodama (Angilletta i Angilletta 2009, Pallarées i sur. 2020).

Asellus aquaticus (Linnaeus, 1758) rak je koji se može pronaći u sjevernom, centralnom i južnom dijelu Europe i zapadnoj Aziji (Sibir, Turkenistan) (Verovnik i sur. 2005, Williams 2009). Pretpostavlja se da je došao iz Azije prije 8 – 10 milijuna godina s područja Sibira te je Europu kolonizirao u više navrata. Današnja distribucija odraz je posljednjeg ledenog doba, a područje Apenina i Balkanskog poluotoka služili su mu kao glavni glacijalni refugij (Henry i Magniez 1983, Culver i Pipan 2009c). Staništa su mu slatkovodni izvori, rijeke, jezera i podzemne vode (Verovnik i sur. 2005, Culver i Pipan 2009c). Euritermalna je i prilično ekspanzivna vrsta (Prevorčnik i sur. 2004). Ovi rakovi na godišnjoj razini imaju dvije generacije. Prva dolazi u povoljnom vremenskom periodu, u proljeće te se do spolne zrelosti razvija tijekom ljetnih mjeseci. Druga generacija dolazi u jesen i naglo se razvija u prvim tjednima života. Spolnu zrelost doseže brzo, tijekom zimskih mjeseci, a nakon toga ulazi u reproduktivnu fazu ili

mirovanje. Budući da se ova vrsta nalazi na različitim geografskim lokacijama, postoje varijacije u sezonama parenja. One populacije koje nastanjuju sjeverna područja, sezona parenja i period reproduktivne neaktivnosti je kraći. Kod populacija koje žive na južnijim područjima sezone parenja i period reproduktivne neaktivnosti je dulji (Migliore i sur. 1982). Rod *Asellus* u Europi sastoji se od više podvrsta vrste *A. aquaticus*, a bitno je naglasiti da one špiljske podvrste/populacije imaju različite stupnjeve troglomorfije (Racovitza 1925, Prevorčnik i sur. 2002). Upravo iz tog razloga dobri su modelni organizmi u istraživanju evolucije (Prevorčnik i sur. 2004). Sket (1994) je opisao 10 podvrsta ovog raka (Prilog I). *Asellus aaquaticus cyclobranchialis* je podvrsta sa slabo izraženom troglomorfijom, dok su *A. a. cavernicolucus* i *A. a. infernus* podvrste s potpunom troglomorfijom; populacije su depigmentirane i bez očiju (Turk i sur. 1996). *Asellus a. cavernicolus* ima grupe stigobiontskih (sub)populacija koje nastanjuju podzemni tok rijeke Pivke i Ljubljance u Sloveniji, a *Asellus aquaticus infernus* ima troglobionsku populaciju u rumunjskoj špilji Movile (Protas i sur. 2023). Također, stigobionska populacija u špilji Movile proizvede manje jajašca od površinske populacije (Negoescu 1989). *A. a. infernus* čine grupu rakova koja je potpuno depigmentirana (Sket 1994). Hiporeičke (podzemne) populacije u Francuskoj su iznimka, njihov fenotip odgovara pigmentaciji površinskih rakova (Henry 1973). Populacije u kojima su pojedini primjerci značajno depigmentirani, a samu populaciju nije jednolično zahvatila ta promjena u pigmentaciji očiju i tijela, nalazimo u Njemačkoj, kanaliziranim vodotocima u sjevernoj Francuskoj, vodovodima u sjevernoj Italiji, bunarima u središnjoj Poljskoj, podzemnim zalihama vode u Nizozemskoj te špiljama u južnoj i sjeverozapadnoj Turskoj (Protas i sur. 2023).

Proasellus coxalis (Dollfus, 1892) nastanjuje područje Mediterana (Stoch 1985, Stoch i sur. 1996). Tijekom 20. stoljeća vrsta se proširila na područja kontinentalnih rijeka u Belgiji, Nizozemskoj i Njemačkoj, u estuarije rijeka Sjevernog mora i područje Baltičkog mora. Proširila se balastnim vodama i preko drugih organizama koji su se koristili kao mamac u ribolovu (Kemp i sur. 2020). Ova vrsta smatra se politipičnom zbog velike morfološke raznolikosti te je opisano 28 podvrsta (Stoch i sur. 1996). Cijela *Proasellus coxalis* grupa jedinstvena je po tome što mužjaci imaju karakterističan oblik endopoda drugog pleopoda (Henry i Magniez 1976). Grupi *P. coxalis* pripada više (pod)vrsta (Prilog II; Deeleman – Reinhold 1965, Stoch i sur. 1995). Podvrsta *P. c. lucifucus* iz Manite peći (NP Paklenica), koja živi u mraku, slabo je pigmentirana, dok je kod većih jedinki pigmentacija potpuno nestala. S obzirom na to da im oči nisu reducirane, a pigment gube, pretpostavlja se da su u nedavnoj evolucijskoj prošlosti imigrirali u špilju. U usporedbi s podvrstom *P. c. coxalis*, podvrsta *P. c. lucifugus* ima bodlje na distalnom dijelu pleopoda 1. – 6., a uropodi oba spola kraći su od duljine telzona (Racovitza 1919, Deeleman – Reinhold 1965). Zamijećeno je da su podvrste *P. coxalis* koje žive na području zajedno u simpatriji s *A. aquaticus* manjih dimenzija od podvrsta koje žive u alopatriji. Zbog njihove kompeticije, *Proasellus c. lucifugus* je migrirao u izoliranija staništa i podzemne vode (Racovitza 1919, Remy 1932).

2. Cilj istraživanja

Glavni ciljevi ovog diplomskog rada su:

- Utvrditi potrošnju kisika kao mjeru za stopu metabolizma kod podzemnih i nadzemnih rakova porodice Asellidae;
- Utvrditi utjecaj svjetla/tame, temperature i različitog spola na stopu metabolizma kod odabranih rakova iz porodice Asellidae.

Hipoteza ovog rada je da je stopa metabolizma kod podzemnih vrsta i populacija niža od njihovih nadzemnih srodnika te da stopa metabolizma kod rakova iz porodice Asellidae ovisi o temperaturi, svjetlosnim uvjetima i spolu.

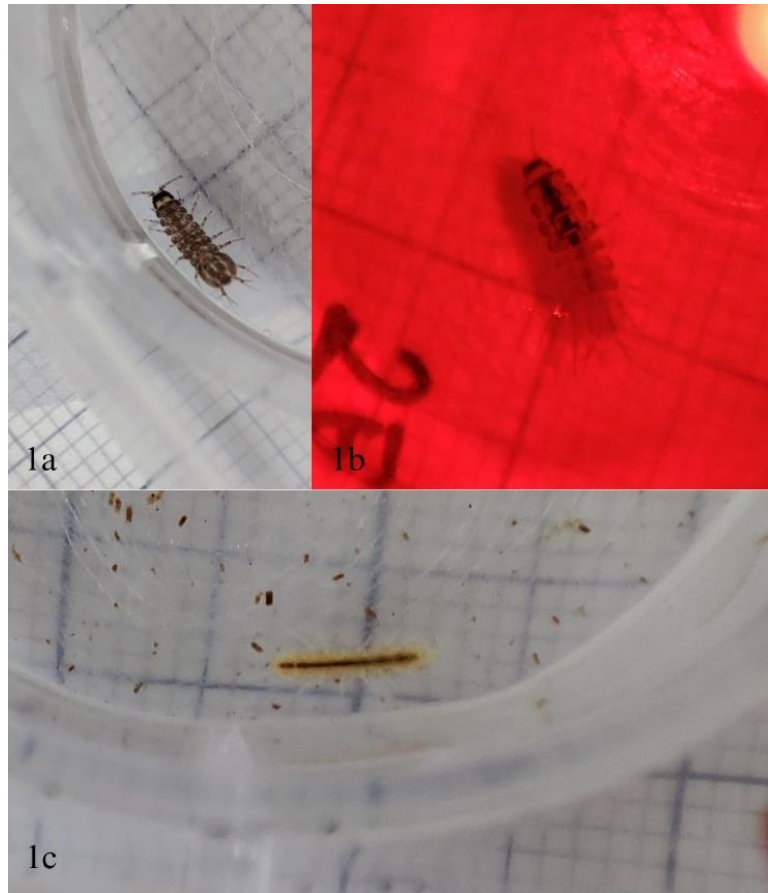
3. Materijali i metode

3.1. Eksperimentalne životinje

Podrijetlo životinja. Za provedbu cijelog istraživanja koristili smo organizme: *Asellus aquaticus*, *Proasellus coxalis* (Dollfus, 1892) i *Proasellus anophthalmus* (Karaman, 1934). Svi su rakovi prikupljeni od strane znanstvenika s Instituta Ruđer Bošković u periodu 2020. – 2022.:

- *Asellus aquaticus* prikupljen je iz ponora i potoka Sušik (Drežnica, Hrvatska) tijekom travnja, rujna i studenog 2021. i svibnja 2022., iz Planinske jame i s potoka Unica (Planina, Slovenija) tijekom travnja 2022., i iz špilje i potoka Lummelunda (otok Gotland, Švedska) tijekom kolovoza 2021. (Slika 1a);
- *Proasellus coxalis* prikupljen je iz lateralnog kanala Vranskog jezera (Vrana, Hrvatska) tijekom listopada 2020. (Slika 1b) i travnja 2022.;
- *Proasellus anophthalmus* prikupljen je iz Močiljske špilje (Dubrovnik, Hrvatska) tijekom travnja 2022. (Slika 1c).

Sve su životinje držane u laboratorijskim uvjetima opisanim u Lukić i sur. (2024).



Slika 1. a) Dio modelnih organizama korištenih u radu. *A. aquaticus* iz potoka Lummelunda. b) *P. coxalis* s Vranskog jezera, u uvjetima potpunog mraka. c) *P. anophthalmus* iz Močiljske špilje. Foto L. Tomić.

Laboratorijski uvjeti držanja životinja. S obzirom na uvjete svjetla i mraka u kojima su živjeli prikupljeni rakovi, u istraživanjima su se oponašali jednaki uvjeti. One eksperimentalne životinje koje su živjele u podzemnom staništu bile su izložene kontinuiranom mraku, odnosno *dark-dark* (DD) uvjetima. Oni rakovi koji su prikupljeni na nadzemnim staništima bili su izloženi izmjeni svjetlo – mrak, odnosno *light – dark* (LD) uvjetima. DD uvjeti podrazumijevali su boravak i pripremu životinja za istraživanje u potpunom mraku, u mračnoj sobi gdje je vidljivosti bila dostupna samo pomoću crvene svjetlosti. LD uvjeti podrazumijevali su period od dvanaest sati na svjetlu i period od dvanaest sati u potpunom mraku, prema Lukić i sur. (2024).

3.2. Pripreme za eksperimente i eksperimentalna procedura

Priprema životinja: 24 sata prije provođenja istraživanja postavila sam rakove u posudu s dvostrukim dnom (Lukić i sur. 2024) na gladovanje u inkubator. Prvo dno je mrežica promjera oka 0,5 x 0,5 mm koje omogućuje prolaz izmetu. Nakon 23 sata, rakove sam premjestila u plastične pločice sa 6 jažica. Ispod pločica stavila sam milimetarski papir te zasebno fotografirala rakove pametnim telefonom marke Xiaomi, model Redmi Note 10 Pro. Izmjerila sam duljinu i širinu tijela rakova (5. pereon) u aplikaciji ImageJ 1.53s. Rakove sam vagala nakon mjerenja potrošnje kisika tako što bi ih

prvo lagano posušila na upijajućem papiru i zatim položila na analitičku vagu Mettler Toledo Gold Balance JE155DUG/00. Vagala sam u dva navrata i koristila sam srednju vrijednost. Za rakove koji su uzgajani u DD uvjetima, sve se jednako pripremalo u mračnoj sobi te sam šprice, u kojima im je mjerena potrošnja kisika, zamotala aluminijskom folijom.

Priprema vode: Voda koju sam koristila za rakove bila je voda iz vodovoda pomiješana s RO vodom (eng. *reverse osmosis*) u omjeru 1:1 te autoklavirana (Lukić i sur. 2024). Barem 24 sata prije istraživanja stavila sam vodu na hlađenje u inkubator na temperaturu na kojoj će se odvijati istraživanje. Ohlađenu vodu aerirala sam ručno; tresla sam napola napunjenu posudu vodom minutu, otvorila poklopac da uđe svjež zrak i ponovno tresla minutu. Posudu s aeriranom vodom miješala sam na magnetnoj miješalici u inkubatoru na temperaturi istraživanja.

Eksperimentalne šprice: Koristila sam staklene šprice (FORTUNA® *Optima glass syringes with interchangeable components*), od dvadeset i trideset mililitara s plastičnim čepom. U šprice su pri dnu zalijepljene osjetilne točke (eng. *sensor spots*) koje mjere potrošnju kisika. S vanjske strane šprice, iza osjetilne točke, zalijepljen je prestrujnik za optička vlakna. S obzirom na to da su rakovima roda *Asellus* dužine tijela 5 - 10 mm, a mase 3 - 30 mg, stavljala sam ih u 5 ml vode. Rakovima roda *Proasellus* dužine tijela su 2 - 7 mm, a mase 1 - 9 mg i stavljala sam ih u 3 ml vode. U svakoj je šprici zalijepljena osjetilna točka koja sadrži svoj osjetilni kod. Kod se unosi u software i zapisuje na samu špricu, kako bi se uvijek podudaraao sa optičkim vlaknom koji će spojiti špricu s uređajem. Svaku špricu označila sam plastičnim vrpčama jedinstvenih boja.

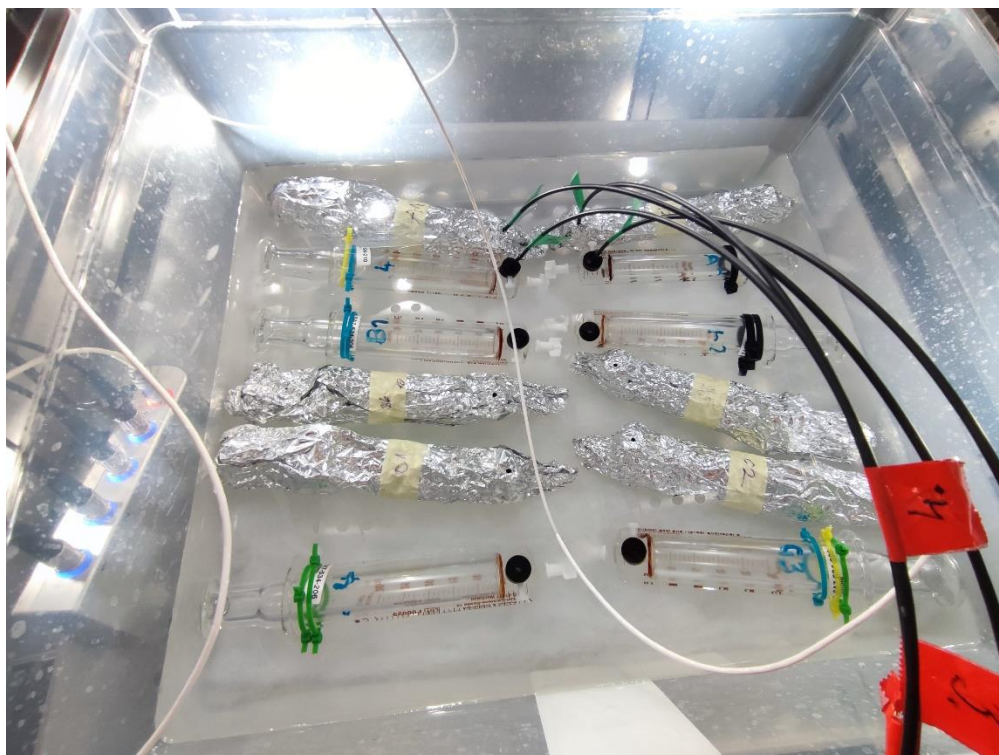
Nakon svakog završenog mjerenja potrošnje kisika, šprice sam oprala 70% etanolom kojeg sam ostavila jednu minutu i isprala RO vodom. Kamenac koji se vremenom nakupio na špricama i čepovima i otežavao otvaranje i zatvaranje, oprala sam alkoholnim octom. Kontaminaciju šprica bakterijama, koja je nastala tijekom provođenja istraživanja, tretirala sam antibioticima gentamicinom (konc. 25 µg/ml) i nalidiksičnom kiselinom (konc. 20 µg/ml). Nakon svakog čišćenja, šprice sam ostavila u mračnoj sobi jer se osjetilne točke razgrađuju na svjetlosti.

Vodene kupelji: Mjerenja potrošnje kisika trebaju se provoditi na što stabilnijim temperaturama pa sam koristila vodene kupelji u inkubatorima. Za svako mjerenje potrošnje kisika koristila sam po dvije plastične posude na čije sam dno stavila sintetičku vatu. Na vatu sam redom postavila šprice što omogućuje nepomičnost šprica i neometanje rakova tijekom mijenjanja optičkih vlakana na druge šprice. Vodene kupelji postavljala sam u inkubatore dan prije mjerenja potrošnje kisika radi postizanja željene temperature.

Respirometrija: Za provođenje mjerenja potrošnje kisika koristila sam uređaj PyroScience FireSting-O2 (4 channels), osjetilne točke (zalijepljeni unutar šprice) i osjetilni senzor FireSting za temperaturu, a mjerenja su rađena u programskom paketu PyroScience WorkBench. Uređaj sadrži četiri

kanala za četiri optička vlakna te je toliko uzoraka moguće mjeriti u istom trenutku. Pošto sam simultano mjerila uglavnom više od dvadeset rakova, podijelila sam ih u grupe. Svaka grupa sadrži po četiri šprice i svaka je lakom za nokte posebno označena brojem kanala i grupe. Kod i kanal na uređaju uvijek moraju biti točno spojeni onako kako je postavljeno u software-u, inače se mjerenje potrošnje kisika neće moći obaviti zbog neusklađenosti. Osjetilne točke ostavila sam na tvorničkim kalibracijama. Kompenzacijska temperatura mjeri se pomoću FireSting senzora za temperaturu, što je bijelo vlakno spojeno na uređaj i čiji je vrh uronjen u vodenu kupelj. Mjerenje potrošnje kisika provode četiri crna optička vlakna spojena s uređajem i čiji vrh ulazi u utor osjetilne točke na šprici. Mjerenje kisika obavlja se na način da optički kabel pet puta izbací svjetlosni signal tijekom deset minuta mjerenja, na početku i na kraju mjerenja od ukupno četiri sata. Svjetlosni signal očitat će udio kisika u vodi.

Procedura: Životinje sam postavljala u šprice, jednu po jednu te sam šprice zatvarala na način da unutra ne zaostaje niti jedan mjehurić zraka. Za istraživanje od dvadeset rakova postavila sam pet grupa, uključujući četiri kontrole (prazne šprice). Položila sam ih na sintetičku vatu u vodenu kupelj te zapisala točno vrijeme postavljanja svake životinje (Slika 2). Mjerenje potrošnje kisika počelo je nakon najmanje trideset minuta od postavljanja šprica na sintetičku vatu, kako bi se temperatura i potrošnja kisika stabilizirala. Cijela priprema životinja i postavljanje istih u vodenu kupelj, trajala je otprilike sat vremena.



Slika 2. Postavljene šprice na sintetičkoj vati, u vodenoj kupelji u inkubatoru, spojene na uređaj PyroScience FireSting-O4. Foto L. Tomić

3.3. Obrada podataka

Potrošnju kisika izračunala sam kao razliku prvog i drugog mjerenja. Dobiveni su podaci analizirani alometrijskom metodom (Elliott i sur. 1995). Potrošnja kisika iskazana je u mikrogramima; μg . Grafičke prikaze potrošnje kisika napravila sam pojedinačno za svako istraživanje, također u Microsoft Office Excel-u. Podatke sam statistički obradila pomoću programa JASP i Statistica 14, testovima Mann-Whitney U test i Kruskal-Wallis test.

3.4. Proces uhadavanja metode

Provedeni su pokusi uhadavanja da se utvrde optimalni uvjeti za mjerenje potrošnje kisika. Najprije se ispitaio utjecaj duljine mjerenja na potrošnju kisika, a zatim različiti volumeni vode u kojima će se mjerenje kisika odvijati. Ispitala se potrošnja kisika kod mužjaka i ženki te se provelo istraživanje potrošnje kisika uvjetima mraka i svjetla. Pokus koji je utvrdio osciliranje potrošnje kisika proveden je nad rakovima *A. aquaticus* (Sušik) u kontinuitetu od 6 sati. Pokus kojim se utvrdila duljina mjerenja potrošnje kisika proveden je nad rakovima *A. aquaticus* (Sušik) u kontinuitetu od 20 sati. Utjecaj različitih volumena vode na potrošnju kisika ispitan je nad rakovima *A. aquaticus* (Sušik) koji su bili postavljeni u volumene vode: 10 ml, 15 ml i 20 ml. Mjerenje potrošnje kisika trajalo je 16 sati. Proveden je pokus utjecaja različitih temperatura na potrošnju kisika. Potrošnja kisika ispitana je nad rakovima *A. aquaticus* i trajala je 6 sati. Potrošnja kisika kod suprotnih spolova izvedena je nad rakovima *A. aquaticus* i *P. coxalis*. Rakovima su se spolovi određivali nakon anestezije eugenolom koncentracije 0,37 $\mu\text{l/ml}$ za rod *Asellus* i 0,074 $\mu\text{l/ml}$ za rod *Proasellus* (Venarsky i Wilhelm, 2006). Nakon 15 minuta djelovanja anestetika, spolovi su određeni pod lupom. Probno istraživanje utjecaja mraka na potrošnju kisika ispitano je nad nadzemnim rakovima *A. aquaticus* (Sušik) u uvjetima volumena vode 5 ml i u trajanju od 4 sata.

3.5. Podzemne i nadzemne populacije rakova pripremljene za eksperiment 1

Provela sam ukupno 4 mjerenja potrošnje kisika na nadzemnim i podzemnim rakovima *A. aquaticus* s ponora i potoka Sušika. Tri su mjerenja potrošnje kisika napravljena nad uzorcima sakupljenima iz prirode i koji su u laboratorijskim uvjetima držani po 14 dana, 2 mjeseca i 1 godinu. Jedno mjerenje potrošnje kisika izmjereno je nad različitim laboratorijski uzgojenim generacijama (uzorak čini više pomiješanih generacija rakova) koje su godinu dana držane u laboratorijskim uvjetima (Tablica 1).

Mjerenje potrošnje kisika provedeno je i nad populacijom rakova *A. aquaticus* s potoka i ponora Lummelunda nad prvim laboratorijski uzgojenim generacijama, držanim 14 mjeseci u laboratorijskim uvjetima te nad populacijom rakova *A. aquaticus* iz Planinske jame i rijeke Unice nad uzorcima sakupljenima iz prirode, koji su u laboratorijskim uvjetima držani 5 dana (Tablica 1).

Posljednje, uspoređena je potrošnja kisika između podzemne vrste *P. anophthalmus* iz Močiljske špilje i nadzemne *P. coxalis* iz Vranskog jezera nad uzrocima sakupljenima iz prirode, koji su 6 mjeseci održavani u laboratorijskim uvjetima (Tablica 1).

Tablica 1. Prikaz usporednih istraživanja između nadzemnih i podzemnih svojti rakova. Izvorna generacija označava uzorak iz prirode nad kojim se vršilo mjerenje. Prva generacija označava prvi laboratorijski uzgojeni uzorak. Različite generacije označava više generacija pomiješanih u jedan uzorak. AASS – *A. aquaticus* sakupljen s potoka Sušik, AASC – *A. aquaticus* sakupljen s ponora Sušik, AALS – *A. aquaticus* sakupljen s potoka Lummelunda, AALC – *A. aquaticus* sakupljen s ponora Lummelunda, AAPS – *A. aquaticus* sakupljen iz rijeke Unice, AAPC – *A. aquaticus* sakupljen iz Planinske jame. PAMO – *P. anophthalmus* sakupljen iz Močiljske špilje, PCVR – *P. coxalis* sakupljen iz Vranskog jezera.

USPOREDBA	VRSTA/E	LOKALITET(I)	VRIJEME PROVEDENO U LABORATORIJSKIM UVJETIMA	GENERACIJA	DATUM MJERENJA
AASS vs. AASC	<i>A. aquaticus</i>	Sušik potok vs. Sušik ponor	14 dana	Izvorna generacija	29.11.2022., 30.11.2022.
AASS vs. AASC	<i>A. aquaticus</i>	Sušik potok vs. Sušik ponor	2 mjeseca	Izvorna generacija	19.12.2023, 20.12.2023., 28.12.2023.
AASS vs. AASC	<i>A. aquaticus</i>	Sušik potok vs. Sušik ponor	1 godina	Izvorna generacija	4.10.2022.
AASS vs. AASC	<i>A. aquaticus</i>	Sušik potok vs. Sušik ponor	1 godina	Različite generacije	16.9.2022.
AALS vs. AALC	<i>A. aquaticus</i>	Lummelunda potok vs. Lummelunda ponor	14 mjeseci	Prva generacija	5.10.2022., 6.10.2022.
AAPS vs. AAPC	<i>A. aquaticus</i>	rijeka Unica vs. Planinska jama	5 dana	Izvorna generacija	2.11.2022., 3.11.2022.
PAMO vs. PCVR	<i>P. anophthalmus</i> vs. <i>P. coxalis</i>	Močiljska špilja vs. Vransko jezero	6 mjeseci	Izvorna generacija	19.10.2022., 20.10.2022.

3.6. Podzemne i nadzemne populacije rakova pripremljene za eksperiment 2

Utjecaj mraka na potrošnju kisika istražen je na:

1. nadzemnoj populaciji rakova *A. aquaticus* (AASS) između prve generacije rakova uzgojenih u laboratorijskim uvjetima potpunog mraka (DD) i u izmjeni svjetla i mraka (LD);

2. kod nadzemne populacije rakova *A. aquaticus* s potoka Lummelunda (AALS) između prve generacije rakova uzgajanih u laboratorijskim uvjetima potpunog mraka (DD) i u izmjeni svjetla i mraka (LD);

3. kod nadzemne populacije rakova *P. coxalis* iz Vranskog jezera (PCVR) između prve generacije rakova uzgajanih u laboratorijskim uvjetima potpunog mraka (DD) i u izmjeni svjetla i mraka (LD) (Tablica 2).

Također, istražen je utjecaj svjetla na potrošnju kisika kod podzemne populacije rakova *A. aquaticus* s ponora Sušik (AASC) između prve generacije rakova uzgajanih u laboratorijskim uvjetima potpunog mraka (DD) i u izmjeni svjetla i mraka (LD) (Tablica 2).

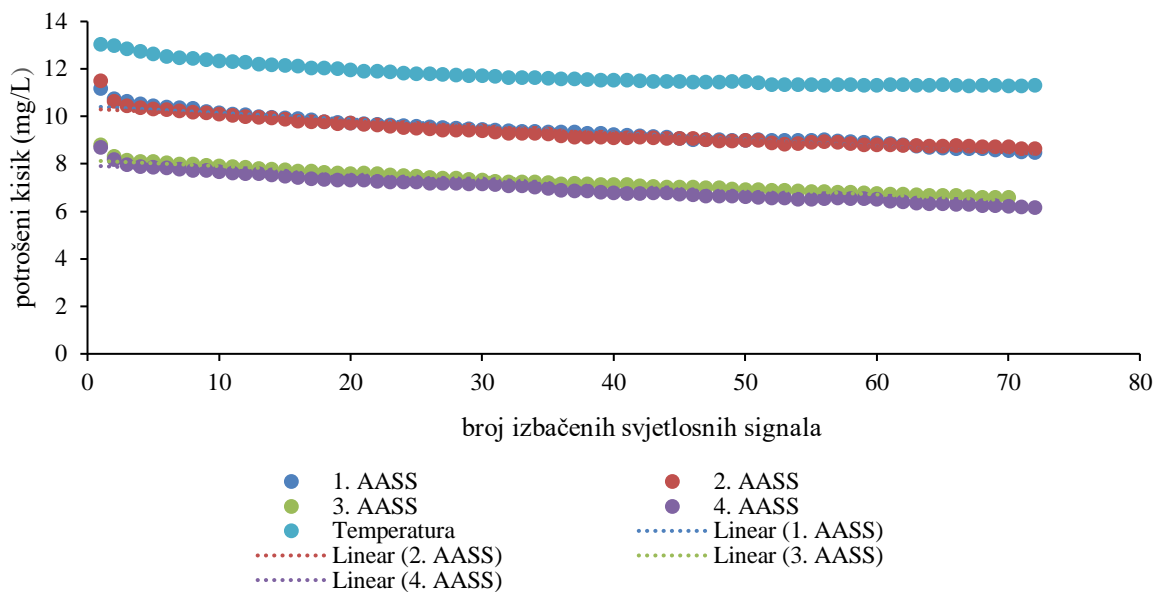
Tablica 2. Prikaz usporednih istraživanja na svojstama rakova pri različitim svjetlosnim uvjetima. Prva generacija označava prvi laboratorijski uzgojeni uzorak. AASS – *A. aquaticus* prokupljen s potoka Sušik, AALS – *A. aquaticus* prikupljen s potoka Lummelunda, PCVR – *P. coxalis* iz Vranskog jezera, LD – laboratorijski uvjeti izmjene svjetla i mraka, DD – laboratorijski uvjeti potpunog mraka.

USPOREDBA	VRSTA	ISPITIVANJE UTJECAJA	LOKALITET(I)	VRIJEME PROVEDENO U LABORATORIJSKIM UVJETIMA	GENERACIJA	DATUM MJERENJA
AASS LD vs. AASS DD	<i>A. aquaticus</i>	utjecaj mraka	potok Sušik	19 mjeseci	Prva generacija	23.9.2022., 26.9.2022.
AALS LD vs. AALS DD	<i>A. aquaticus</i>	utjecaj mraka	potok Lummelunda	13 mjeseci	Prva generacija	28.9.2022., 29.9.2022.
PCVR LD vs. PCVR DD	<i>P. coxalis</i>	utjecaj mraka	Vransko jezero	2 godine	Prva generacija	11.10.2022., 12.10.2022.
AASC LD vs. AASC DD	<i>A. aquaticus</i>	utjecaj svjetla	ponor Sušik	2 mjeseca	Prva generacija	21.12.2022., 22.12.2022.

4. Rezultati

4.1. Uvodavanje metode

Slika 3. prikazuje oscilacije potrošenog kisika tijekom kontinuiranog mjerenja. Potrošnja kisika izmjerena je na rakovima *A. aquaticus* s potoka Sušik u trajanju od 6 sati. Rezultati su pokazali da su vrijednosti potrošenog kisika tijekom prvih 20 minuta (4 mjerenja) značajno pali za vrijeme ujednačavanja temperature. Stoga smo zaključili kako je mjerenje potrebno započeti najmanje pola sata od postavljanja eksperimenta. Nadalje, utvrdili smo da je potrošnja kisika bila bez fluktuacija tijekom cijelog daljnjeg razdoblja te smo zaključili da nije neophodno provoditi kontinuiranja mjerenja već da je dovoljno mjeriti na početku i na kraju eksperimenta, u oba slučaja u trajanju od 10 minuta. Na taj način smanjili smo prekomjerno osvjetljavanje jedinki koje obitavaju u mraku, budući da se svako mjerenje provodi pomoću svjetlosnog signala koji osvjetljava životinju. Dodatno, omogućili smo mjerenje većeg broja jedinki u isto vrijeme, budući da uređaj može mjeriti paralelno četiri uzorka. Ovim eksperimentom smo dodatno utvrdili da je 4 sata trajanja pokusa dovoljno kako bi se utvrdila potrošnja kisika pojedine jedinke te smo to vrijeme koristili za sve ostale pokuse.

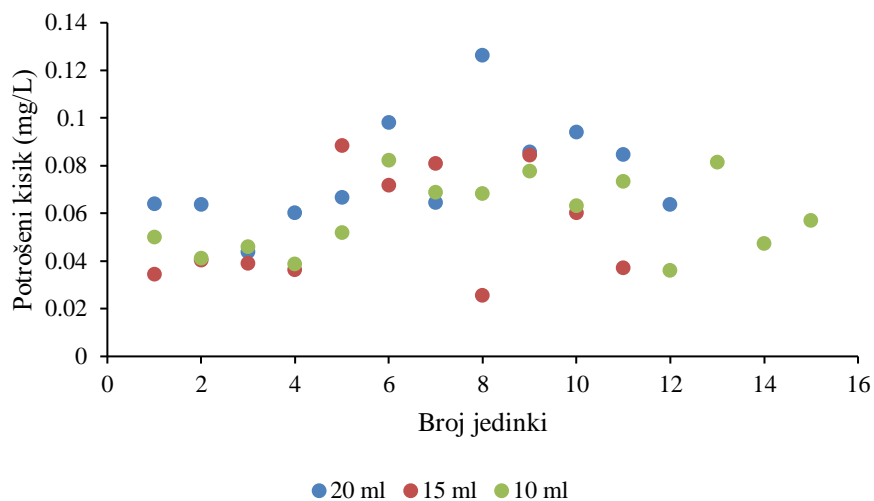


Slika 3. Odnos potrošnje kisika i duljine trajanja mjerenja na rakovima *A. aquaticus* s potoka Sušik, $N(\text{AASS}) = 4$.

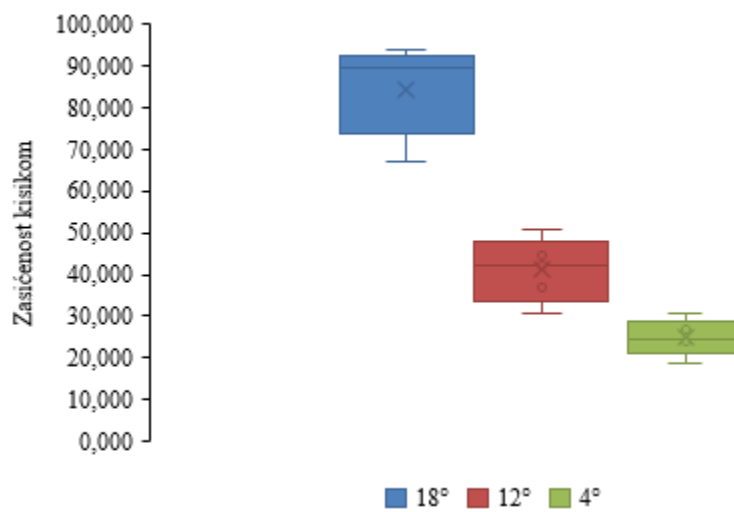
Na Slici 4. prikazani su rezultati pokusa gdje smo mjerili postoji li razlika u potrošnji kisika u odnosu na različite volumene vode u kojima su rakovi držani za vrijeme eksperimenta. Potrošnja kisika nije pokazivala nikakve korelacije niti grupiranja u odnosu na različite volumene vode te smo za sve ostale pokuse rakove mjerili u volumenu od 5 ml.

Istražila sam i ovisnost stope metabolizma o temperaturi. Slika 5. prikazuje rezultate pokusa utjecaja različitih temperatura na potrošnju kisika kod rakova *A. aquaticus* s potoka Sušik (AASS). Najviše su kisika potrošili na najvišoj temperaturi, 18° C, dok su oni na najmanjoj temperaturi, 4° C, potrošili najmanje kisika (Slika 15). Pri temperaturi od 4° C dobiveno je najmanje raspršenje rezultata izmjere kisika, dok je na 18° C najveće. Ovime se dokazalo koliko je bitna konstanta temperature u vidu stope metabolizma. Rakovima roda *Asellus* potrošnja kisika mjerila se na 12°C, a rakovima roda *Proasellus* na 15°C, što su temperature u kojima su održavani u laboratorijskim uvjetima.

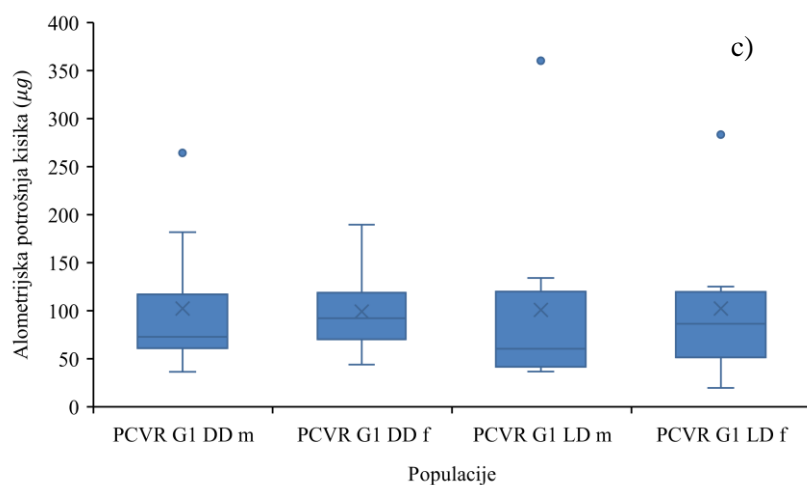
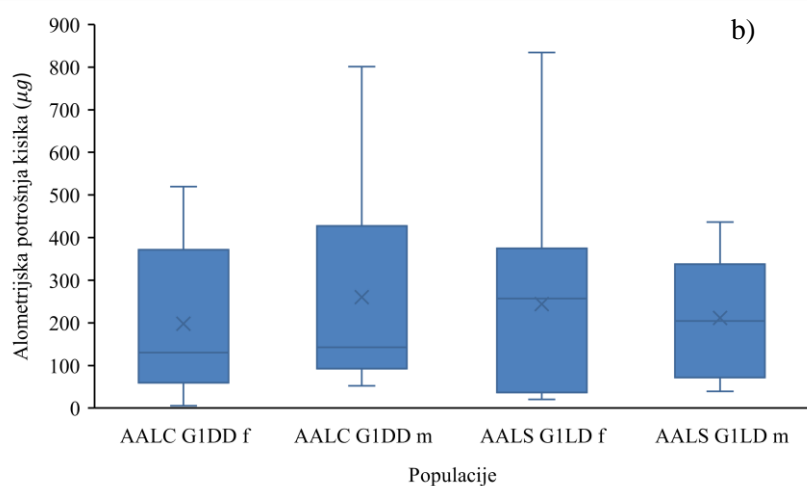
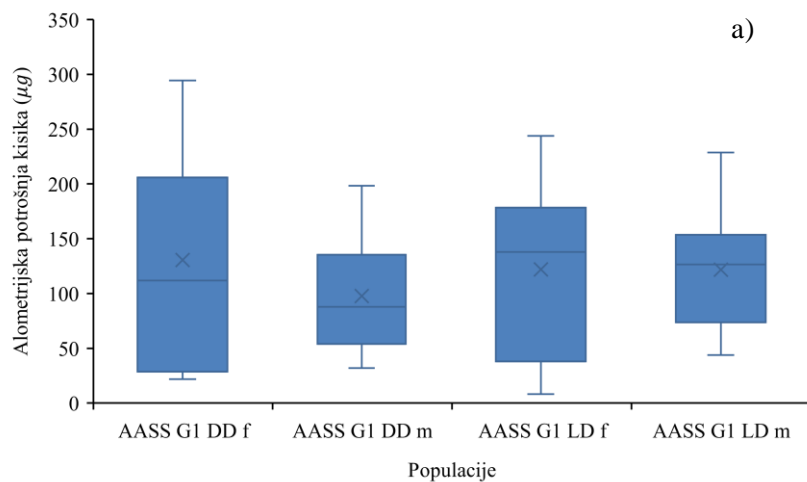
Također, prije provođenja glavnih eksperimenata, proveli smo izraživanje u kojem sam htjela utvrditi postoje li razlike u stopi metabolizma između mužjaka i ženki iste vrste. Rezultati su prikazani na Slici 6. Nije bilo statistički značajne razlike u respirometriji između mužjaka i ženki (Kruskal-Wallis test, $p > 0,05$), neovisno o vrsti i lokaciji (Slika 5).



Slika 4. Utjecaj različitih volumena vode na potrošnju kisika kod rakova vrste *A. aquaticus* s potoka Sušik. Potrošnja kisika izmjerena je pri 19°C, u volumenima: 20 ml, 15 ml i 10 ml. $N(20 \text{ ml}) = 12$, $N(15 \text{ ml}) = 11$, $N(10 \text{ ml}) = 15$.

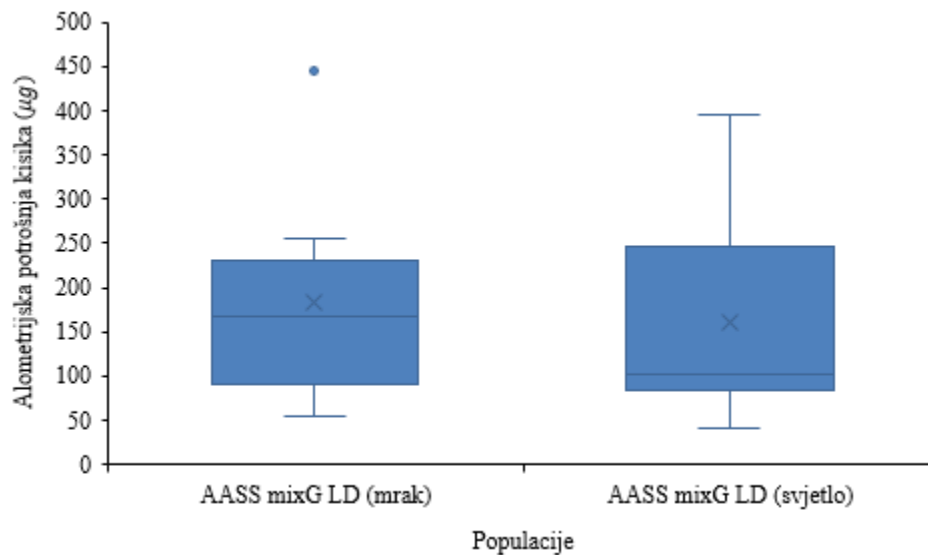


Slika 5. Utjecaj različitih temperatura na potrošnju kisika kod vrste *A. aquaticus* iz potoka Sušik, prikupljeni 28.4.2021. Zasićenost kisikom je napravljeno na jedinkama prikupljenima u prirodi, u uvjetima svjetla. $N(18^{\circ}\text{C}) = 5$, $N(12^{\circ}\text{C}) = 5$, $N(4^{\circ}\text{C}) = 5$.



Slika 6. Potrošnja kisika kod mužjaka (m) i ženki (f) rakova *A. aquaticus* s potoka i ponora Sušik (AASS, AASC) i potoka i ponora Lummelunda (AALS, AALC) te kod rakova *P. coxalis* s Vranskog jezera (PCVR). Potrošnje kisika izmjerene su na prvim laboratorijskim uzgojenim generacijama (G1), u uvjetima potpunog mraka (DD) i izmjeni svjetla i mraka (LD).

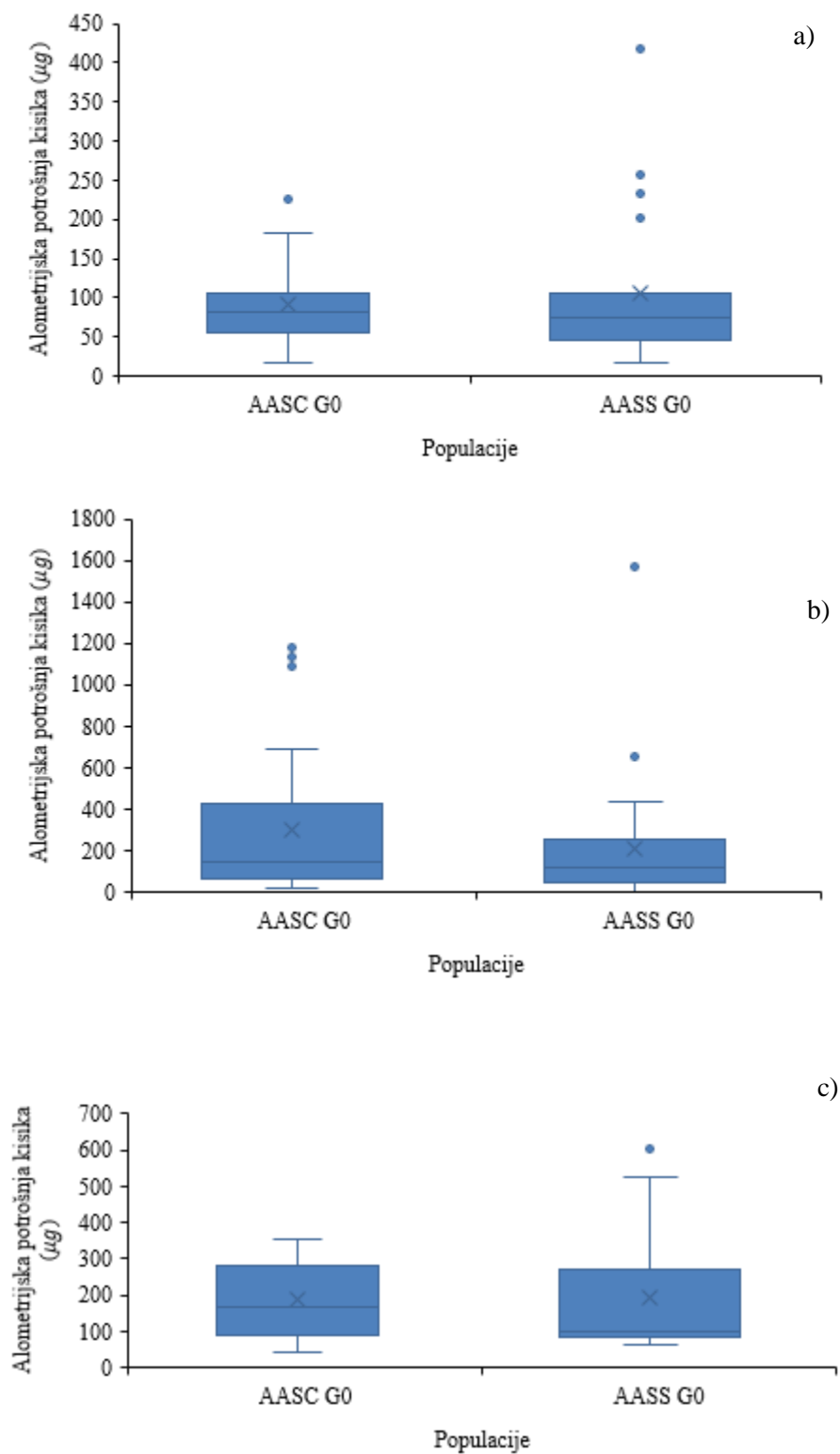
U probnom istraživanju utjecaja svjetla odnosno mraka na potrošnju kisika kod nadzemne populacije rakova *A. aquaticus* s potoka Sušik (AASS), nije se pokazala razlika (Slika 7). Stoga smo zaključili kako mjerenje u različitim svjetlosnim uvjetima ne utječe na rezultate eksperimenta te smo u daljnjim istraživanjima životinje koje obitavaju u uvjetima svjetlo/mrak (LD) mjerili na svjetlu, dok smo životinje koje obitavaju u uvjetima mrak/mrak (DD) mjerili u mraku. Željeli smo izbjeći promjenu svjetlosnih uvjeta na organizme tijekom eksperimenta.



Slika 7. Utjecaj svjetla/mraka na potrošnju kisika kod rakova vrste *A. aquaticus*, s potoka Sušik (AASS). Potrošnja kisika je izmjerena na različitim laboratorijski uzgojenim generacijama (mixG), prikupljenima 10.9.2021., godinu dana održavanim u uvjetima izmjene svjetla i mraka (LD). (mrak) označava mjerenje potrošnje kisika u uvjetima mraka, (svjetlo) označava mjerenje potrošnje kisika u uvjetima svjetla. $N(\text{AASS mixG LD (mrak)}) = 10$, $N(\text{AASS mixG LD (svjetlo)}) = 10$.

4.2. Usporedba potrošnje kisika podzemnih i nadzemnih populacija rakova

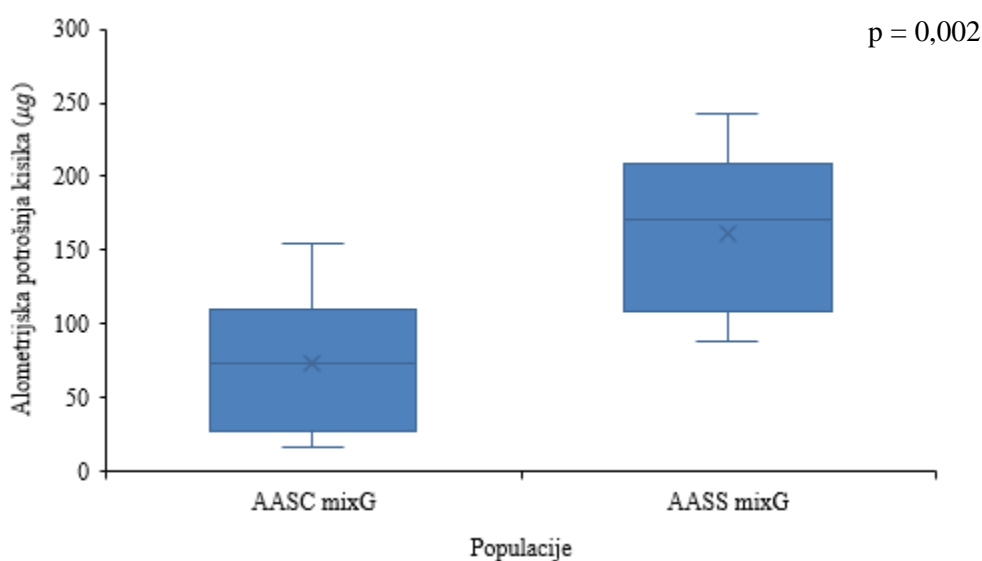
Rezultati usporedbe potrošnje kisika između podzemne populacije (AASC) i nadzemne populacije (AASS) rakova vrste *A. aquaticus* (ponor i potok Sušik) su prikazani na Slici 8. Nije bilo statistički značaje razlike između nadzemnih i podzemnih populacija rakova neovisno o vremenu u kojem su rakovi proveli u laboratorijskim uvjetima (Mann-Whitney U test: $p > 0,005$).



Slika 8. Usporedba potrošnje kisika između podzemne (AASC) i nadzemne populacije (AASS) rakova vrste *A. aquaticus* s ponora i potoka Sušik. Potrošnja kisika izmjerena je na jedinkama sakupljenim u prirodi (G0). Podzemna populacija održavana je u uvjetima potpunog mraka, a nadzemna u uvjetima izmjene svjetla i mraka. a) životinje održavane 14 dana u laboratorijskim uvjetima, $N(\text{AASC G0}) = 18$, $N(\text{AASS G0}) = 20$; b) životinje

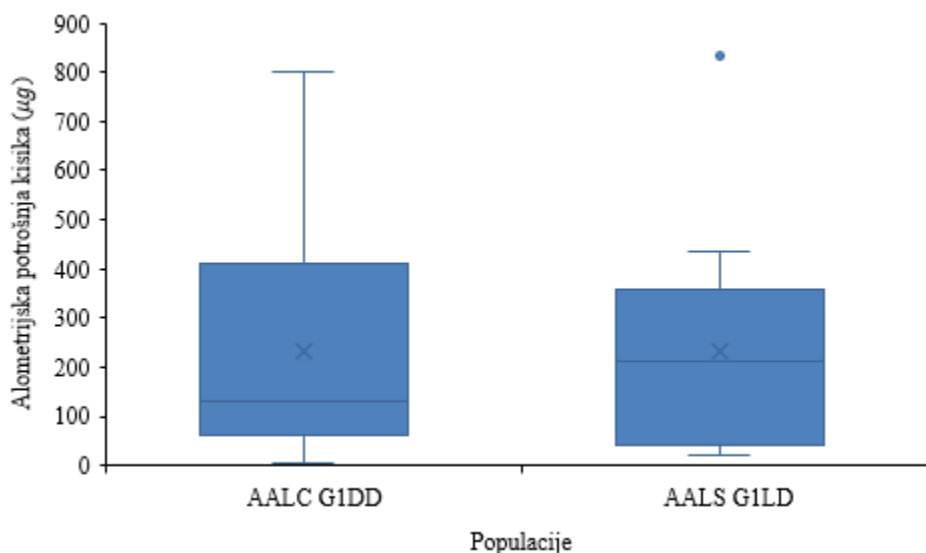
održavane 2 mjeseca u laboratorijskim uvjetima, N(AASC G0) = 28, N(AASS G0) = 29; c) životinje održavane 1 godinu u laboratorijskim uvjetima, N(AASC G0) = 10, N(AASS G0) = 10.

Statistički značajna razlika u potrošnji kisika (Mann-Whitney U test; $p = 0,002$), zabilježena je između podzemnih (AASC) i nadzemnih rakova (AASS) vrste *A. aquaticus* ponora i potoka Sušik, koje sam provela na laboratorijski uzgajanim različitim generacijama (Slika 9). Podzemne jedinke imaju nižu stopu metabolizma od nadzemnih jedinki.

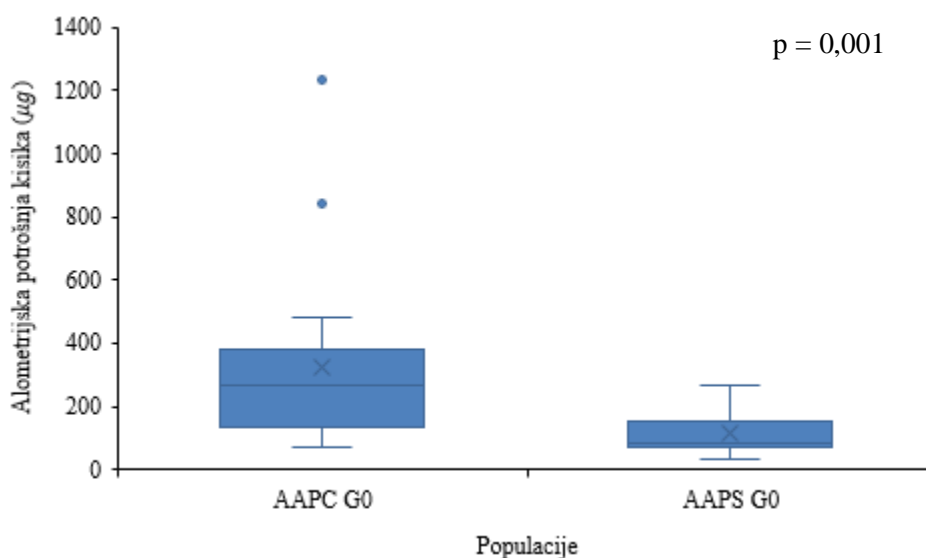


Slika 9. Usporedba potrošnje kisika između podzemne (AASC) i nadzemne populacije (AASS) rakova vrste *A. aquaticus* s ponora i potoka Sušik. Potrošnja kisika izmjerena je na laboratorijski uzgajanim različitim generacijama (mixG). Podzemne populacije držane su u potpunom mraku, a nadzemne su izložene izmjeni svjetla i mraka. N(AASC mix G) = 10, N(AASS mixG) = 10.

U istraživanju potrošnje kisika između špiljske populacije (AALC) i nadzemne populacije (AALS) rakova *A. aquaticus* (s potoka i ponora Lummelunda), nije se pokazala statistički značajna razlika (Slika 10). Nema razlike u stopama metabolizma između špiljske i nadzemne populacije (Mann-Whitney U test, $p = 0,885$).



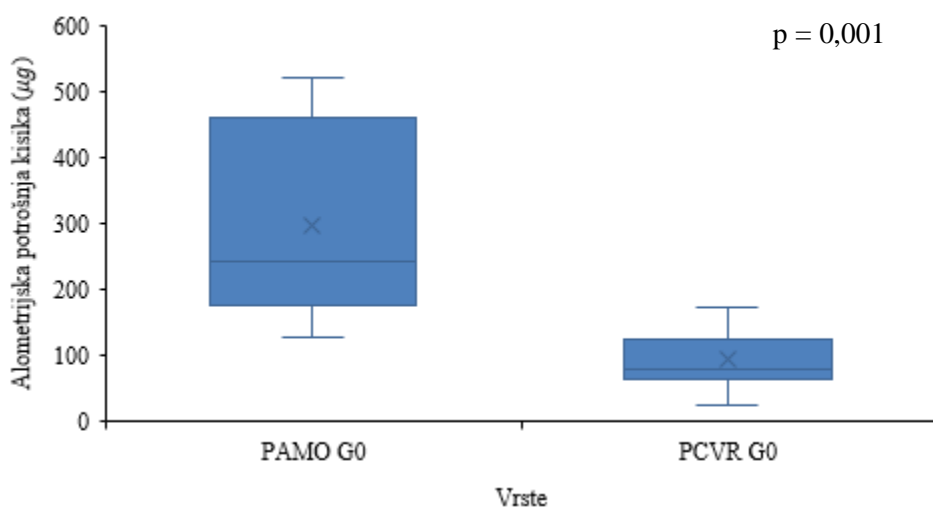
Slika 10. Usporedba potrošnje kisika između podzemne (AALC) i nadzemne (AALS) populacije rakova vrste *A. aquaticus* s ponora i potoka Lummelunda. Potrošnja kisika izmjerena je na prvim laboratorijski uzgojenim generacijama (G1) koje su laboratorijski održavane 14 mjeseci. Podzemne populacije održavane su u uvjetima potpunog mraka, a nadzemne u uvjetima izmjene svjetla i mraka. $N(\text{AALC G1}) = 19$, $N(\text{AALS G1}) = 19$.



Slika 11. Usporedba potrošnje kisika između podzemne (AAPC) i nadzemne populacije (AAPS) rakova vrste *A. aquaticus* iz rijeke Unice i Planinske jame. Potrošnja kisika izmjerena je na jedinkama sakupljenim u prirodi (G0), koje su 5 dana održavane u laboratorijskim uvjetima. Podzemne populacije održavane su u uvjetima potpunog mraka, a nadzemne u uvjetima izmjene svjetla i mraka. $N(\text{AAPC G0}) = 20$, $N(\text{AAPS G0}) = 19$.

Usporedbom potrošnje kisika kod rakova vrste *A. aquaticus* između populacije izvorne špiljske generacije (AAPC G0) i populacije izvorne nadzemne generacije (AAPS G0) (iz Planinske jame i rijeke Unice), dokazala se statistički značajna razlika (Slika 11). Jedinke iz špilje troše više kisika od nadzemnih jedinki, dakle, špiljska populacija ima višu stopu metabolizma od nadzemne populacije (Mann-Whitney U test, $p < 0.001$).

Istraživanje potrošnje kisika između izvorne generacije špiljskih rakova vrste *P. anophthalmus* (Močiljska špilja, PAMO G0) i izvorne generacije nadzemnih rakova vrste *P. coxalis* (Vransko jezero, PCVR G0) pokazalo je da postoji statistički značajna razlika (Mann-Whitney U test, $p < 0.001$; Slika 12). Špiljski rakovi *P. anophthalmus* troše više kisika od nadzemnih rakova *P. coxalis*, stoga špiljska vrsta ima višu stopu metabolizma od nadzemne vrste.

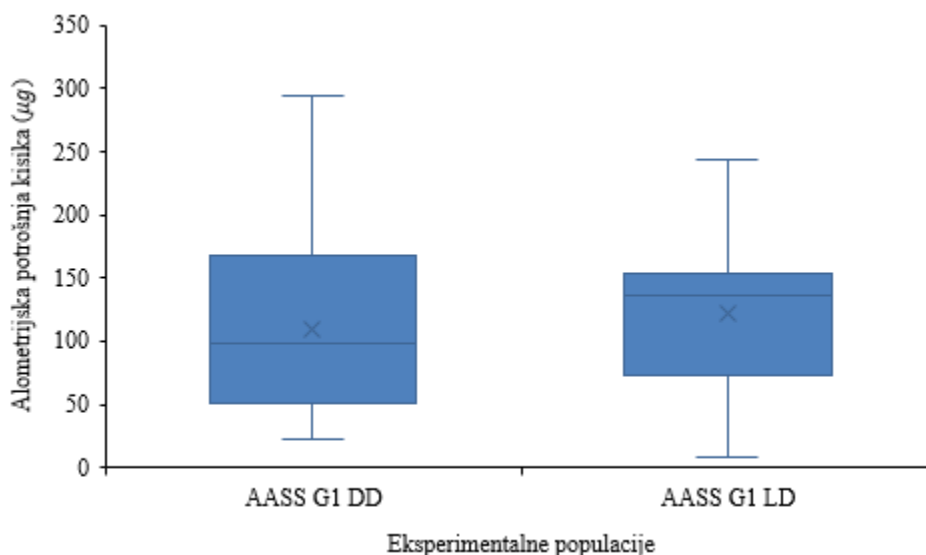


Slika 12. Usporedba potrošnje kisika između podzemne vrste *P. anophthalmus*, iz Močiljske špilje (PAMO), i nadzemne vrste rakova *P. coxalis*, iz Vranskog jezera (PCVR). Potrošnja kisika izmjerena je na jedinkama sakupljenim u prirodi (G0) koje su 6 mjeseci održavane u uvjetima izmjene svjetla i mraka. $N(\text{PAMO G0}) = 18$, $N(\text{PCVR G0}) = 19$.

4.3. Utjecaj mraka na potrošnju kisika

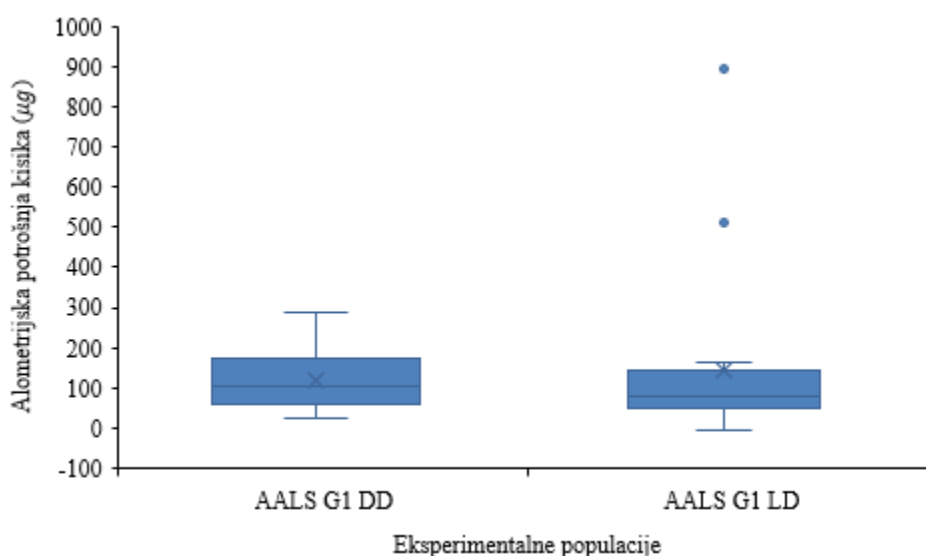
4.3.1. Utjecaj mraka na potrošnju kisika kod nadzemnih populacija rakova

Istraživanje utjecaja mraka na potrošnju kisika na nadzemnim populacijama rakovima *A. aquaticus* (AASS) s potoka Sušik, nije pokazao statistički značajne rezultate (Mann-Whitney U test, $p = 0,398$; Slika 13). Rakovi koji su održavani u uvjetima potpunog mraka nisu značajno različito potrošili količinu kisika u usporedbi s rakovima koji su održavani na izmjeni svjetla i mraka.



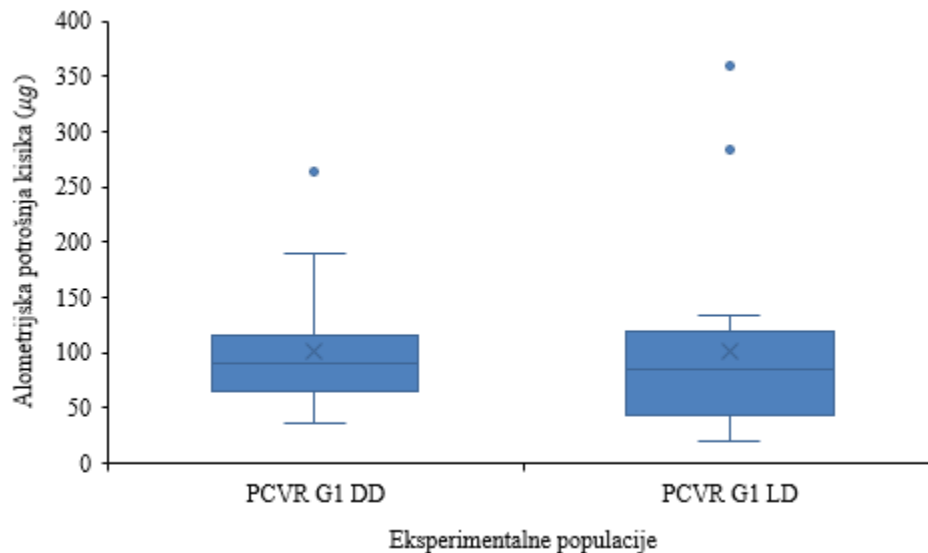
Slika 13. Utjecaj mraka na potrošnju kisika kod nadzemnih populacija rakova vrste *A. aquaticus* s potoka Sušik (AASS). Potrošnja kisika izmjerena je na prvoj laboratorijski uzgojenoj generaciji (G1) održavanoj 19 mjeseci u uvjetima potpunog mraka (DD) i izmjene svjetla i mraka (LD). $N(\text{AASS G1 DD}) = 20$, $N(\text{AASS G1 LD}) = 20$.

U usporednom istraživanju utjecaja mraka na potrošnju kisika na nadzemnim rakovima vrste *A. aquaticus*, s potoka Lummelunda (AALS), također nije se pokazala statistički značajna razlika (Slika 14). Nadzemni rakovi uzgajani na izmjeni svjetla i mraka nisu potrošili različite količine kisika od nadzemnih rakova uzgajanih u potpunom mraku (Mann-Whitney U test; $p = 0,398$).



Slika 14. Utjecaj mraka na potrošnju kisika kod nadzemnih populacija rakova vrste *A. aquaticus* iz potoka Lummelunda (AALS). Potrošnja kisika izmjerena je na prvoj laboratorijski uzgojenoj generaciji (G1) održavanoj 13 mjeseci u uvjetima potpunog mraka (DD) i izmjene svjetla i mraka (LD). $N(\text{AALS G1 DD}) = 20$, $N(\text{AALS G1 LD}) = 20$.

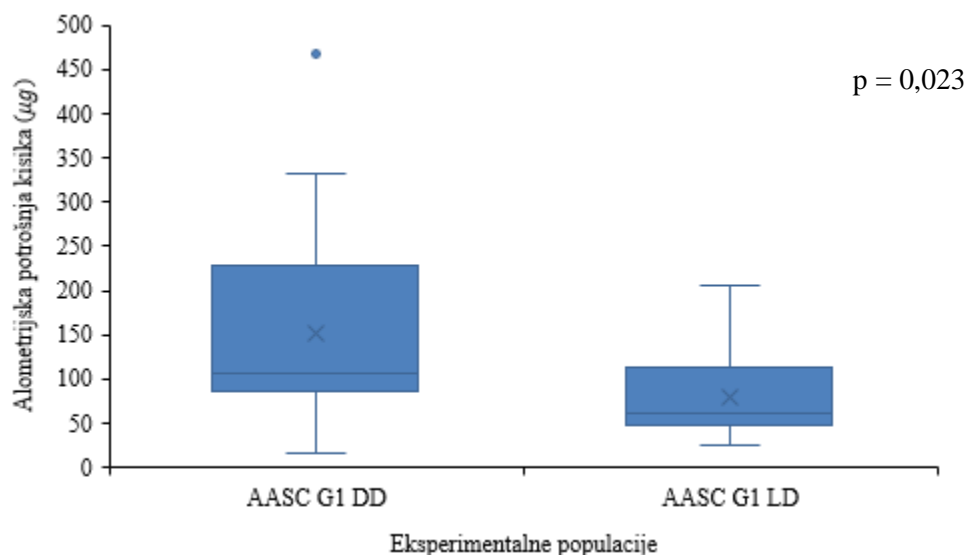
U usporednom istraživanju utjecaja mraka na potrošnju kisika na nadzemnim rakovima vrste *P. coxalis* (PCVR), kod prve uzgojene generacije (G1), nije se pokazala razlika (Slika 15). Nadzemni rakovi uzgajani na izmjeni svjetla i mraka ne troše više kisika od nadzemnih rakova uzgajanih u mraku (Mann-Whitney U test; $p = 0,565$).



Slika 15. Utjecaj mraka na potrošnju kisika kod nadzemnih populacija rakova vrste *P. coxalis* s Vranskog jezera (PCVR). Potrošnja kisika izmjerena je na prvoj laboratorijskoj uzgojenoj generaciji (G1) održavanoj 2 godine u uvjetima potpunog mraka (DD) i izmjene svjetla i mraka (LD). $N(\text{PCVR G1 DD}) = 20$, $N(\text{PCVR G1 LD}) = 20$.

4.3.2. Utjecaj svjetla na potrošnju kisika kod podzemnih populacija rakova

Istraživanje utjecaja svjetla na potrošnju kisika na podzemnim rakovima *A. aquaticus*, s ponora Sušik (AASC), pokazao je razliku u potrošnji kisika (Slika 16). Podzemni rakovi održavani na izmjeni svjetla i mraka potrošili su značajno manje kisika od rakova održavanih u potpunom mraku.



Slika 16. Utjecaj svjetla na potrošnju kisika kod podzemnih populacija rakova vrste *A. aquaticus* s ponora Sušik (AASC). Potrošnja kisika izmjerena je na prvoj laboratorijski uzgojenoj generaciji (G1), dva mjeseca održavanoj u uvjetima izmjene svjetla i mraka (LD), i potpunog mraka (DD). $N(\text{AASC G1 LD}) = 20$, $N(\text{AASC G1 DD}) = 20$.

5. Rasprava

U podzemnim staništima nedostatak svjetla prvi je limitirajući faktor na koji su se organizmi prilagodili kako bi opstali u takvom ekstremnom staništu. Ta su staništa u većini slučajeva oskudna hranom te su špiljski organizmi prilagodili i svoj metabolizam na takve uvjete. Jedna od prilagodbi smanjena je potrošnja kisika (Venarsky i sur. 2014, Culver i Pipan 2014). Ovo istraživanje pokazalo je da u većini slučajeva nema razlika u stopama metabolizma kod proučavanih populacija podzemnih i nadzemnih rakova, bez obzira na vrijeme koje su rakovi proveli u laboratorijskim uvjetima. U tri istraživanja nadzemnih i podzemnih populacija *A. aquaticus* s lokacije Sušik nije se dokazala razlika u potrošnji kisika. Razlog tome može biti što podzemne populacije nisu u punom smislu troglomorfne te su zadržale karakteristiku nadzemnih, koje troše više kisika. Isto tako može se objasniti i jednaka stopa metabolizma kod nadzemnih i špiljskih rakova *A. aquaticus* s lokacije Lummelunda. Istraživanje potrošnje kisika između različitih generacija podzemne i nadzemne populacije rakova *A. aquaticus* s potoka i ponora Sušik dokazalo je da podzemna populacija značajno manje troši kisika. Isto su potvrdili Simčić i Sket (2019) koji su uspoređivali potrošnju kisika između nadzemnog *A. a. carniolicus* i špiljskog raka *A. a. cavernicolus* pri 20° C. Iako je ovaj rezultat očekivan i potvrđuje hipotezu rada, nije relevantan jer su se uspoređivale različite generacije.

Rezultat koji nije bio očekivan je da generacija podzemne populacije rakova *A. aquaticus*, prikupljena iz Planinske jame, pet dana održavana u laboratorijskim uvjetima, troši više kisika od jednako održavane generacije nadzemne populacije s rijeke Unice, koja ponire u Planinsku jamu. Također neočekivani

rezultat je da generacija podzemne vrste *P. anophthalmus*, prikupljena u prirodi iz Močiljske špilje i održavana pola godine u laboratorijskim uvjetima, troši više kisika od jednako održavane generacije nadzemne vrste *P. coxalis* prikupljene s Vranskog jezera. Oba zanimljiva rezultata nisu očekivana jer se smatra da podzemni organizmi, u usporedbi s nadzemnim srodnicima, imaju snižene stope metabolizma, što je prilagodba na manje dostupnog kisika i hrane u špiljama (Hervant i sur. 1997, Hervant i Renault 2002, Culver i Pipan 2009, Jemec i sur. 2017, White i sur. 2019). Razlog ovom trendu mogao bi biti što se podzemni rakovi još prilagođavaju uvjetima oskudnijeg kisika u špiljama i moraju uložiti više energije kako bi došli do potrebne količine kisika. Dodatno, *P. anophthalmus* nema vanjskog bliskog srodnika pa je vrsta uspoređena s *P. coxalis*, iako su te vrste filogenetski udaljene.

U pokusima nad populacijama nadzemnih rakovima *A. aquaticus* s potoka Sušika koji su bili kratkoročno (5 sati) i dugoročno (19 mjeseci) izloženi mraku nije zabilježena promjena u potrošnji kisika. Nadzemni rakovi nisu ispoljili nikakve prilagodbe na promjenjene ekološke uvjete (tama) jer je vremenski period bio prekratak za uvidjeti ikakve promjene u metabolizmu. Na jednaki način možemo objasniti utjecaj dugoročnog mraka na *A. aquaticus* na nadzemne populacije potoka Lummelunda. U istraživanju utjecaja svjetla na potrošnju kisika kod podzemnih rakova *A. aquaticus* s ponora Sušik (prva laboratorijski uzgojena generacija na izmjeni svjetla i mraka) neočekivan je rezultat da su rakovi održavani na izmjeni svjetla i mraka trošili znatno manje kisika. Prva generacija podzemnih populacija rakova iz ponora Sušik koje su laboratorijski održavane na izmjeni svjetla i mraka trošila je znatno manje kisika u odnosu na istu populaciju održavanu u potpunom mraku, što je bio neočekivani rezultat. To možemo objasniti time da su populacije rakova izložene novim uvjetima (izmjena svjetla i mraka) doživjele stres i smanjile potrošnju energije kao obrambeni mehanizam na novonastale uvjete (Bergstedt i sur. 2021). Navedene metaboličke promjene podzemnih populacija (koje su održavane na izmjeni svjetla i mraka i one održavane u potpunom mraku) ukazuju da one posjeduju fenotipsku plastičnost u novim okolišnim uvjetima.

U istraživanju utjecaja različitih temperatura na potrošnju kisika kod raka *A. aquaticus* prikupljenog s potoka Sušik, pokazalo se da se povećanjem temperature (temperature: 4°, 12° i 18°C) povećava i potrošnja kisika. Isti je trend dobiven u istraživanju Edwards i Learner (1960) koji su zaključili da *A. aquaticus* 1,5 puta brže troši kisika na 20° C u usporedbi s potrošnjom na 10° C. Slično su zaključili Simčić i Sket (2019), potrošnja kisika povećala se rastom temperature (temperaturni raspon: 10° - 20° C) individualno kod nadzemnog (*A. a. carniolucus*) i kod špiljskog raka (*A. a. cavernicolus*). Suprotno rezultatu ovoga rada, rad Di Lorenzo i Reboleira (2022) pokazao je da pri nižim temperaturama stigobiontski rak *P. lusitanicus* (Frade 1938) troši više kisika nego na višim temperaturama (temperaturni raspon: 17° - 22,5° C).

Razlika u spolu, duljina mjerenja potrošnje kisika i različiti volumeni nisu značajno utjecali na potrošnju kisika kod rakova.

Rakovi u intersticijskim staništima mogu regulirati stopu metabolizma mijenjajući ventilacijsku aktivnost svojih pleopoda, s obzirom na dostupnost kisika u vodi (Culver i Pipan 2013). Određene studije pokazuju kako na potrošnju kisika utječu temperaturna varijabilnost lokaliteta s kojeg su sakupljeni te tjelesna masa jedinki (Ikeda i sur. 2001). S obzirom na navedeno, na stopu metabolizma mogu djelovati različiti okolišni čimbenici, stoga bi u idućim istraživanjima, uz različite svjetlosne uvjete trebalo pratiti kretanje i ponašanje organizama te istražiti na koji se način povećanje temperature odražava na enzimsku aktivnost koja je usko povezana s potrošnjom kisika (Simčić i Sket 2019).

6. Zaključak

Provedeno je istraživanje na vrstama i populacijama podzemnih i nadzemnih rakova porodice Asellidae kojima je mjerena potrošnja kisika, na temelju čega su uspoređene njihove stope metabolizma. Zaključeno je da:

- nema razlike u potrošnji kisika tj. u stopi metabolizma između mužjaka i ženki rodova *Asellus* i *Proasellus*;
- porastom temperature, raste i stopa metabolizma kod rakova *A. aquaticus*;
- stopa metabolizma ne razlikuje se kod nadzemnih i podzemnih populacija rakova *Asellus aquaticus* osim kod slovenske podzemne populacije koja ima veću stopu metabolizma u odnosu na nadzemnu blisku populaciju;
- podzemna vrsta rakova *Proasellus anophthalmus* ima veću stopu metabolizma od nadzemne srodne vrste *Proasellus coxalis*;
- dugoročni uzgoj u potpunom mraku nema efekt na stopu metabolizma kod nadzemnih populacija rakova *A. aquaticus* i nadzemnu vrstu *Proasellus coxalis*;
- uzgoj u uvjetima izmjene svjetla i mraka djeluje na podzemnu populaciju rakova *A. aquaticus* na način da su rakovi smanjili stopu metabolizma.
- podzemni rakovi porodice Asellidae imaju višu stopu metabolizma od njihovih nadzemnih srodnika, što je suprotno od opće-prihvaćene hipoteze da evolucija organizama u podzemlju dovodi do sniženja stope metabolizma.

7. Literatura

Angilletta M J Jr, Angilletta M J. (2009) *Thermal Adaptation: A Theoretical and Empirical Synthesis* (Oxford University Press).

Aspiras A C, Rohne, N, Martineau B, Borowsky R L, Tabin C J. (2015) Melanocortin 4 receptor mutations contribute to the adaptation of cavefish to nutrient-poor conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 112, str: 9668 – 9673

Aston R J, Milner A G P. (1980) A comparison of populations of the isopod *Asellus aquaticus* above and below powerstations in organically polluted reaches of the River Trent. *Freshwater Biology*, vol. 10, str: 1 – 14

Badino G. (2004) Cave temperatures and global climatic change. *International Journal of Speleology*, vol. 33(1), str: 103 – 114

Baković N, Matoničkin Kepčija R, Siemensma F J. (2022) Transitional and small aquatic cave habitats diversification based on protist assemblages in the Veternica cave (Medvednica Mt., Croatia). *Subterranean Biology*, vol. 42, str: 43 – 60

Barr T C. (1968) Cave ecology and the evolution of troglobites. U: Dobzhansky T. (ur.) *Evolutionary Biology*, vol. 2. Amsterdam, Springer Science & Business Media, str: 35 – 102.

Bergstedt J H, Pfalzgraff T, Vilhelm Skov P. (2021) Hypoxia tolerance and metabolic coping strategies in *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, vol. 257, e110956

Bjelke U, Herrmann J. (2005) Processing of two detritus types by lakedwelling shredders: species-specific impacts and effects of species richness. *Journal of Animal Ecology*, vol. 74, str: 92 – 98

Boyko C B, Bruce N L, Hadfield K A, Merrin K L, Ota Y, Poore G C B, Taiti S. (Eds) (2024). *World Marine, Freshwater and Terrestrial Isopod Crustaceans database. Asellidae Latreille, 1802*. Accessed through: [World Register of Marine Species at: https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=148665](https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=148665) on 2024-06-11

Brusca R C. (1984) Phylogeny, evolution and biogeography of the marine isopod subfamily Idoteinae (Crustacea: Isopoda: Calvifera). *Transactions of the San Diego Society of Natural History*, vol. 20, str: 99 - 134

Brusca R C, Iverson E W. (1985) A Guide to the Marine Isopod Crustacea of Pacific Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, vol. 33, str: 1 – 77

- Chen Z, Auler A S, Bakalowicz M, Drew D, Griger F, Hartmann J, Jiang G, Moosdorf N, Richts A, Stevanovic Z, Veni G, Goldscheider N. (2017) The World Karst Aquifer Mapping project: Concept, mapping procedure and map of Europe. *Hydrogeology Journal*, Vol. 25, str: 771 – 785
- Christiansen K A. (1962) Proposition pour la classification des animaux cavernicoles. *Memoires Spelunca* 2, str: 76 -78.
- Christiansen K A. (2012) Morphological adaptations. U: Culver D C, White W B (ur.) *Encyclopedia of caves*. Elsevier Academic Press, Amsterdam, vol. 2, str: 517 – 528
- Culver D. (1994) The geometry of natural selection in cave and spring populations of the amphipod *Gammarus minus* Say (Crustacea: Amphipoda). *Biological Journal of the Linnean Society*, vol. 52(1), str: 49 – 67
- Culver D C, Kane T C, Fong D W. (1995) *Adaptation and natural selection in caves*. Harvard University Press, Cambridge.
- Culver D C, Pipan T, Fišer Z. (2023) Ecological and evolutionary jargon in subterranean biology. U: Malard F, Griebler C, Rétaux S (ur.) *Groundwater Ecology and Evolution*. Academic Press, San Diego SAD, str: 89 – 110
- Culver D C, Pipan T. (2009a) Sources of energy in subterranean environments. U: Culver D C, Pipan T (ur.) *Caves and other subterranean habitats*. New York, Oxford University Press, str: 23 – 39.
- Culver D C, Pipan T. (2009b) Adaptations to subterranean life. U: Culver D C, Pipan T (ur.) *Caves and other subterranean habitats*. New York, Oxford University Press, str: 109 – 130.
- Culver D C, Pipan T. (2009c) Colonization and speciation in subterranean environments. U: Culver D C, Pipan T (ur.) *Caves and other subterranean habitats*. New York, Oxford University Press, str: 131 - 153.
- Culver D C, Pipan T. (2013) *Subterranean Ecosystems*. U: Levin S A (ur.) *Encyclopedia of Biodiversity*. Waltham, MA: Academic Press. Drugo izdanje, vol. 7, str: 49 – 62.
- Culver D C, Poulson T L. (1971) Oxygen consumption and activity in closely related amphipod populations from cave and surface habitats. *The American Midland Naturalist*, vol. 85(1), str: 74 – 84
- Dahl E, Hessler R R. (1982) The crustacean *lacinia mobilis*: A reconsideration of its origin, function and phylogenetic implications. *Zoological Journal of the Linnean Society*, vol. 74(2), str: 133 – 146
- Deeleman – Reinhold C L. (1965) Contribution a la connaissance du genre *Asellus* en Yougoslavie et en Turquie. *Zoologische Mededelingen*, vol. 40, str: 151 – 170

- Di Lorenzo T, Di Marzio W D, Spigoli D, Baratti M, Messana G, Cannicci S, Galassi D M P. (2015) Metabolic rates of a hypogean and an epigean species of copepod in an alluvial aquifer. *Freshwater Biology* vol. 60, str: 426 – 435
- Di Lorenzo T, Reboleira A S. (2022) Thermal acclimation and metabolic scaling of a groundwater asellid in the climate change scenario. *Scientific reports* 12:17938
- Edwards R W, Learner M A. (1960) Some factors affecting the oxygen consumption of *Asellus*. *The journal of experimental biology*, vol. 37, str: 706 -718
- Elliott N G, Haskard K, Koslow J A. (1995) Morphometric analysis of orange roughy (*Hoplostethus atlanticus*) off the continental slope of southern Australia. *Journal of Fish Biology*, vol. 46, str: 202 - 220
- Engel A S. (2007) Observations on the biodiversity of sulfidic karst habitats. *Journal of Cave and Karst Studies*, vol. 69 (1), str: 187 – 206
- Fišer C. (2019) Adaptation: Morphological. U: White W B, Culver D C, Pipan T (ur.) *Encyclopedia of Caves*. Academic Press, str: 3
- Fox H M, Simmonds B G. (1933) Metabolic rates of aquatic arthropods from different habitats. *Journal of experimental biology*, vol. 10, str: 67 – 74
- Gnaspini P, Trajano E. (2000) Guano communities in tropical caves. U: Wilkens H, Culver D C, Humphreys W H (ur.) *Subterranean ecosystems*, Amsterdam, Elsevier Press, str: 251 – 268.
- Griebler C i Avramov M. (2015) Groundwater ecosystem services. *Freshwater Science*, vol. 34(1), str: 355 – 367
- Gross J B, Powers A K, Davis E M, Kaplan S A. (2016) A pleiotropic interaction between vision loss and hypermelanism in *Astyanax mexicanus* cave x surface hybrids. *BMC Evolutionary Biology*, vol. 16, 145
- Guillaume O, Deluen M, Raffard A, Calvez O, Trochet A. (2020) Reduction in the metabolic levels due to phenotypic plasticity in the Pyrenean newt, *Calotriton asper*, during cave colonization. *Ecology and Evolution* , vol. 10(23), str: 12983 – 12989
- Hart P B, Niemiller M L, Burress E D, Armbruster J W, Ludt W B, Chakrabarty P. (2020) Cave-adapted evolution in the North American amblyopsid fishes inferred using phylogenomics and geometric morphometrics. *Evolution*, vol. 74 – 5, str: 936 – 949

- Henry J P, Magniez G. (1970) Contribution a la systematique des Asellides (Crustacea Isopoda). *Annales de Spéléologie*, vol. 25, str: 335-367
- Henry J P, Magniez G. (1983) Nouvelles données sur les Asellidae épigés d'Extreme — Orient (Crustacea, Isopoda, Asellota). *Contributions to Zoology*, vol. 65, str: 101 – 122
- Henry J P. (1973) Donnees recentes sur la fame hypogee d'Asellides de France. *Comptes rendus du 96e Congres national des sociétés savantes, Sc. 3*, str: 165 – 177
- Hervant F, Mathieu J, Barré H, Simon K, Pinon C. (1997) Comparative study on the behavioural, ventilatory, and respiratory responses of hypogean and epigean crustaceans to longterm starvation and subsequent feeding. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 118A, str: 1277 – 1283
- Hervant F, Mathieu J, Mesana G. (1998) Oxygen Consumption and Ventilation in Declining Oxygen Tension and Posthypoxic Recovery in Epigean and Hypogean Crustaceans. *Journal of crustacean biology*, vol. 18, str: 717 – 727
- Hervant F, Mathieu J. (1995) Ventilatory and locomotory activities in anoxia and subsequent recovery of epigean and hypogean crustaceans. *Comptes Rendus del'Academie des Sciences, Paris, Life Sciences*, vol. 318, str: 585 – 592
- Hervant F, Renault D. (2002) Long-term fasting and realimentation in hypogean and epigean isopods: a proposed adaptive strategy for groundwater organisms. *The Journal of Experimental Biology*, vol 205, str: 2079 – 2087
- Hüppop K. (2000) How do cave animals cope with the food scarcity in caves? U: Wilkens H, Culver D C, Humphreys W F (ur.) *Subterranean ecosystems*. Elsevier Press, Amsterdam, str: 159 - 188
- Ikeda T, Kanno Y, Ozaki K, Shinada A. (2001) Metabolic rates of epipelagic marine copepods as a function of body mass and temperature. *Marine Biolgy*, vol. 139, str: 587 – 596
- Jeffery W R. (2005) Adaptive Evolution of Eye Degeneration in the Mexican Blind Cavefish. *Journal of Heredity*, vol. 96(2), str: 1 – 12
- Jeffery W R, Protas M. (2012) Evolution and development in cave animals: from fish to crustaceans. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, vol. 1 (6), str: 1 – 33
- Jemec A, Škufca D, Prevorčnik S, Fišer Ž, and Zidar P. (2017) Comparative study of acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activities of closely related cave and surface *Asellus aquaticus* (Isopoda: Crustacea). *PLoS One*, vol. 12, e0176746

Jusup M, Sousa T, Domingos T, Labinac L, Marn N, Wang Z, Klanjšček T. (2017) Physics of metabolic organization. *Physics of Life Reviews*, vol. 20, str: 1 – 39

Kemp J L, Ballot A, Nilssen J P, Spikkeland I, Eriksen T E. (2020) Distribution, identification and range expansion of the common Asellidae in Northern Europe, featuring the first record of *Proasellus meridianus* in the Nordic countries. *Fauna norvegica*, vol. 40, str: 93 – 108

Konec M, Prevorčnik S, Sarbu, S M, Verovnik R, Trontelj P. (2015) Parallels between two geographically and ecologically disparate cave invasions by the same species, *Asellus aquaticus* (Isopoda, Crustacea). *Journal of Evolutionary Biology*, vol. 28, str: 864 – 875

Kovalenko K E, Thomaz S M, Warfe D M. (2012) Habitat complexity: approaches and future directions. *Hydrobiologia*, vol. 685, str: 1 – 17

Kowalko J E, Rohner N, Linden T A, Rompani S B, Warren W C, Borowsky R, Tabin C J, Jeffery W R, Yoshizawa M. (2013) Convergence in feeding posture occurs through different genetic loci in independently evolved cave populations of *Astyanax mexicanus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 110, str: 16933 – 16938

Lafuente E, Lürig M D, Rövekamp M, Matthews B, Buser C, Vorburger C, Räsänen K. (2021) Building on 150 Years of Knowledge: The Freshwater Isopod *Asellus aquaticus* as an Integrative Eco-Evolutionary Model System. *Frontiers in Ecology and Evolution*, vol. 9, 748212

Lampert W. (1984) The measurement of respiration. In: Downing JA, Rigler FH (ur.) *A Manual on Methods for the Assessment of Secondary Production in Fresh Water*. IBP Handbook 17, 2. izdanje, Blackwell, Oxford, 413–468.

Lukić M, Jovović L, Bedek J, Grgić M, Kuharić N, Rožman T, Čupić I, Weck B, Fong D, Bilandžija H. (2024) A practical guide for the husbandry of cave and surface invertebrates as the first step in establishing new model organisms. *PLoS ONE*, vol. 19(4), e0300962

Malard F, Hervant F. (1999) Oxygen supply and the adaptations of animals in groundwater. *Freshwater Biology*, vol. 41, str: 1 – 30

Mejia-Ortiz M L. (2019) Crustacea. U: White W B, Pipan T (ur.). *Encyclopedia of caves*. Academic Press, str: 333 – 347.

Mejia-Ortiz L M, Hartnoll R G. (2005) Modifications of eye structure and integumental pigment in two cave crayfish. *Journal of Crustacean Biology*, vol. 25 (3), str: 480 – 487

- Migliore L, Paluzzi R, Vitagliano - Tadini G. (1982) Reproductive activity in *Asellus aquaticus* L. (Crustacea, Isopoda) from southern Italy. *International Journal of Invertebrate Reproduction*, vol. 4, str: 359 – 367
- Mojaddidi H, Fernandez F E, Erickson P A, Protas M E. (2018) Embryonic origin and genetic basis of cave associated phenotypes in the isopod crustacean *Asellus aquaticus*. *Scientific Reports*, vol. 8, e16589
- Moran D, Softley R, Warrant E J. (2014) Eyeless Mexican cavefish save energy by eliminating the circadian rhythm in metabolism. *PLoS One*, vol. 9 (9), e107877
- Negoescu I. (1989) Sur un population troglobie d'*Asellus aquaticus* (L.) (Isopoda, Asellota, Asellidae). *Misc. speol. rom.* 1, str: 47 – 52
- Norin T, Clark TD. (2016) Measurement and relevance of maximum metabolic rate in fishes. *Journal of Fish Biology*, vol. 88(1), str: 122 – 151
- Økland K A. (1978) Life history and growth of *Asellus aquaticus* (L.) in relation to environment in a eutrophic lake in Norway. *Hydrobiologia*, vol. 59(3), str: 243–259
- Pallarés S, Colado R, Botella-Cruz M, Montes A, Balart-García P, Bolton D T, Millán A, Ribera I, Sánchez-Fernández D. (2020) Loss of heat acclimation capacity could leave subterranean specialists highly sensitive to climate change. *Animal Conservation*, vol. 24(3), str: 482 – 490
- Pipan T, Culver D. (2012) Convergence and divergence in the subterranean realm: a reassessment. *Biological Journal of the Linnean Society*, vol. 107, str: 1 – 14
- Plath M, Seggel U, Burmeister H, Heubel K U, Schlupp I. (2006) Choosy males from the underground: male mating preferences in surface- and cave-dwelling Atlantic mollies (*Poecilia mexicana*). *Naturwissenschaften* vol.93, str: 103 – 109
- Poulson T L, White W B. (1969) The cave environment. *Science*, vol. 165, str: 971 – 981
- Poulson T L. (1963) Cave adaptation in amblyopsid fishes. *American Midland Naturalist*, vol. 70, str: 257 – 290
- Prevorčnik S, Blejec A, Sket B. (2004) Racial differentiation in *Asellus aquaticus* (L.) (Crustacea: Isopoda: Asellidae). *Archiv für Hydrobiologie*, vol. 160, str: 193 – 214
- Prevorčnik S, Verovnik R, Sket B. (2002) Diversity of *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda) subpopulations in the Postojna-Planina Cave System testifies for recurrent immigration of the species underground. *XVI International Symposium of Biospeleology, Abstracts*, str: 88

- Protas M, Trontelj P, Prevočnik A, Fišer Ž. (2023) The *Asellus aquaticus* species complex: an invertebrate model in subterranean evolution. U: Malard F, Griebler C, Retaux C (ur.) Groundwater Ecology and Evolution, 2. izdanje, Academic Press, str: 329 – 350.
- Racovitza E G. (1919) note sur les Isopodes 3. *Asellus banyulensis* n. Sp. 4. *A. coxalis* Dollf. 5. *A. coxalis peyerimhoffi* n. subsp. Archives de Zoologie Experimentale et Generale, vol. 58, str: 49 – 77
- Racovitza E G. (1920) Notes sur les Isopodes-6. *Asellus communis* Say. 7. Les pleopodes de des Asellides; morphologie et development. Arch. Zool. Exper. Gen., vol. 58A, str: 79 – 115
- Racovitza E G. (1925) Notes sur les Isopodes. 13. Morphologie et phylogénie des Antennes II. Archives de Zoologie Experimentale et Generale, vol. 63, str: 533 – 622
- Remy P. (1932) Description d'*Asellus (Proasellus) arnautovici* n. sp. du lac d'Ohrid. Bulletin de la Société d'histoire naturelle de la Moselle, vol. 33, str: 73 - 87
- Rogers D C, Lewis J J. (2019) Malacostraca: Isopoda. U: Thorp J H, Rogers D C (ur.). Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates. Academic Press.
- Schram F R. (1986) Crustacea. Oxford University Press, New York. str: 1 – 606
- Simčić T, Brancelj A. (2007) The effect of light on oxygen consumption in two amphipod crustaceans - The hypogean *Niphargus stygius* and the epigean *Gammarus fossarum*. Marine and Freshwater Behaviour and Physiology, vol. 40(2), str: 141 – 150
- Simčić T, Lukančić S, Brancelj A. (2005) Comparative study of electron transport system activity and oxygen consumption of amphipods from caves and surface habitats. Freshwater Biology, vol. 50, str: 494 – 501
- Simčić T, Sket B. (2019) Comparison of some epigean and troglotrophic animals regarding their metabolism intensity. Examination of a classical assertion. International Journal of Speleology, vol. 48, str: 133 – 144
- Simčić T, Sket B. (2021) Ecophysiological responses of two closely related epigean and hypogean *Niphargus* species to hypoxia and increased temperature: Do they differ? International Journal of Speleology, vol. 50 (2), str: 111 – 120
- Simon K S, Pipan T, Culver D C. (2007) A conceptual model of the flow and distribution of organic carbon in caves. Journal of Cave and Karst Studies, vol. 69, str: 279 – 284

- Sket B. (1994) Distribution of *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda: Asellidae) and its hypogean populations at different geographic scales, with a note on *Proasellus istrianus*. *Hydrobiologia*, vol. 287, str: 39 – 47
- Stein H, Griebler C, Berkhoff S, Matzke D, Fuchs A, Jürgen Hahn H. (2012) Stygoregions—A promising approach to a bioregional classification of groundwater systems. *Scientific Reports*, vol. 2, str: 673
- Stoch F. (1985) Gli Asellidi delle acque epigee della Venezia Giulia (Italia Nordorientale) (Crustacea, Isopoda). *Fragmenta entomologica*, vol. 18 (1), str: 19 – 32
- Stoch F, Valentino F, Volpi E. (1995) Taxonomic and biogeographic analysis of the *Proasellus coxalis*-group (Crustacea, isopoda, asellidae) in Sicily, with description of *Proasellus montalentii* n. sp. *Hydrobiologija*, vol. 317, str: 247 – 258
- Stoch F, Valentino F, Volpi E. (1996) Taxonomic and biogeographic analysis of the *Proasellus coxalis*-group (Crustacea, isopoda, asellidae) in Sicily, with description of *Proasellus montalentii* n. sp. *Hydrobiologia*, vol. 317, str: 247 – 258
- Sworobowicz L, Grabowski M, Mamos T, Burzynski A, Kilikowska A, Sell J, Wysocka A. (2015) Revisiting the phylogeography of *Asellus aquaticus* in Europe: insights into cryptic diversity and spatiotemporal diversification. *Freshwater Biology*, vol. 60, str: 1824 – 1840
- Turk S, Sket B, Sarbu S. (1996) Comparison between some epigean and hypogean populations of *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda: Asellidae). *Hydrobiologia*, vol. 337(1-3), str:161 – 170
- Uiblein F, Durand J P, Juberthie C, Parzefall J. (1992) Predation in caves: the effects of prey immobility and darkness on the foraging behaviour of two salamanders, *Euproctus asper* and *Proteus anguinus*. *Behavioural Processes*, vol. 28, str: 33 – 40
- Unwin E E, Stebbing T R R. (1920) Notes upon the Reproduction of *Asellus aquaticus*. *Zoological Journal of the Linnean Society*, vol. 34(228), str: 335–343
- Venarsky M P, Benstead J P, Huryn A D, Huntsman B M, Edmonds J W, Findlay R H, Wallace J B. (2017) Experimental detritus manipulations unite surface and cave stream ecosystems along a common energy gradient. *Ecosystems*, vol. 21, str: 629 – 642
- Venarsky M P, Huntsman B M, Huryn A D, Benstead J P, Kuhajda B R. (2014) Quantitative food web analysis supports the energy limitation hypothesis in cave stream ecosystems. *Oecologia*, vol. 176, str: 859 – 869

Venarsky M P, Wilhelm F M. (2006) Use of clove oil to anaesthetize freshwater amphipods. *Hydrobiologia*, vol. 568, str: 425 – 432.

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*, vol. 14, str: 4355 – 4369

Vick P, Schweickert A, Blum A. (2009) Cloning and expression analysis of the homeobox gene abdominal-A in the isopod *Asellus aquaticus*. U: Kurzfeld N C (ur.) *Developmental Gene Expression Regulation*. Nova Science Publishers, str: 285 – 295.

White W B, Culver D C, Pipan T. (2019) *Encyclopedia of caves*. Academic Press, Oxford.

Wilkins H, Junge P, Langecker T G. (1991) Speciation of troglobites. *Studies in the San Antonio Cave (Oaxaca, Mexico)*. *International Journal of Speleology*, vol. 20, str: 1 – 13

Yamamoto Y, Stock D W, Jeffery W R. (2004) Hedgehog signaling controls eye degeneration in blind cavefish. *Nature*, vol. 431, str: 844 – 847

Yoshizawa M, Goricki S, Soares D, Jeffery W R. (2010) Evolution of a behavioral shift mediated by superficial neuromasts helps cavefish find food in darkness. *Current Biology*, vol. 20, str: 1631 – 1636

Zagmajster M, Malard F, Eme D, Culver D C. (2018) Subterranean biodiversity patterns from global to regional scales. *Hydrogeology Journal*, vol. 25, str: 219 – 227

8. ŽIVOTOPIS

LUCIJA TOMIĆ

ltomic.biol@pmf.hr

Obrazovanje

- **Magistra eksperimentalne biologije**
Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb
2021. – 2025.
 - **Prvostupnica biologije**
Sveučilište J. J. Strossmayera, Odjel za biologiju, Osijek
2018. – 2021.
-

Radno iskustvo

- **Sudionica u projektu**
Institut Plavi svijet, geolociranje morskog prometa i promatranje životinja
Listopad 2021.
 - **Stručna laboratorijska praksa**
Institut Ruđer Bošković, istraživanje metabolizma špiljskih i površinskih rakova
Veljača 2021. – Studeni 2021.
-

Znanstveni radovi

- Rakovi porodice Asellidae (Crustacea: Isopoda) naseljavaju špilje – fenotipska plastičnost omogućuje kolonizaciju podzemlja.
14. hrvatski biološki kongres, 2022.

Više informacija: [Institut Bilandžija](#)

Jezici

- Hrvatski (materinji)
- Engleski (napredno)
- Talijanski (osnovno)

PRILOZI

Prilog I

Ime podvrste	Stanište
<i>A. a. aquaticus</i> (L.) Racovitza, 1919	sjeverna Italija, Kvarner, Makedonija, Rumunjska
<i>A. a. carsicus</i> Karaman, 1952	Dinaridi
<i>A. a. irregularis</i> Sket, 1965	jugoistočna Slovenija
<i>A. a. longicornis</i> Sket, 1952	jugoistočna Slovenija
<i>A. a. carniolicus</i> Sket, 1952	sjeverna Slovenija
<i>A. a. cyclobranchialis</i> Sket, 1952	jugoistočna Slovenija
<i>A. a. cavernicolus</i> Racovitza, 1925	istočna Italija, sjeverozapadna Slovenija, Dinaridi
<i>A. a. messerianus</i> Birštejn, 1945	Turkmenistan
<i>A. a. strinatii</i> Chappuis, 1955	sjeverozapadna Turska
<i>A. a. infernus</i> Turk, Prevorčnik i Blejec, 1998	Rumunjska

Prilog II

Ime (pod)vrsta
<i>Proasellus montalentti</i> <u>Stoch, Valentino & Volpi</u> , 1996
<i>Proasellus wolffi</i> Dudich, 1925
<i>Proasellus coxalis lucifugus</i> Deeleman-Reinhold, 1965
<i>Proasellus coxalis coxalis</i> Racovitza, 1919
<i>Proasellus coxalis cephalenus</i> (Strouhal, 1942)
<i>Proasellus coxalis septentrionalis</i> (Herbst, 1956)
<i>Proasellus coxalis polychaetus</i> (Dudich, 1925)
<i>Proasellus coxalis italicus</i> (Dudich, 1925)
<i>Proasellus coxalis dudichi</i> (Strouhal, 1937)
<i>Proasellus gardinii</i> (Arcangeli, 1942)
<i>Proasellus istrianus</i> (Stammer, 1932)