

Morfometrijske značajke oocita školjkaša *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) u akumulaciji Dubrava

Konjuh, Nikolina

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:217:093561>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Nikolina Konjuh

Morfometrijske značajke oocita školjkaša *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) u akumulaciji Dubrava

Diplomski rad

Zagreb, 2017. godina

Ovaj rad je izrađen u Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno - matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Jasne Lajtner i neposrednim vodstvom doc. dr. sc. Romane Gračan. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre edukacije biologije i kemije.

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno – matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

**Morfometrijske značajke oocita školjkaša *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771)
u akumulaciji Dubrava**

Nikolina Konjuh

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Slatkovodni školjkaš *Dreissena polymorpha* jedna je od najdominantnijih invazivnih vrsta u rijekama i jezerima Europe koja se u Hrvatskoj počela širiti tijekom 1980-tih godina. Kako bi se nadopunile spoznaje o reproduktivnim značajkama ove vrste u akumulacijskom jezeru hidroelektrane Dubrava analizirane su ženke uzorkovane u akumulaciji od ožujka do kolovoza 2000. god. Ciljevi ovog rada su bili istražiti sezonske cikluse rasta oocita i njihovih jezgri, usporediti razvojne stadije gonada s ustanovljenim veličinama oocita i usporediti dobivene podatke s rezultatima prijašnjih istraživanja u Hrvatskoj. Razvojni stadij gonada i rast oocita analiziran je na tkivu visceralne vreće, koje je tehnikom parafinskih blokova izrezano na debljinu 10 µm i obojano hemalaun-eozinom. Rezultati pokazuju da su analizirane ženke u ožujku bile u stadiju gametogeneze, mrijest je trajao od travnja do lipnja, nakon čega su u srpnju zabilježeni stadiji nakon mriještenja te u kolovozu stadiji mirovanja, uz znakove početka gametogeneze. Primjenom morfometrijskog programa Zen2Lite ukupno je izmjereno 5190 oocita i njihovih jezgri. Najveće prosječne vrijednosti promjera oocita i njihovih jezgri (35,32 µm; 23,02 µm) ustanovljene su u lipnju (u gonadnom stadiju pred mriještenje), dok su najmanje prosječne vrijednosti (10,34 µm; 6,62 µm) utvrđene u stadiju mirovanja, u kolovozu. Zabilježene su statistički značajne razlike u promjeru oocita i njihovih jezgri kako između istraživanih mjeseci tako i s obzirom na ustanovljene gonadne stadije ($p < 0,001$). Utvrđene reproduktivne značajke ove vrste ne razlikuju se značajno od dosadašnjih istraživanja u rijeci Dravi i akumulaciji Dubrava, dok se manje razlike u odnosu na akumulaciju Čakovec mogu objasniti okolišnim čimbenicima, prvenstveno temperaturom vode.

(40 stranica, 24 slike, 7 tablica, 68 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: Bivalvia, reproduktivni ciklus, gonadni stadiji

Voditelj: izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner

Neposredni voditelj: doc. dr. sc. Romana Gračan

Ocjenitelji: izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner

izv. prof. dr. sc. Ines Radanović

izv. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Rad prihvaćen: 8. ožujka 2017.

**Morphometric characteristics of the oocytes of the mussel *Dreissena polymorpha*
(Pallas, 1771) in the Dubrava Reservoir**

Nikolina Konjuh

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Freshwater mussel *Dreissena polymorpha* is one of the most dominant invasive species in the rivers and lakes of Europe, which began to spread in Croatia in the 1980s. To complement the knowledge about reproductive characteristics of this species in the accumulation lake of Dubrava Hydroelectric Power Plant, we analysed females sampled in the reservoir from March to August 2000. The objectives of the study were to investigate the seasonal patterns of oocyte growth and growth of their nuclei, compare the gonad developmental stages with recorded sizes of oocytes and to associate the obtained data with the results from previous research in Croatia. The development stage of gonads and the growth of oocytes were analysed on visceral mass tissue, processed for paraffin blocks technique, cut to a thickness of 10 µm and stained with hemalaun-eosin. The results show that females sampled in March are at the stage of gametogenesis, spawning lasts from April to June, in July females are in the post spawning stage, and in August animals are in resting stage, with the signs of new gametogenesis. In total, we measured 5190 oocytes and their nuclei, by using morphometric program Zen2Lite. The highest average value of the oocytes diameter and of their nuclei (35.32 µm; 23.02 µm) was recorded in June (the gonadal stage before spawning), while the lowest average value (10.34 µm; 6.62 µm) was noted for the resting stage in August. Statistically significant differences in the diameter of oocytes and their nuclei were recorded among the studied months and also among established gonadal stages ($p < 0.001$). Identified reproductive characteristics of this species are not significantly different from previous studies in the Drava River and reservoir Dubrava, while minor differences in relation to the accumulation of Čakovec can be explained by environmental factors, primarily water temperature.

(40 pages, 24 figures, 7 tables, 68 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: Bivalvia, reproductive cycle, gonad stages

Supervisors: Dr. Jasna Lajtner, Assoc. Prof.

Assistant Supervisor: Dr. Romana Gračan, Assist. Prof.

Reviewers: Dr. Jasna Lajtner, Assoc. Prof.

Dr. Ines Radanović, Assoc. Prof.

Dr. Iva Juranović Cindrić, Assoc. Prof.

Thesis accepted: March 8, 2017

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 OSNOVNA OBILJEŽJA VRSTE <i>Dreissena polymorpha</i>	1
1.1.1 MORFOLOGIJA VRSTE	2
1.1.2 ANATOMIJA VRSTE.....	2
1.1.3 STANIŠTE	4
1.1.4 EKOLOŠKI ČIMBENICI I ULOGA VRSTE U EKOSUSTAVU.....	5
1.1.5 ŽIVOTNI CIKLUS.....	7
1.1.6 GEOGRAFSKA RASPROSTRANJENOST	8
1.2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA	10
2. MATERIJAL I METODE	11
2.1 PODRUČJE ISTRAŽIVANJA.....	11
2.2 SKUPLJANJE UZORAKA	12
2.3 IZRADA HISTOLOŠKIH PREPARATA.....	12
2.4 MORFOMETRIJSKA ANALIZA PREPARATA.....	14
2.5 ODREĐIVANJE RAZVOJNIH STADIJA GONADA	15
2.7 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	16
3. REZULTATI	18
3.1 RAZVOJNI STADIJI GONADA.....	18
3.2 HISTOMORFOMETRIJSKA ANALIZA JAJNIKA	19
3.3. USPOREDBA GONADNOG VOLUMENA I VELIČINE OOCITA	27
4. RASPRAVA	29
5. ZAKLJUČCI.....	33
6. LITERATURA	34

1. UVOD

1.1 OSNOVNA OBILJEŽJA VRSTE *Dreissena polymorpha*

Vrsta *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771), slatkovodni je školjkaš koji pripada koljenu mekušaca, Mollusca. Naziv "polymorpha" proizlazi iz varijacija u boji i obliku školjke. Hrvatski naziv za vrstu je raznolika trokutnjača zbog trokutastog oblika školjke izvedenog na različite načine (Slika 1). Vrsta je dominantna u rijekama i jezerima Europe i Sjeverne Amerike, invazivnog je karaktera jer potiskuje autohtone bentonske beskralješnjake, dominira biomasom i uzrokuje brojne ekonomske probleme (Stanczykowska, 1977; Claudi i Mackie, 1994).



Slika 1. Vanjski izgled raznolike trokutnjače, *Dreissena polymorpha* (snimio: I. Lajtner).

Sistematika vrste (Nuttall, 1990):

Carstvo: ANIMALIA

Koljeno: MOLLUSCA

Razred: BIVALVIA

Podrazred: HETERODONTA

Red: VENEROIDA

Natporodica: DREISSENOIDEA

Porodica: DREISSENIDAE

Rod: *Dreissena*

Vrsta: *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771)

1.1.1 MORFOLOGIJA VRSTE

Školjka je građena od dvije trokutaste ljuske koje su najčešće prugastog ili „cik-cak“ uzorka, uz izmjenjivanje svijetlije žute i tamnije smeđe boje (Slika 1). Unutar populacije pojedinačne boje ljuske mogu varirati od vrlo svijetle boje, bez uočljivih tamnih linija do onih potpuno tamnih bez vidljivih linija.

Vrsta je bilateralno simetrična. Trbušna strana je ravna što je važno zbog pričvršćenja na podlogu. Prosječna duljina školjke iznosi 25 do 40 mm, širina 16 do 23 mm, a visina 13 do 18 mm (Pfleger, 1990).

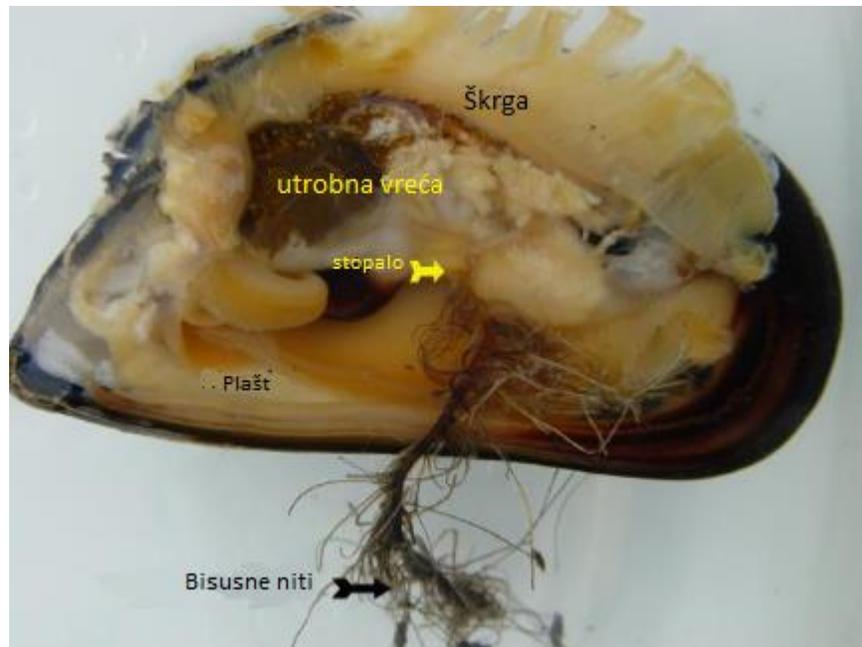
1.1.2 ANATOMIJA VRSTE

Tijelo obavija tanak plašt unutar kojeg se nalazi plaštana šupljina s unutrašnjim organima (Slika 2). S trbušne strane plašta nalazi se otvor kroz koji izlazi mišićno stopalo koje školjkašu služi za pokretanje sve dok ne pronađe prikladno mjesto gdje se pričvrsti i tu ostane do kraja života (Morton, 1969a, 1993). Za pričvršćenje im služe bisusne niti koje stvara bisusna žlijezda smještena pri bazi stopala. U posteriornom dijelu školjkaša plašt je izdužen u dvije cijevi, kratke sifone koji se otvaraju prema vanjskoj okolini.

Za unutrašnjost ljuštare pričvršćeni su anteriorni i posteriori aduktor, posteriori pedalni aduktor, anteriorni pedalni retraktor te anteriorni i posteriori bisusni retraktor (Yonge i Campbell, 1968). Školjka se zatvara kontrakcijom anteriornog i posteriornog aduktora, a do njezinog otvaranja dolazi nakon što kontrakcija mišića prestane i zategnu se ligamenti koji su antagonisti mišićima aduktorima (Yonge i Campbell, 1968; Morton, 1969a, 1993).

Živčani sustav je simetričan, sastoji se od cerebro-pleuralnog ganglija smještenog u prednjem dijelu tijela koji inervira prednji dio tijela i plašta, usne lapove, usta i prednji mišić zatvarač. Viscero-parijetalni ganglij koji je konektivom spojen za cerebro-pleuralni inervira škrge,

sifone i stražnji dio plašta, te stražnji mišić zatvarač. Pedalni ganglij inervira stopalo, a konektivom je spojen za cerebro-pleuralni ganglij (Morton, 1993).



Slika 2. Prikaz anatomske građe školjkaša *D. polymorpha* (preuzeto i prilagođeno prema: <http://prairiewaters.ca/data/documents/PWWG-AIS-Maclsaac-Sask1.pdf>).

Vrsta ima trepetljikave parne škrge koje se pružaju cijelom dužinom plaštane šupljine (Morton, 1969a, 1993; Claudi i Mackie, 1994). Trepetljike su zaslužne za izdvajanje hranjivih tvari iz vode koja ulazi u plaštanu šupljinu te za izmjenu plinova (Silverman i sur., 1996).

Životinja ima otvoren optjecajni sustav, srce je smješteno na leđnoj strani školjkaša, u perikardu. Srce je građeno od dvije pretklijetke i jedne klijetke kroz koju prolazi stražnji dio crijeva (Morton, 1969a, 1993). Hemolimfa koja je bogata kisikom dolazi iz plašta i škrge u pretklijetke i klijetku, a zatim mrežom krvnih žila odlazi dalje u tijelo gdje se izliva u hemolimfne sinuse u kojima se vrši izmjena hranjivih tvari, plinova i produkata metabolizma.

Vrsta *D. polymorpha* se hrani filtriranjem organskih i anorganskih tvari u stupcu vode, a jedan školjkaš profiltrira do litru vode dnevno. Hranu čine jednostanični organizmi, kao što su bakterije, modrozeleno alge, zelene alge i protisti te fine čestice detritusa (Nalepa i Schloesser, 1993; U.S. Geological Survey, 2008).

Usta se nalaze u prednjem dijelu tijela gdje započinje probavilo koje obuhvaća jednjak, želudac, vrećicu za kristalni štapić, prednje i stražnje crijevo, te analni otvor (Morton, 1969a, 1993). Želudac se sastoji od želučane vreće koja je tiflozolisom podijeljena u dva dijela. Miješanju sadržaja želuca pomaže kristalni štapić koji se nalazi u vrećici s lijeve strane srednjeg crijeva, a njegovim otapanjem se oslobađaju probavni enzimi koji pospješuju ekstracelularnu probavu. Probavljene tvari se prenose pomoću trepetljiki na želucu u probavnu žlijezdu gdje se odvija intracelularna probava. Neprobavljeni ostaci hranjivih tvari prenose se trepetljikama do srednjeg i stražnjeg crijeva gdje na kraju izlaze kroz analni otvor (Maclsaac i Rocha, 1995).

Suvišna voda iz organizma se izbacuje putem dva metanefridija koji su građeni poput cijevi U - oblika (Morton, 1969b). Filtriranjem hemolimfe kroz perikardijalnu žlijezdu započinje ekskrecija (Giamberini i Pihan, 1996). Primarna mokraćna nastaje filtriranjem tekućine u perikardu koja ulazi u proksimalni dio metanefridija, gdje se koncentrira i stvara sekundarnu mokraćnu. Mokraća se oslobađa u suprabranijalni prostor kroz nefridiopor, a izbacuje se van tijela kroz izlazni sifon.

Vrsta je razdvojenog spola, gonade su parne i smještene u utrobnoj vreći (Morton, 1969a). Oocite su pričvršćene za epitel dok ne postanu zrele, a spermiji su raspoređeni s bičevima usmjerenim prema lumenu folikula (Morton, 1993).

Životni vijek školjkaša je četiri do pet godina, a odrasla ženka *Dreissena polymorpha* može proizvesti 30 000 do 40 000 jaja u svakom reproduktivnom ciklusu, a više od milijun u jednoj godini. Odrasle jedinke se počinju razmnožavati u proljeće, kada temperatura vode naraste na 12 °C. U staništima gdje voda ostaje topla tijekom cijele godine mogu se reproducirati kontinuirano. Ženke otpuštaju jaja u vodu, mužjaci spermije, a oplodnja se događa u vodi. Školjkaš je sposoban za reprodukciju kada je dug od 8 do 9 mm, obično nakon godinu dana rasta (Nalepa i Schloesser, 1993; U.S. Geological Survey, 2008).

1.1.3 STANIŠTE

Vrsta živi u mirnoj ili sporo tekućoj slatkoj vodi gdje je jakim bisusnim pričvršćena za razne podloge. Osim prirodnih, koje uključuju kamenje, stijene, korijenje biljaka i potopljena stabla vrsta se može pričvrstiti na plastiku, metal, staklo, ali i na druge životinje kao što su školjkaši ili rakovi (Slika 3) (Carlton, 1993). Brzina strujanja vode je bitan faktor koji utječe na pričvršćivanje životinje, odnosno vrsta izbjegava naseljavati mjesta s velikom brzinom strujanja vode budući da bitno utječe na sposobnost filtriranja.



Slika 3. Obraštaj vrste *Unio pictorum* s jedinkama vrste *Dreissena polymorpha* u akumulaciji HE Čakovec (snimio: I. Lajtner).

1.1.4 EKOLOŠKI ČIMBENICI I ULOGA VRSTE U EKOSUSTAVU

Koncentracija kalcija ima izravan utjecaj na širenje vrste (Nalepa i Schloesser, 1993; U.S. Geological Survey, 2008). Naime, ovi školjkaši ne mogu preživjeti ako je koncentracija kalcija niska jer je kalcij važan sastavni dio školjke. Claudi i Mackie (1994) navode da je količina od 7 do 8 mg/l dovoljna za pozitivan rast školjke, koncentracija od 12 do 14 mg/l za reprodukciju te 3 mg/l za preživljavanje.

Vrsta ne može preživjeti u vodi koja ima pH niži od 6.8, a jedinke najbrže rastu kod pH vrijednosti 7,4-8,4 (Nalepa i Schloesser, 1993; U.S. Geological Survey, 2008). Gornja granica tolerancije je 9,3-9,6 (Bowman i Bailey, 1998).

Temperaturni raspon za rast i razmnožavanje različit je između populacija vrste *D. polymorpha*. U Europi je temperaturni prag za rast od 11 do 12 °C (Walz, 1978), a za razmnožavanje i razvoj ličinki od 15 do 17 °C (Morton, 1969c; Stanczykowska, 1977).

Vrsta *D. polymorpha* može podnijeti velike razlike u količini otopljenog kisika u vodi, u prirodnim staništima naseljava područja sa saturacijom kisika preko 90 % (Zhadin, 1946), ali može podnijeti i zasićenje kisika od 25 % (Karatayev i sur., 1998).

Ličinke vrste *D. polymorpha* nemaju posebnu obranu od predatora. Dio su zooplanktona, slobodno lebde u stupcu vode i njima se hrane vrste koje konzumiraju zooplankton, kao što su sitne ribe, veslonošci, žarnjaci i slatkovodne spužve (Nalepa i Schloesser, 1993; U.S. Geological Survey, 2008). Većina riba ne može se hraniti odraslim školjkašima no nekoliko vrsta ima specijalizirane zube i čeljusti koje su dovoljno jake da razbiju ljuske mekušaca, te se ovim školjkašem hrani 38 ribljih vrsta, 27 vrsta u Europi i 14 vrsta u Sjevernoj Americi. U Europi su najčešći predatori ribe iz porodice Cyprinidae (Martyniak i sur., 1987).

Ptice močvarice su važni predatori vrste *D. polymorpha*, pri čemu se posebni ističu patke (*Aythya fuligula*, *A. ferina*, *A. marila*, *A. affinis*, *Bucephala clangula*) (Molloy i sur., 1997). Ukupno 36 vrsta vodenih ptica se hrane ovom vrstom.

Paraziti vrste *D. polymorpha* su najčešće metilji i trepetljikaši. Školjkaš inficiran metiljima može imati i do jedne trećine manju suhu težinu nego zdrava jedinka zbog otežanog disanja i hranjenja uzrokovanog prisutnošću sporocista u škragama (Lajtner i sur., 2008), a dolazi i do znatnog smanjenja tkiva gonada (Davids i Kraak, 1993, Lajtner i sur., 2008).

Vrsta *D. polymorpha* ima važnu ulogu u slatkovodnim ekosustavima. Ako je dovoljno brojna, može filtrirati veliku količinu planktona u vodi, mijenjajući protok energije kroz hranidbeni lanac. Energija iz fitoplanktona ide do dna, do školjkaša i životinja koje ih konzumiraju umjesto slobodno plivajućim ribama i zooplanktonu (Karatayev i sur. 1997; Bastviken i sur., 1998). Kroz dulje vremensko razdoblje dolazi do smanjena brojnosti zooplanktona i riba, kao posljedica kompeticije za fitoplankton (Roberts, 1990; MacIsaac, 1996).

Konzumiranjem fitoplanktona školjkaš očisti vodu od zamućenja i omogućava zrakama sunčeve svjetlosti dublji prodor u vodu što pogoduje razvoju algi i makrofita (Griffiths, 1993; Lowe i Pillsbury, 1995). Ovi organizmi pružaju hranu i skrovišta za ribe i beskralješnjake. Pojava vrste *D. polymorpha* utječe na smanjenje broja riječnih rakova i autohtonih vrsta unioidnih školjkaša (Mackie, 1991).

Unošenje vrste *D. polymorpha* u nova područja stvorilo je velike ekonomske probleme u mnogim dijelovima svijeta (Claudi i Mackie, 1994). Školjkaš raste na svim vrstama umjetnih struktura u vodi, uključujući cijevi za pitku vodu koje začepi intenzivnim rastom, te na trupovima brodova i brodskim motorima, ribarskim mrežama i navigacijskim plutačama.

1.1.5 ŽIVOTNI CIKLUS

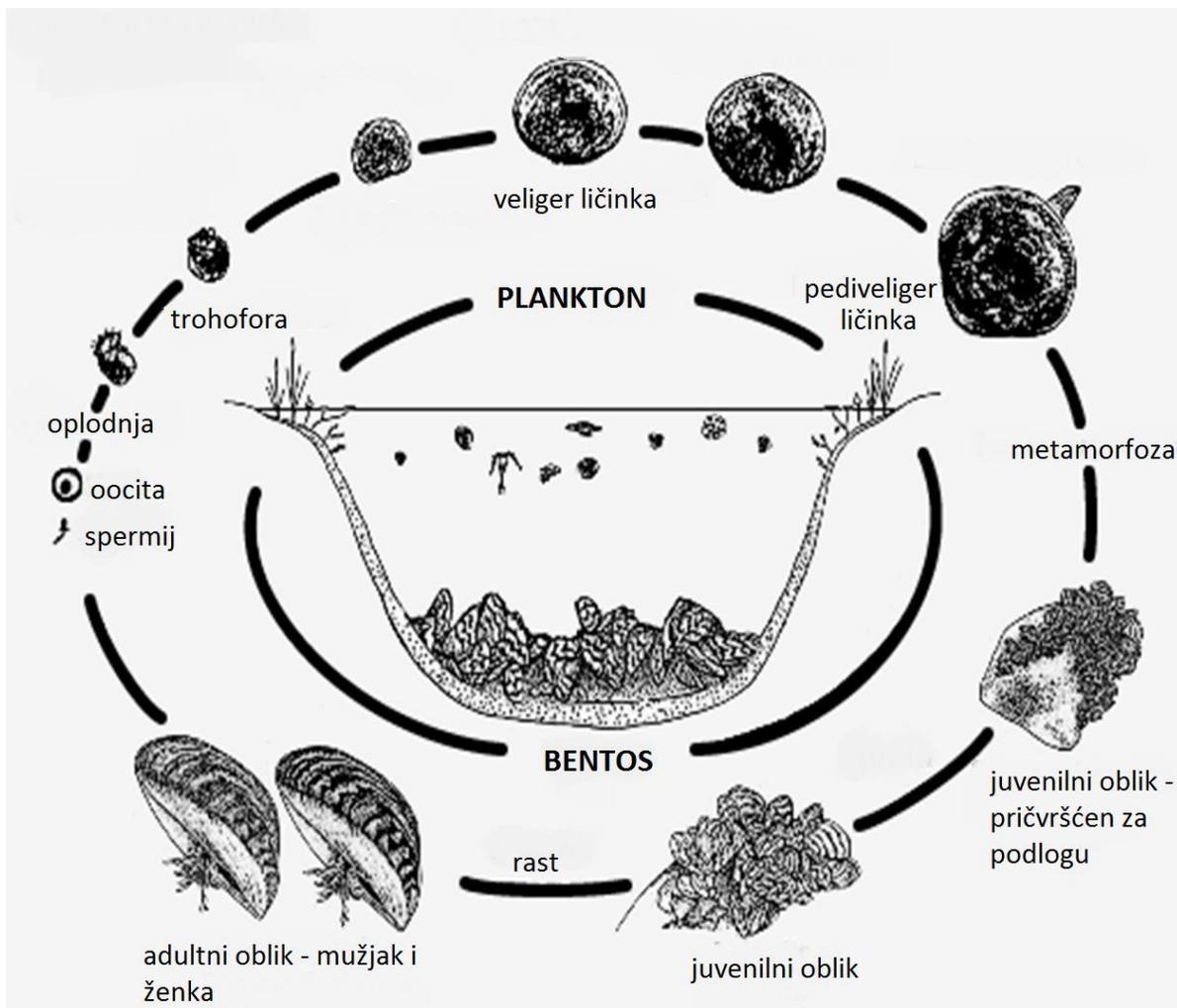
Životni ciklus vrste se može podijeliti u tri stadija: ličinački, juvenilni i adultni stadij (Slika 4) (Ackerman i sur., 1994; Claudi i Mackie, 1994). Ličinački stadiji slobodno plivaju kao dio planktona, a juvenilne i adultne jedinke su pričvršćene za podlogu.

Proces gametogeneze počinje u jesen, a svoj maksimum u veličini oocite i spermiji dosežu u proljeće (Pathy, 1994). Idealna temperatura za mrijest je 15-17 °C (Pathy, 1994; Claudi i Mackie, 1994) i u vezi je s dostupnom količinom hranjivih tvari (Gist i sur., 1997; Wacker i Von, 2003). Glavni čimbenik koji dovodi do otpuštanja gameta je temperatura iznad 12 °C, a oslobađanje gameta vrste *D. polymorpha* može potaknuti i otpuštanje gameta drugih vrsta školjkaša (Nichols, 1996).

U Europi se proces mriještenja vrste *D. polymorpha* odvija od kasnog proljeća do sredine jeseni (Antheunisse, 1963; Van Gool, 1982; Baxter, 1983; Davis i Wilson, 1983).

Ličinački dio ciklusa traje četiri tjedna (Morton, 1969c; Ackerman i sur., 1994). Prvi stadij je trohofora koja zatim prelazi u stadij veliger ličinke. Slijedeći stadij je pediveliger ličinka koja se spusti na dno i prihvati bisusnim nitima za čvrstu podlogu. Nakon pričvršćivanja započinje metamorfoza iz pediveliger u postveliger ličinku koja je prijelazni stadij prema juvenilnim jedinkama (Ackerman i sur., 1994). Juvenilna jedinka se zatim odvoji od podloge i traži novu lokaciju za prihvaćanje bisusnim nitima, gdje trajno i ostaje (Ackerman i sur., 1994; Claudi i Mackie, 1994). Juvenilna jedinka postaje adultna unutar prve godine života. Prosječan životni vijek vrste *D. polymorpha* u Europi je 4 do 5 godina, no može živjeti i do 7 godina (Stanczykowska, 1997), dok u Sjevernoj Americi živi 1,5 do 2 godine (Mackie i sur., 1989).

Populacije odraslih školjkaša su najgušće u jezerima u litoralnoj i sublitoralnoj zoni na dubini od 2 do 12 metara (Stanczykowska, 1977). U Štetinskom jezeru (Poljska) utvrđena je gustoća od 114 000 jedinki/m² (Wiktor, 1963). Na umjetno postavljenim betonskim podlogama u akumulacijskom jezeru Dubrava, na dubini od 5 metara, zabilježena je gustoća od 164 408 jedinki/m², dok je na dubini od 10 metra gustoća iznosila 80 741 jedinki/m² (Erben i sur., 2000). Populacija postiže maksimum gustoće 5 godina od pojavljivanja u nekom ekosustavu (Stanczykowska, 1977; Mackie i Schloesser, 1996).



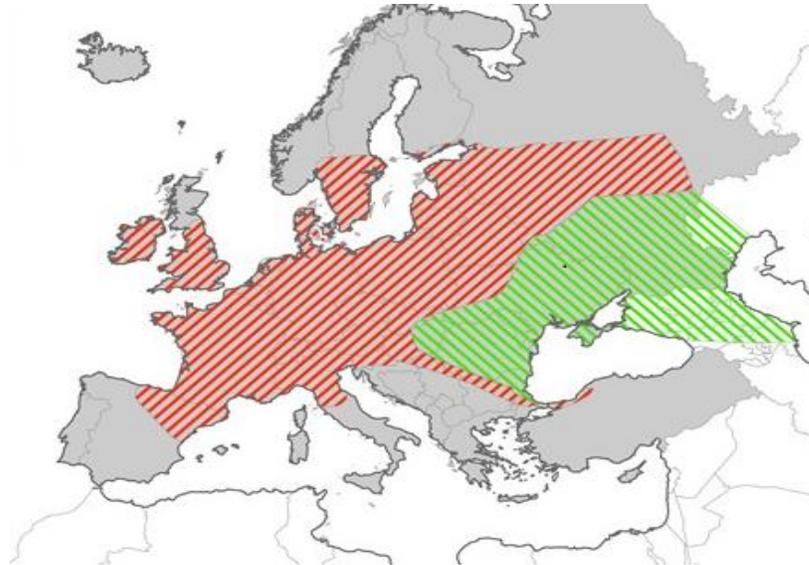
Slika 4. Životni ciklus vrste *D. polymorpha* (preuzeto s: <http://invasivemusselcollaborative.net/files/Gilroy-and-Wright-2016.pdf>).

1.1.6 GEOGRAFSKA RASPROSTRANJENOST

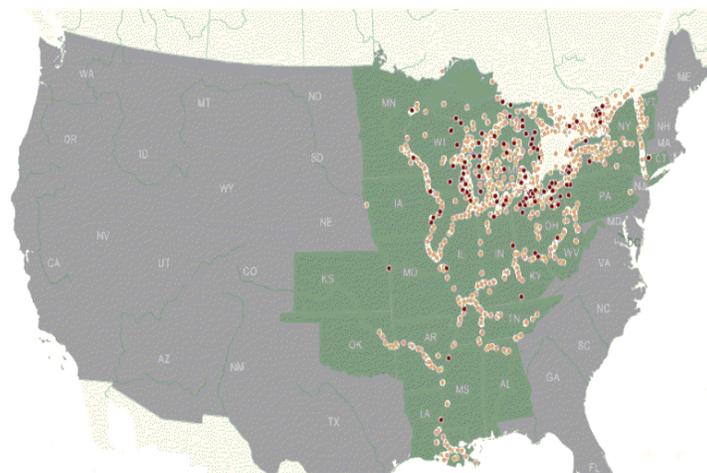
Paleozoološka istraživanja pokazuju da se za vrijeme pliocena vrsta *D. polymorpha* pojavljivala u centralnoj Europi i duž rijeke Volge. Nakon zadnjeg ledenog doba vrsta je nestala iz većeg dijela Europe, a zadržala se samo na području Azovskog i Crnog mora te Kaspijskog jezera (Wiktor, 1963).

Plovidba i izgradnja kanala u 19. stoljeću omogućila je širenje ovog školjkaša prema zapadu, gdje se raširio u većini europskih jezera i rijeka (Slika 5). U kasnom 20. stoljeću vrsta je slučajno prenesena u Sjevernu Ameriku putem balastnih voda velikih brodova, gdje je prvi put zabilježena 1985. godine u Velikim jezerima (Hebert i sur., 1989). Trenutno vrsta nastanjuje

područje Velikih jezera, rijeke Mississippi i Hudson i mnoge druge rijeke (Slika 6) (Nalepa i Schloesser, 1993; Neumann i Jenner, 1992; U.S. Geological Survey, 2008).



Slika 5. Geografska rasprostranjenost vrste *D. polymorpha* u Europi (preuzeto s: http://www.europe-alien.org/images/factsheetMaps/60_drepol.jpg).



Slika 6. Geografska rasprostranjenost vrste *D. polymorpha* u Sj. Americi (preuzeto s: http://www.earthwave.org/yahoo_site_admin/assets/images/2001USAzebramusel.283192626_std.gif).

1.2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Vrsta *D. polymorpha* najagresivnija je invazivna vrsta u slatkovodnim staništima, budući da je jedini slatkovodni školjkaš koji se pričvršćuje za čvrstu podlogu u gustim populacijama, te ima planktonski stadij slobodnoplivajuće veliger ličinke. Nakon što se unese na novo stanište, populacija ove vrste brzo raste, a ukupna biomasa populacije može biti do deset puta veća od svih ostalih alohtonih bentoskih beskralješnjaka (Karatayev i sur., 2002).

U Hrvatskoj se ova vrsta počela širiti uzvodno rijekom Dravom tijekom osamdesetih godina prošlog stoljeća, a početkom devedesetih je prvi put pronađena u akumulacijskom jezeru hidroelektrane (HE) Dubrava (Mišetić i sur., 1991). U vrlo kratkom vremenu vrsta je uspostavila guste populacije te svojom brojnošću postala dominantna u ekosustavu akumulacije (Erben i sur., 2000; Lajtner, 2005).

Kako bi se istražio reproduktivni ciklus ove vrste, tijekom 2000. godine provedeno je uzorkovanje jezerske i riječne populacije. Jezerska populacija je uzorkovana u akumulaciji Dubrava na dubini od 3 i 5 metara, a riječna u starom koritu rijeke Drave, nizvodno od akumulacije (Lajtner, 2005). Za potrebe ovog diplomskog rada analizirane su samo ženke uzorkovane od ožujka do kolovoza u akumulaciji Dubrava na dubini od 3 metra.

Osnovni ciljevi ovog rada bili su:

- 1.) istražiti sezonske cikluse rasta oocita i njihovih jezgri;
- 2.) usporediti razvojne stadije gonada s ustanovljenim veličinama oocita;
- 3.) usporediti dobivene podatke s rezultatima prijašnjih istraživanja u rijeci Dravi i akumulacijama Dubrava i Čakovec.

2. MATERIJAL I METODE

2.1 PODRUČJE ISTRAŽIVANJA

Hidroelektrana Dubrava (Slika 7) smještena je na rijeci Dravi i posljednja je u nizu od tri hidroelektrane izgrađene na ovoj rijeci do ušća rijeke Mure. U odnosu na ostale dvije hidroelektrane, brana HE Dubrava je najviša, umjetno jezero najveće, a derivacijski kanal najkraći. Pripremni su radovi započeli 1984. godine, a početak rada HE Dubrava bio je u ožujku 1990. godine.

Vrsta *D. polymorpha* se u akumulacijskom jezeru HE Dubrava pojavila odmah nakon završetka gradnje, točnije krajem osamdesetih i početkom devedesetih godina prošlog stoljeća (Mišetić i sur., 1991). U kratkom vremenskom razdoblju ovi školjkaši su u potpunosti prekrili sve dijelove brane, postrojenja stojarnice i uzrokovali velike problem u protjecanju vode (Erben i sur., 2000).



Slika 7. Hidroelektrana Dubrava na rijeci Dravi (preuzeto s: www.google.hr/maps). Mjesto uzorkovanja označeno je crvenom točkom.

2.2 SKUPLJANJE UZORAKA

Uzorkovanje je obavljeno svakih 35 do 40 dana u vremenskom razdoblju od siječnja do prosinca 2000. godine. Sakupljanje se odvijalo na području akumulacijskog jezera HE Dubrava na dubini od 3 m. Školjkaši su preneseni u laboratorij Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, u plastičnim posudama zajedno s jezerskom vodom.

2.3 IZRADA HISTOLOŠKIH PREPARATA

U laboratoriju su životinje držane u dva protočna akvarija, volumena 100 litara s dekloriranom vodom. Školjkaši su ostavljeni 24 sata u akvarijima i za to vrijeme nisu hranjeni. Za analizu su odabrane jedinke čija je duljina školjke (izmjerena pomičnim mjerilom s točnošću mjerenja 0,1 mm) iznosila 2,55 do 2,65 mm. Nakon mjerenja školjkaši su stavljani na led, te se nakon jednog sata počelo s uzimanjem uzoraka tkiva za histološku analizu. Školjke su pažljivo rastvorene kako bi se izolirala utrobna vreća koja sadržava gonade, želudac, crijevo, probavnu i bisusnu žlijezdu, dio mišića aduktora i stopalo.

Izdvojeno tkivo fiksirano je tijekom 24 h u Bouinovom fiksativu. Nakon fiksacije tkivo je uklopljeno u smjesu parafina i plastične mase, koji se koriste za prožimanje i uklapanje tkiva kod izrade histoloških preparata. Tako pripremljeni parafinski blokovi mogu stajati godinama prije no što se krene s daljnjom obradom. Za potrebe ovog diplomskog rada analizirala sam ženke uzorkovane od ožujka do kolovoza 2000. godine.

Parafinske blokove s uzorcima tkiva rezala sam na rotacijskom mikrotomu (Reichert) na debljinu 10 μ m. Rezove sam prenijela u vodenu kupelj kako bi se izravnali, a potom sam ih nanijela na predmetno stakalce prethodno premazano glicerom i bjelanjkom. Tako priređene histološke preparate sušila sam na sobnoj temperaturi.

Osušene rezove koji sadrže transverzalno izrezane presjeke tkiva bojala sam kombinacijom histoloških boja hemalaun-eozin (HE). Prije bojanja iz rezova treba ukloniti paraplast postupkom deparafiniranja i rehidrirati rezove tkiva provlačeći ih kroz sljedeće otopine:

- 1.) ksilol I (15 min.)
- 2.) ksilol II (15 min.)
- 3.) 100 % etilni alkohol (5 min.)
- 4.) 96 % etilni alkohol (5 min.)

- 5.) 80 % etilni alkohol (5 min.)
- 6.) 70 % etilni alkohol (5 min.)
- 7.) destilirana voda (2 x 5 min.)

Nakon deparafiniranja i rehidriranja slijedilo je bojanje rezova hemalaun-eozinom (Slika 8). Rezove sam najprije uronila u bazičnu boju hemalaun (Mayerova otopina), a zatim u kiselu boju eozin. Hemalaun boji plavo-ljubičasto kisele strukture u stanici, a eozin boji crveno-ružičasto bazične strukture u stanici.

Priprema boje 0,1 %-tni eozin:

0,1 g boje u prahu otopi se u 100 ml 75 %-tnog alkohola. Doda se 2-3 kapi ledene octene kiseline pri čemu boja fosforilira (pH oko 4,5). Ako ima taloga, boju je potrebno filtrirati.

Postupak bojanja HE:

- 1.) hemalaun (Mayerova otopina) (6-10 min.)
- 2.) tekuća voda (2 x 5 min), u drugoj vodi ostaviti i do 20 minuta jer tek u vodi tkivo poprimi boju
- 3.) eozin (2-4 min.)
- 4.) destilirana voda (2 x 5 min.)

Kako bi se pripremili trajni histološki preparati potrebno je iz tkiva potpuno ukloniti vodu postupkom dehidriranja i razbistriti uzorke uranjanjem u ksilol na sljedeći način:

- 1.) 70 % etilni alkohol (5 min.)
- 2.) 80 % etilni alkohol (5 min.)
- 3.) 96 % etilni alkohol (5 min.)
- 4.) 100 % etilni alkohol (5 min.)
- 5.) ksilol III (5 min.)
- 6.) ksilol IV (5 min.)

Na obojene histološke prereze tkiva na predmetnim stakalcima nakapala sam kanadski balzam i potom poklopila pokrovnicom. Kanadski balzam je prirodna smola neutralnih sastojaka

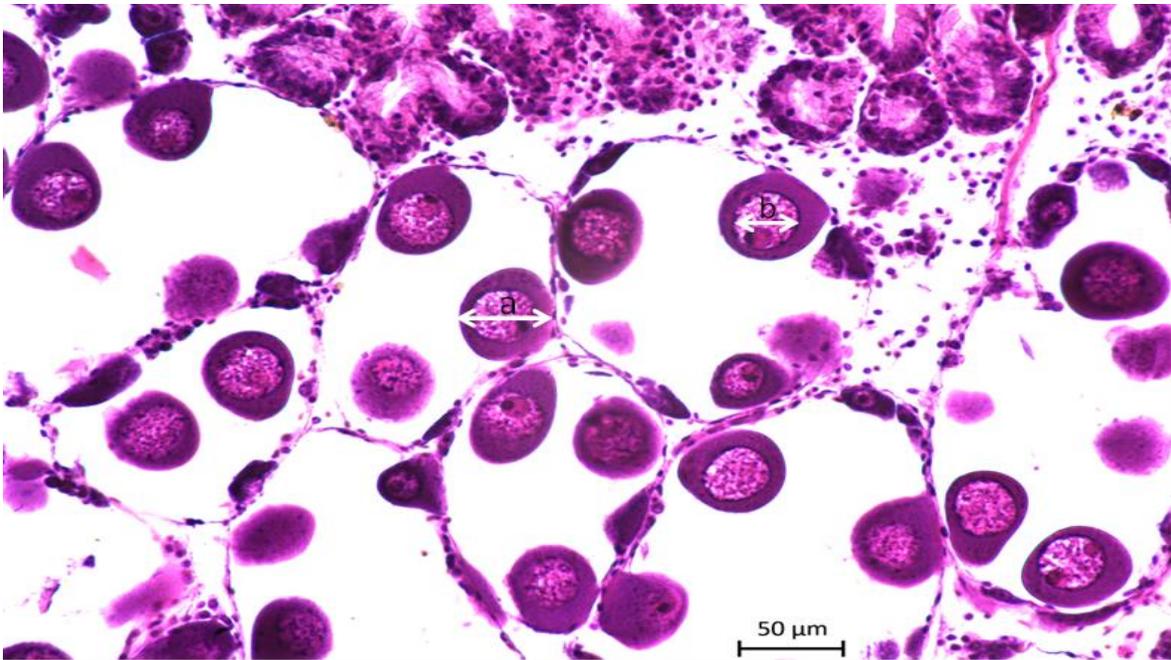
koja ne utječe na kemijski sastav tkiva niti na rezultate bojanja preparata. Tako pripremljeni histološki preparati nakon jednodnevnog sušenja su trajni i spremni za mikroskopiranje.



Slika 8. Prikaz laboratorijske pripreme preparata-dehidriranje kroz niz alkohola, bojanje hemalaun-eozinom (snimila: R. Gračan).

2.4 MORFOMETRIJSKA ANALIZA PREPARATA

Histološka mjerenja izvela sam pomoću digitalne kamere AxioCam ERc 5s (Zeiss) i programa Zen 2 Lite (verzija 2.0, Zeiss). Odabrala sam deset nasumičnih mjesta u jednom ili više rezova po preparatu, koja su fotografirana navedenom digitalnom kamerom pod povećanjem 400x. Pomoću programa Zen 2 Lite izmjerila sam promjere svih vidljivih jezgara jajnih stanica na odabranim vidnim poljima, te promjere čitavih jajnih stanica (koje su sadržavale vidljivu jezgru) (Slika 9).



Slika 9. Prikaz mjerenja promjera oocite (a) i promjera jezgre oocite (b) za vrstu *D. polymorpha*.

2.5 ODREĐIVANJE RAZVOJNIH STADIJA GONADA

Ukupno sam analizirala 25 jedinki te sam procijenila njihovo stanje gonada. Za procjenu razvojnih stadija gonada odabrala sam kriterije prema Gist i sur. (1997) gdje je: 0 – stadij mirovanja; 1 – gametogeneza; 2 – stadij pred mriještenje; 3 – stadij poslije mriještenja (Tablica 1).

Tablica 1. Kriteriji za određivanje razvojnih stadija gonada školjkaša *D. polymorpha* (Gist i sur., 1997).

STADIJ	SJEMENIK	JAJNIK
0 mirovanje	Atrofirani i prazni tubuli; nekoliko manjih spermatogonija s malo citoplazme na rubu tubula.	Atrofirani i prazni tubuli; nekoliko oogonija (većih od spermatogonija) prisutno na rubu folikula zajedno s folikularnim stanicama.
1 gametogeneza	Tubuli ispunjeni nediferenciranim, homogenim stanicama kružno raspoređenim od centra ili vakuoliziranim.	Male (<40 μm) oocite pričvršćene za stijenku tubula. Velike oocite (>40 μm) nisu prisutne.
2 pred mriještenje	Spermatide, združene u strukture slične resicama, pružaju se u lumen tubula; spermatocite smještene na rubu tubula; prisutne neke mejotičke figure.	Velike (>40 μm), nepričvršćene oocite u lumenu tubula brojnije su od malih oocita pričvršćenih za stijenku tubula; jezgra povećana.
3 poslije mriještenja	Spermiji, s repićima, pričvršćeni u resicama slične strukture i slobodni u lumenu, resice odvojene od donjeg zametnog sloja; nisu prisutne mejotičke figure.	Povećani tubuli sadrže mnogo malih (<40 μm) pričvršćenih oocita (reduciranih ili ih nema na kraju sezone); nekoliko velikih (>40 μm) slobodnih oocita u lumenu tubula.

2.7 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Sve vrijednosti izmjerenih promjera prikazala sam kao prosječnu vrijednost, standardnu devijaciju (SD) te minimume i maksimume vrijednosti.

Tip raspodjele podataka testirala sam pomoću Kolmogornov-Smirnov testa. S obzirom da raspodjela podataka za mjerenja oocita i njihovih jezgri nije slijedili normalnu distribuciju podataka (Kolmogornov-Smirnov test, $p < 0,05$) u tim sam analizama koristila neparametrijske testove.

Uz pomoć ANOVA testa i post hoc Bonferroni testa analizirala sam mjesečne razlike u utvrđenim gonadnim stadijima analiziranih jedinki. Pomoću Spearmanove korelacije analizirala

sam odnos izmjerenih promjera oocita i promjera jezgre. Sezonske promjene u promjerima oocita i promjerima jezgara oocita testirala sam pomoću Kruskal-Wallis testa, a kada su promjene bile statistički značajne ($p < 0,05$), dodatno sam koristila post-hoc Mann-Whitney U test. Potencijalne razlike između promjera oocita i jezgri oocita te utvrđenih gonadnih stadija analizirala sam također pomoću Kruskal-Wallis testa, a zatim i pomoću Mann-Whitney U testa. Usporedbu izmjerenih promjera oocita i promjera jezgri u odnosu na prosječni mjesečni gonadni volumen analizirala sam pomoću Spearmanove korelacije.

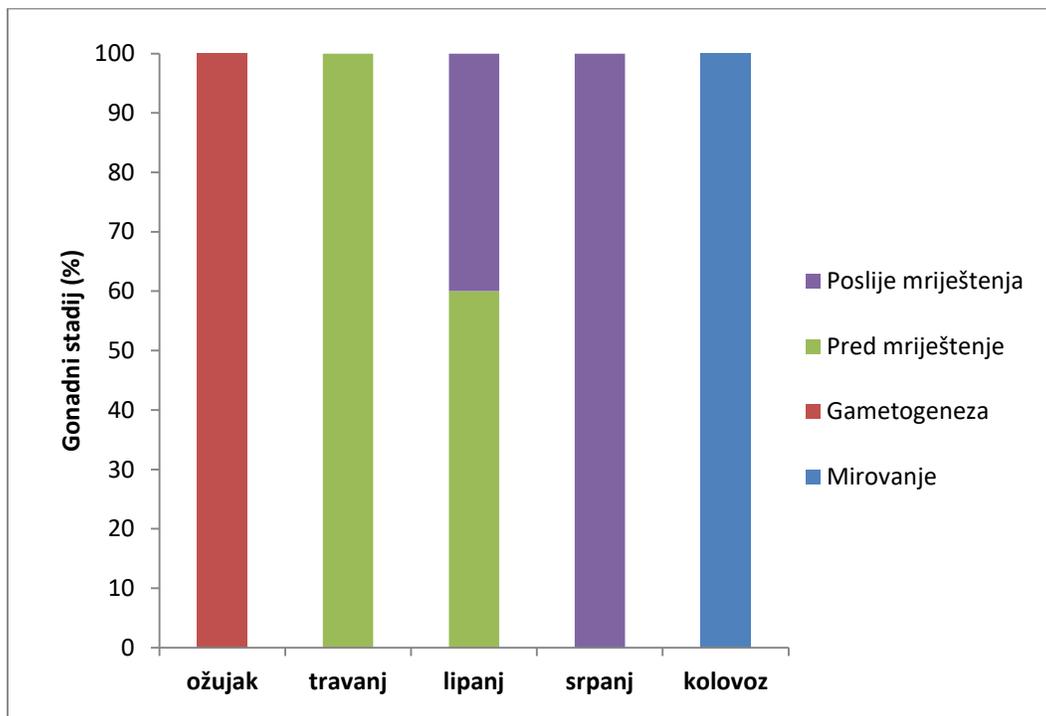
Sve statističke analize radila sam u programu SPSS 17.0 za Windows (SPSS Inc., SAD), a za grafičku obradu podataka koristila sam program Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, 2010).

3. REZULTATI

3.1 RAZVOJNI STADIJI GONADA

Analiza oocita napravljena je na histološkim preparatima 25 ženki vrste *D. polymorpha* iz hidroakumulacije Dubrava uzorkovanih u ožujku, travnju, lipnju, srpnju i kolovozu, u vrijeme gametogeneze i mriještenja školjkaša.

Prema kriterijima iz literature (Tablica 1) utvrđena su četiri stadija - mirovanje, gametogeneza, pred mriještenje i poslije mriještenja. Postotni udio gonadnih stadija prikazan je na Slici 13.



Slika 13. Postotni udio gonadnih stadija analiziranih ženki *D. polymorpha* od ožujka do kolovoza.

U ožujku je zabilježena najaktivnija gametogeneza, pri čemu su se sve analizirane jedinke nalazile u tom stadiju (Slika 14). Ženke prikupljene u travnju i 60 % ženki prikupljenih u lipnju se nalazilo u stadiju pred mriještenje, kada su gonade zrele, a u tubulima jajnika uočavaju se velike nepričvršćene oocite koje su brojnije od malih pričvršćenih oocita (Slika 15). U srpnju su sve analizirane jedinke bile u stadiju poslije mriještenja (Slika 16), dok su u kolovozu sve životinje bile u stadiju mirovanja (Slika 17). Gonadni stadiji određeni su prema prevladavajućim stadijima utvrđenim na histološkim preparatima, pri čemu je vidljivo da su, osim u lipnju, sve životinje bile

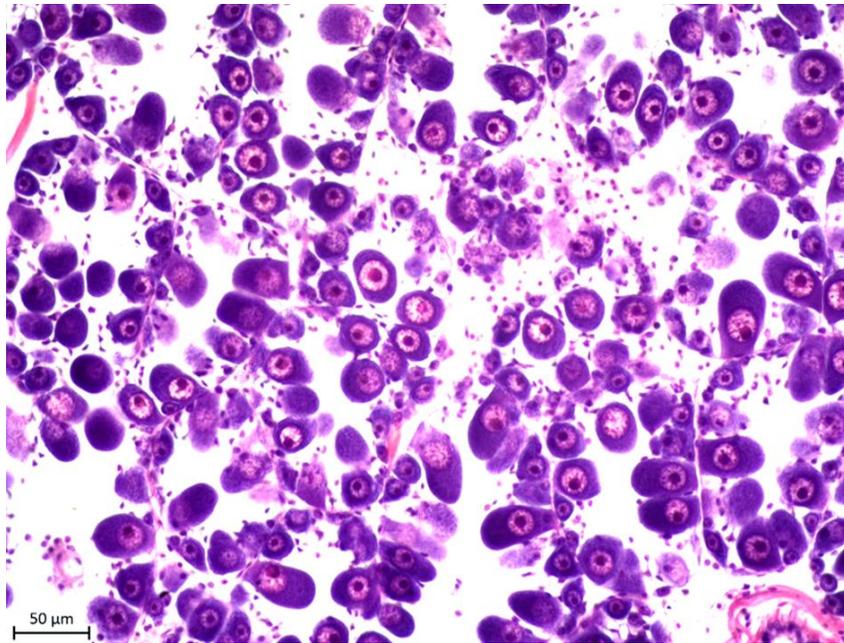
u istom gonadnom stadiju unutar jednoga mjeseca. Ipak, potrebno je naglasiti kako je unutar travnja i srpnja primijećen manji broj stanice koje su pokazivale znakove malo bržeg ili sporijeg razvoja u odnosu na prevladavajuće stanice, što je bilo vidljivo s obzirom na njihovu veličinu. Nadalje, u kolovozu je zabilježen manji broj stanica koje su pokazivale znakove početka gametogeneze. Statistički značajne razlike u utvrđenim gonadnim stadijima između uzorkovanih mjeseci potvrđene su ANOVA testom ($F = 18763$, $p < 0,001$), a rezultati Bonferroni post hoc testa pokazali su statistički značajne razlike između svakog istraživanog mjeseca (Tablica 2).

Tablica 2. Rezultati Bonferroni testa pokazuju razlike u udjelu gonadnih stadija prema mjesecima uzorkovanja (* - statistički značajna razlika, $p < 0,05$).

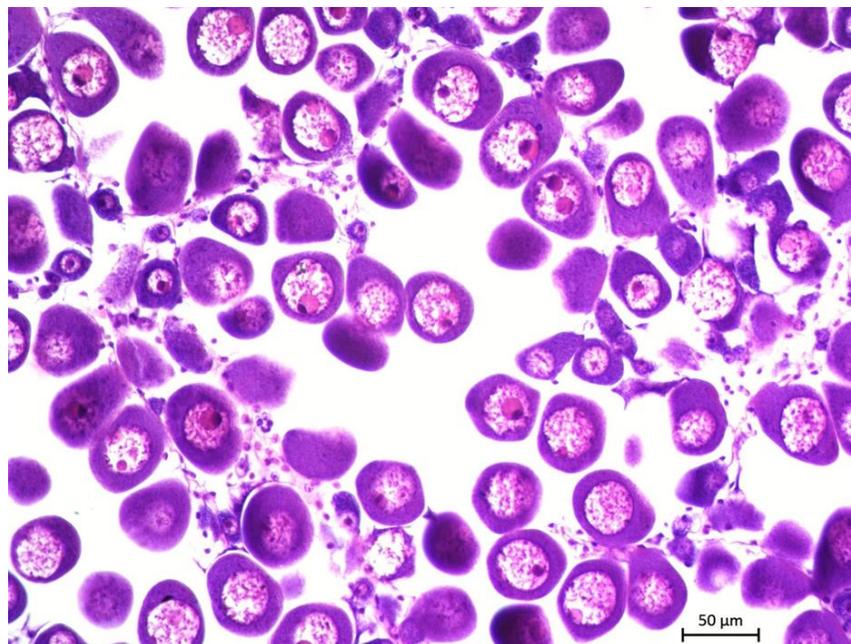
	ožujak		travanj		lipanj		srpanj	
	Razlika u srednjoj vrijednosti	p	Razlika u srednjoj vrijednosti	p	Razlika u srednjoj vrijednosti	p	Razlika u srednjoj vrijednosti	p
travanj	-1,00	<0,001*						
lipanj	-1,37	<0,001*	-0,37	<0,001*				
srpanj	-2,00	<0,001*	-1,00	<0,001*	-0,63	<0,001*		
kolovoz	-3,00	<0,001*	-2,00	<0,001*	-1,63	<0,001*	-1,00	<0,001*

3.2 HISTOMORFOMETRIJSKA ANALIZA JAJNIKA

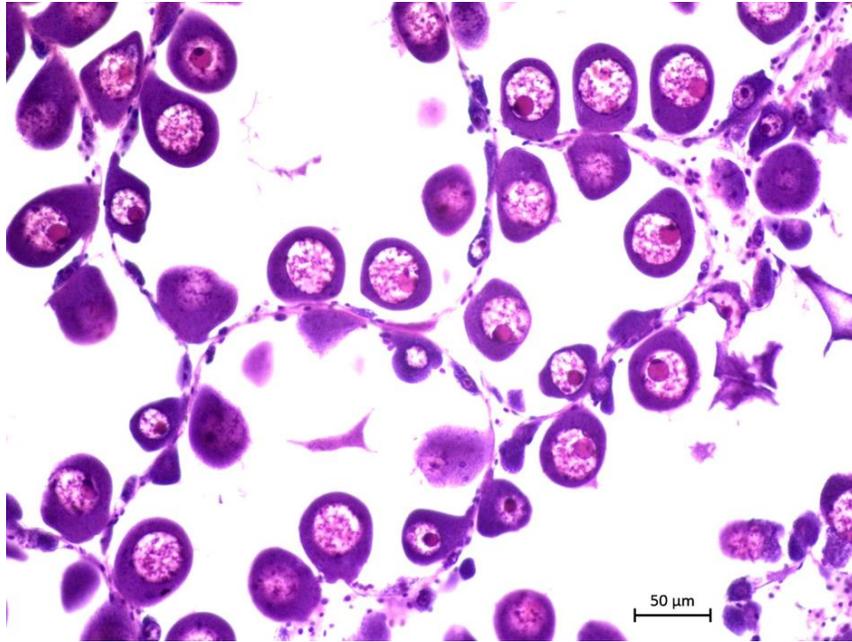
Histomorfometrijska analiza provedena je na ukupno 5190 oocita i isto toliko njihovih jezgi. Oocite svih jedinki uzorkovanih u ožujku bile su manje od 40 μm , oocite su pričvršćene za stijenku tubula, a velike oocite ($>40 \mu\text{m}$) nisu prisutne (Slika 14). U travnju započinje proces mriještenja koji se nastavlja tijekom lipnja i srpnja. Ovaj proces karakteriziran je velikim ($>40 \mu\text{m}$), nepričvršćenim oocitama u lumenu tubula koje su brojnije od malih oocita pričvršćenih za stijenku tubula, a jezgra je povećana (Slike 15 i 16). U kolovozu školjkaš ulazi u stadij mirovanja koji karakteriziraju atrofirani i prazni tubuli bez prisustva oocita (Slika 17), a kod jednog dijela ženki već počinje proces nove gametogeneze.



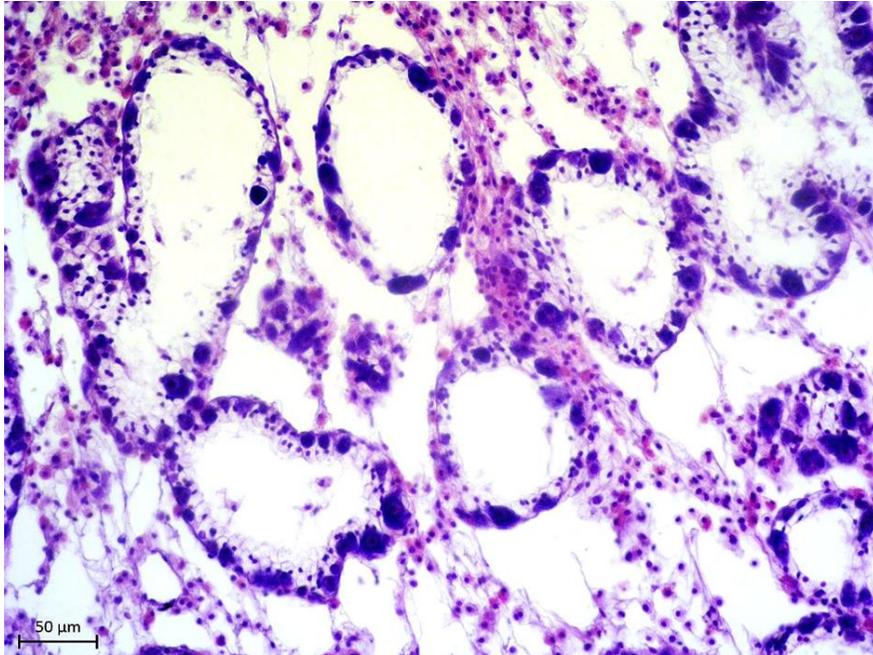
Slika 14. Razvojni stadiji gonada ženki vrste *D. polymorpha*. Gonadni stadij 1 – gametogeneza; ožujak.



Slika 15. Razvojni stadiji gonada ženki vrste *D. polymorpha*. Gonadni stadij 2 – prije mriještenja; travanj.

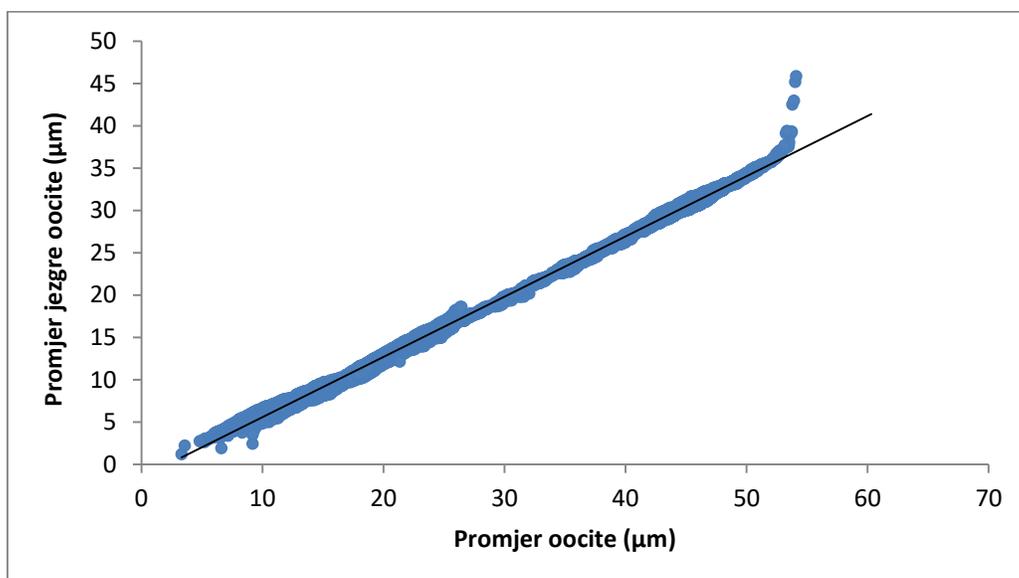


Slika 16. Razvojni stadiji gonada ženki vrste *D. polymorpha*. Gonadni stadij 3 - stadij nakon mriještenja; srpanj.

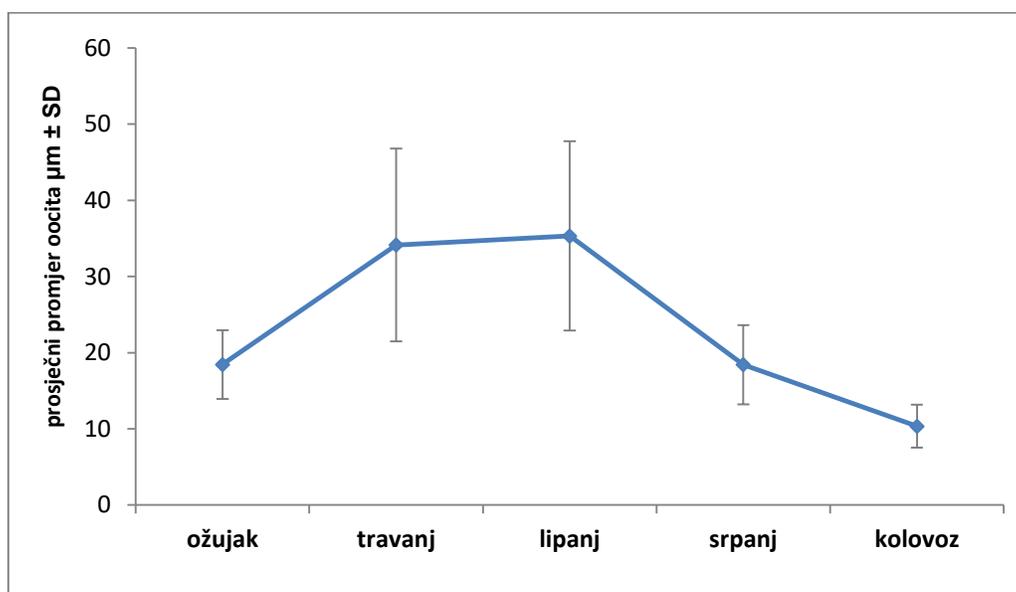


Slika 17. Razvojni stadiji gonada ženki vrste *D. polymorpha*. Gonadni stadij 0 - stadij mirovanja; kolovoz.

Spearmanova neparametrijska korelacija je pokazala da postoji statistički značajan pozitivan trend između rasta promjera oocita i rasta promjera jezgri oocita ($r_s = 0,997$, $p < 0,01$, $N = 5190$; Slika 18).



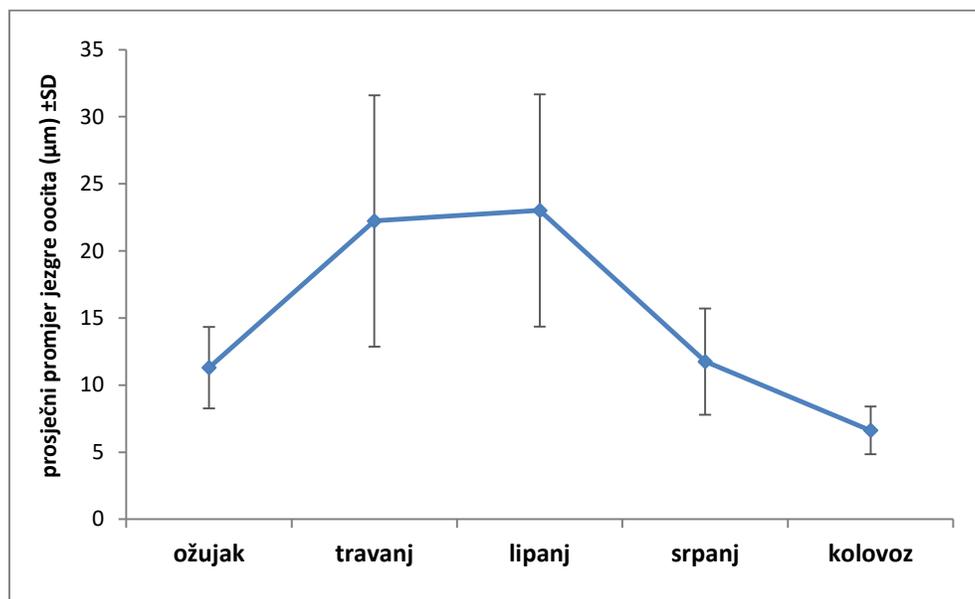
Slika 18. Grafički prikaz odnosa promjera oocita (μm) i promjera jezgri oocita (μm) za vrstu *D. polymorpha*.



Slika 19. Grafički prikaz kretanja prosječnog promjera oocita (μm) sa standardnom devijacijom, prema mjesecima uzorkovanja za vrstu *D. polymorpha*.

Izmjerene vrijednosti promjera oocita i promjera jezgri oocita razlikovale su se između mjeseci uzorkovanja. Dok su prosječne vrijednosti promjera oocita u kolovozu iznosile samo

10,34 μm , najveće prosječne vrijednosti promjera oocita su zabilježene u lipnju i iznosile su 35,32 μm (Slika 19). Najveća izmjerena vrijednost promjera oocita 60,32 μm , i promjera jezgre 45,86 μm , zabilježena je kod ženke uzorkovane u travnju.



Slika 20. Grafički prikaz odnosa prosječnog promjera jezgre oocita (μm) sa standardnom devijacijom (SD) prema mjesecima uzorkovanja za vrstu *D. polymorpha*.

Najveće vrijednosti promjera jezgri oocita zabilježene su u lipnju i iznosile su 23,02 μm , a najmanje vrijednosti promjera jezgri oocita su zabilježene u kolovozu i iznosile su 6,62 μm (Slika 20).

Tablica 4. Rezultati Mann-Whitney U testa analiziraju razlike u promjeru oocita prema mjesecima uzorkovanja vrste *D. polymorpha* (* - statistički značajna razlika, $p < 0,05$). U i p su vrijednosti Mann-Whitney U testa.

Kruskal-Wallis test je pokazao da postoje statistički značajne razlike u promjeru oocita između istraživanih mjeseci ($H = 2679,3$, $p < 0,001$, $DF = 4$), te da postoje razlike u promjeru

	travanj		lipanj		srpanj		kolovoz	
	U	p	U	p	U	p	U	p
ožujak	211371	$p < 0,05^*$	161554	$p < 0,05^*$	516616	$p < 0,05^*$	34469	$p < 0,05^*$
travanj			793439	$p < 0,05^*$	241735	$p < 0,05^*$	17454	$p < 0,05^*$
lipanj					182461	$p < 0,05^*$	11133	$p < 0,05^*$
srpanj							72385	$p < 0,05^*$

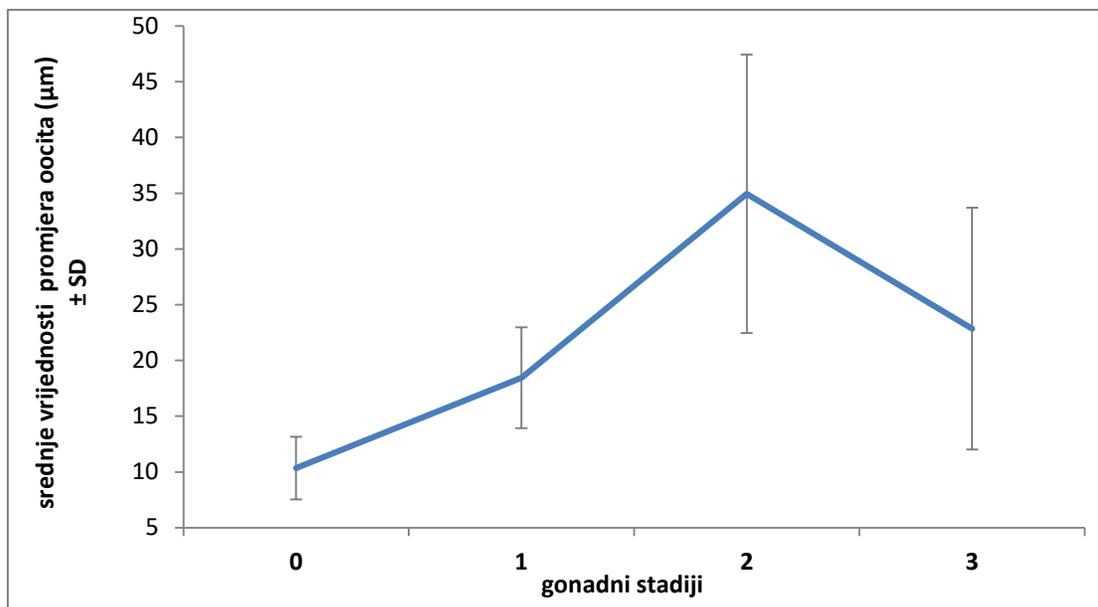
jezgri oocita između istraživanih mjeseci ($H = 2420,1$, $p < 0,001$, $DF = 4$). Rezultati Mann-Whitney U testa s usporedbom izmjerenih promjera oocita između istraživanih mjeseci prikazani su u Tablici 4, dok Tablica 5 prikazuje usporedbu izmjerenih promjera jezgri oocita između istraživanih mjeseci.

Tablica 5. Rezultati Mann-Whitney U testa analiziraju razlike u promjeru jezgri oocita prema mjesecima uzorkovanja vrste *D. polymorpha* (* - statistički značajna razlika, $p < 0,05$). U i p su vrijednosti Mann-Whitney U testa.

	travanj		lipanj		srpanj		kolovoz	
	U	p	U	p	U	p	U	p
ožujak	231861	$p < 0,05^*$	155461	$p < 0,05^*$	463608	$p < 0,05^*$	46038	$p < 0,05^*$
travanj			766143	$p > 0,05$	278150	$p < 0,05^*$	35935	$p < 0,05^*$
lipanj					203235	$p < 0,05^*$	16749	$p < 0,05^*$
srpanj							99848	$p < 0,05^*$

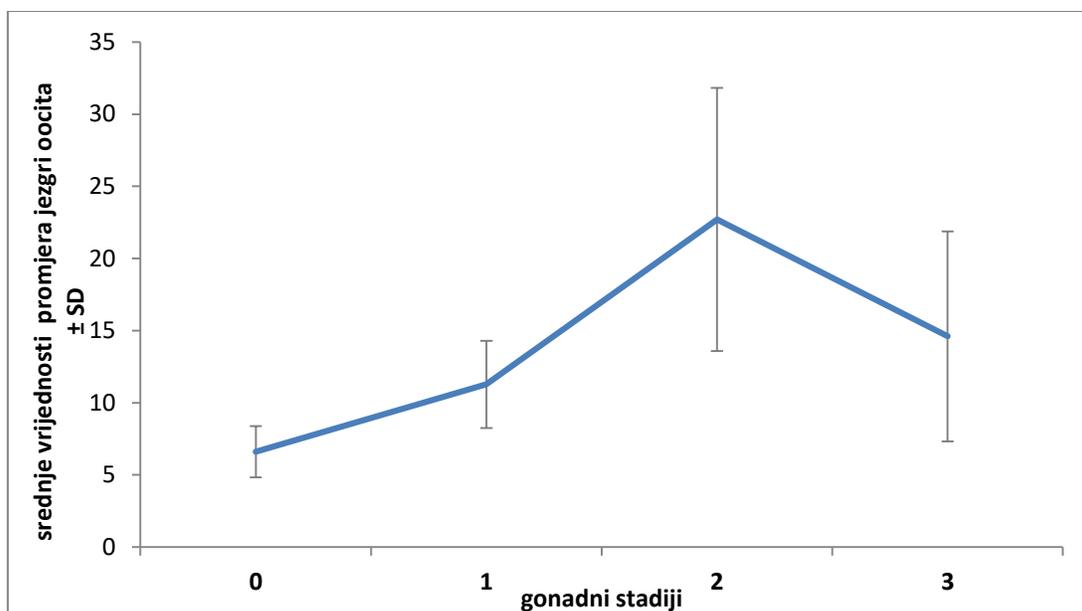
Također je ustanovljeno da se promjeri mjerenih oocita statistički značajno razlikuju s obzirom na ustanovljene gonadne stadije (Kruskal-Wallis $H = 2247,6$, $p < 0,001$, $DF = 4$). Sukladno tome, promjeri izmjerenih jezgri oocita pokazali su statistički značajne razlike između utvrđenih gonadnih stadija (Kruskal-Wallis $H = 2132,2$, $p < 0,001$, $DF = 4$). Najveće oocite

ustanovljene su pri gonadnom stadiju 2, pred mriještenje (srednja vrijednost: $34,94 \pm 12,48 \mu\text{m}$), a najmanje u stadiju mirovanja (srednja vrijednost: $10,34 \pm 2,82 \mu\text{m}$; Slika 21).



Slika 21. Grafički prikaz srednje vrijednosti promjera oocita sa standardnom devijacijom (SD) za gonadne stadije (0 – stadij mirovanja; 1 – gametogeneza; 2 – stadij pred mriještenje; 3 – stadij poslije mriještenja) vrste *D. polymorpha*.

Sličan trend pokazale su i vrijednosti promjera jezgri oocita, pri čemu su najveće jezgre ustanovljene pri gonadnom stadiju 2, pred mriještenje (srednja vrijednost: $22,71 \pm 9,12 \mu\text{m}$), a najmanje u stadiju mirovanja (srednja vrijednost: $6,61 \pm 1,78 \mu\text{m}$; Slika 22).



Slika 22. Grafički prikaz srednje vrijednosti promjera jezgri oocita sa standardnom devijacijom (SD) za gonadne stadije (0 – stadij mirovanja; 1 – gametogeneza; 2 – stadij pred mriještenje; 3 – stadij poslije mriještenja) vrste *D. polymorpha*.

Rezultati Man-Whitney U testa koji statistički analiziraju razlike između vrijednosti promjera oocita i različitih gonadnih stadija (0 – stadij mirovanja; 1 – gametogeneza; 2 – stadij pred mriještenje; 3 – stadij poslije mriještenja) prikazani su u Tablici 6. Rezultati Man-Whitney U testa koji statistički analiziraju razlike između vrijednosti promjera jezgri oocita i različitih gonadnih stadija prikazani su u Tablici 7.

Tablica 6. Rezultati Mann-Whitney U testa analiziraju razlike u promjeru oocita prema gonadnim stadijima (0 – stadij mirovanja; 1 – gametogeneza; 2 – stadij pred mriještenje; 3 – stadij poslije mriještenja) vrste *D. polymorpha* (* - statistički značajna razlika, $p < 0,05$). U i p su vrijednosti Mann-Whitney U testa.

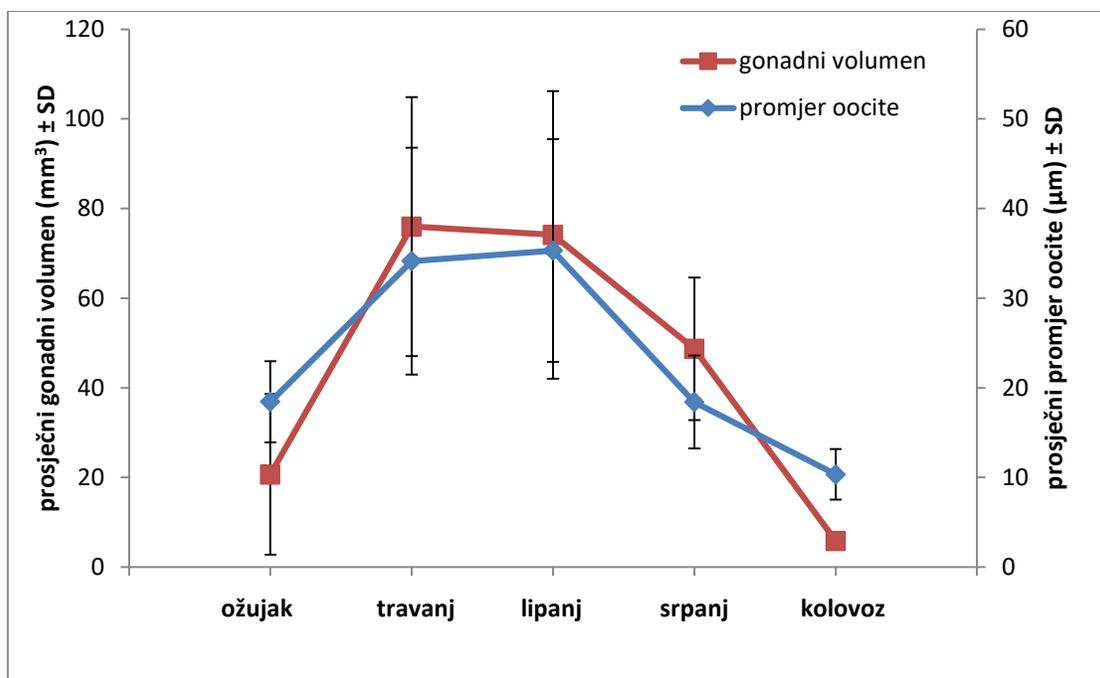
	0		1		2	
	U	p	U	p	U	p
1	35491	<0,001*				
2	22829	<0,001*	293163	<0,001*		
3	79003	<0,001*	593941	<0,001*	785544	<0,001*

Tablica 7. Rezultati Mann-Whitney U testa analiziraju razlike u promjeru jezgri oocita prema gonadnim stadijima (0 – stadij mirovanja; 1 – gametogeneza; 2 – stadij pred mriještenje; 3 – stadij poslije mriještenja) vrste *D. polymorpha* (* - statistički značajna razlika, $p < 0,05$). U i p su vrijednosti Mann-Whitney U testa.

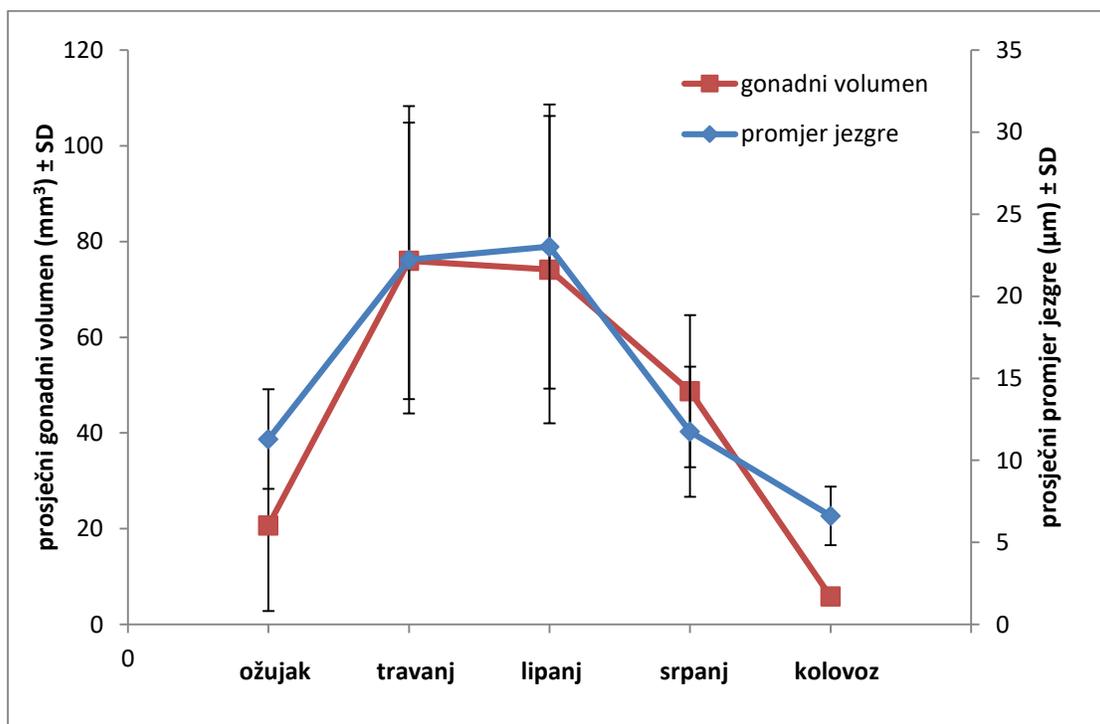
	0		1		2	
	U	p	U	p	U	p
1	47970	<0,001*				
2	45221	<0,001*	323783	<0,001*		
3	110603	<0,001*	542345	<0,001*	834835	<0,001*

3.3. USPOREDBA GONADNOG VOLUMENA I VELIČINE OOCITA

Podaci za gonadni volumen preuzeti su od Eršek (2011). Usporedba izmjerenih promjera oocita u odnosu na izmjerene prosječne mjesečne gonadne volumene pokazala je značajnu pozitivnu korelaciju ($r_s = 0,651$, $p < 0,05$). Sličan rezultat dobiven je i usporedbom izmjerenih promjera jezgri oocita u odnosu na izmjerene prosječne mjesečne gonadne volumene ($r_s = 0,621$, $p < 0,05$). Rezultati ovoga odnosa prikazani su na Slikama 23 i 24.



Slika 23. Usporedba prosječnih gonadnih volumena i prosječnih promjera oocita za vrstu *D. polymorpha*.



Slika 24. Usporedba prosječnih gonadnih volumena i prosječnih promjera jezgri oocita za vrstu *D. polymorpha*.

4. RASPRAVA

Poznato je da se mekušci mogu razmnožavati na dva načina. Jedan od njih je godišnji reproduktivni ciklus koji je karakteriziran mriještenjem koje se obično odvija u proljetnim mjesecima, dok je za drugi značajno da se životinje mriješte tijekom cijelom godine (Mackie, 1984). Prema literaturnim navodima, vrsta *D. polymorpha* pripada u prvu skupinu, odnosno ima jednogodišnji reproduktivni ciklus (Heard i Gucket, 1970; Walz, 1978; Borcharding, 1991; Neumann i sur., 1993). Značajka takvog ciklusa je da se gametogeneza odvija tijekom zime i ranog proljeća, a mriješćenje počinje u kasno proljeće i ljeto što sam potvrdila istraživanjima reproduktivnog ciklusa ove vrste u akumulaciji Dubrava.

Za opis razvojnih stadija gonada odabrala sam klasifikaciju prema Gist i sur. (1997), a detaljno je objašnjena u poglavlju Materijali i metode (Tablica 1). Analizirala sam histološke preparate 25 ženki uzorkovanih u akumulaciji Dubrava na dubini od tri metra, u ožujku, travnju, lipnju, srpnju i kolovozu 2000. godine.

Rezultati mog istraživanja su pokazali da su sve ženke u ožujku bile u stadiju gametogeneze. Tijekom proljeća je slijedio daljnji razvoj gonada, a u travnju započinje proces mriještenja koji se nastavlja tijekom lipnja i srpnja. Analiza koju sam provela na ženkama uzorkovanim u kolovozu pokazala je da školjkaši ulaze u stadij mirovanja, no kod nekih ženki je u jednom dijelu jajnika uočena nova gametogeneza. Do sličnih rezultata je došla Lajtner (2005). Naime, jednogodišnja istraživanja koja je autorica provela tijekom 2000. godine u akumulaciji Dubrava (na dubini od pet metara) i u starom koritu rijeke Drave, pokazala su da gametogeneza počinje u jesen i nastavlja se tijekom zime no do početka gametogeneze, kod manjeg broja školjkaša, dolazi već u kolovozu. Do samog procesa mriještenja u akumulaciji Dubrava došlo je u travnju, dok je u rijeci Dravi proces mriještenja započeo nešto kasnije, u svibnju. Školjkaše u stadiju mirovanja autorica je u akumulaciji Dubrava zabilježila već u srpnju, a navedeni stadij je kod nekih školjkaša trajao sve do siječnja. Najveći broj školjkaša u stadiju mirovanja, na obje postaje, Lajtner (2005) je uočila u listopadu.

I drugi autori koji su istraživali reproduktivni ciklus ove vrste došli su do sličnih zaključaka. Gist i sur. (1997) navode kako jedinke iz jezera Erie i rijeke Ohio ulaze u stadij mirovanja tijekom rujna ili listopada, a Borcharding (1991) navodi da početak stadija mirovanja započinje kod jedinki u kolovozu i traje do listopada. Stadij mirovanja gonada prisutan je i kod drugih školjkaša, npr. vrste *Mytilus edulis* (Chipperfield 1953) i *Ostrea edulis* (Loosanoff, 1962). Heard i Guckert (1970) naglašavaju da reproduktivna sezona vrste *D. polymorpha* završava u listopadu, ali odmah započinje nova. Rani razvoj gameta usko se poklapa sa završetkom prethodne sezone mriješta,

pa tubuli sadrže i gamete ostale od prethodnog ciklusa, kao i one razvijene na početku nove sezone. Borchering (1991) navodi da se gametogeneza odvija tijekom zimskih mjeseci, a školjkaše u stadiju kasne gametogeneze nalazi u proljetnim mjesecima.

Poznato je da su glavni ekološki čimbenici koji utječu na početak mriještenja vrste *D. polymorpha* dovoljna količina hrane i temperatura vode iznad 12 °C (Borchering, 1991; Haag i Garton, 1992), a vrhunac mriještenja se odvija kod temperature vode od 15 do 17 °C (Pathy, 1994; Claudi i Mackie, 1994). U ranije navedenom istraživanju Lajtner (2005) navodi da je u travnju 2000. godine temperatura vode u akumulacijskom jezeru Dubrava prešla 12 °C, a vrijednosti klorofila *a* su bile na najvišoj razini, što objašnjava i moje rezultate.

Istraživanje reproduktivnog ciklusa vrste *D. polymorpha* u akumulaciji Čakovec, izgrađenoj također na rijeci Dravi, provela je Penić (2010). Autorica je analizirala razvoj gonada jedinki uzorkovanih od svibnja do listopada 2006. godine. Za razliku od mojih rezultata, autorica je utvrdila da je do mriještenja došlo u lipnju i početkom srpnja, što je potvrđeno porastom broja jedinki koje su bile u stadiju poslije mriještenja. Stadij mirovanja gonada uočila je kod manjeg broja ženki već u kolovozu. Proces nove gametogeneze počeo je u rujnu i nastavio se tijekom listopada. Kasnije mriještenje koje je utvrđeno u ovom istraživanju, u odnosu na moje rezultate, mogu objasniti lošijim vremenskim prilikama i niskim vrijednostima temperature vode koje su zabilježene te godine u proljetnim mjesecima (Erben i sur., 2007).

Sazrijevanje gonada kontroliraju i neki unutarnji čimbenici, koji uključuju neurotransmiter serotonin koji je pronađen u ganglijima i gonadama školjkaša (Ram i sur., 1992). Direktno apliciranje ovog hormona u školjkaše potiče sazrijevanje gonada i mriještenje (Fong i sur., 1994). Rezultati istraživanja su pokazali da ovaj hormon ne djeluje jednako na mužjake i na ženke. Za razliku od mužjaka kod kojih je primjena serotonina dovodi do sazrijevanja i mriještenja jedinki, kod ženki ovaj hormon uzrokuje izbacivanje nezrelih jaja (Ram i sur., 1993). Budući da je *D. polymorpha* invazivna vrsta koja uzrokuje velike ekonomske štete (Claudi i Mackie, 1994) upravo ovo svojstvo ima primjenu u kontroli populacija ovog školjkaša. Ram i sur. (1993) navode da oštećenja živčanog sustava mogu potpuno zaustaviti ili odgoditi mriještenje, a isto vrijedi i za teške metale i organska zagađivala (Mantecca i sur., 2003).

Budući da su gonade školjkaša smještene u utrobnoj vreći u blizini probavne žlijezde, nemoguće ih je izvaditi i kvantificirati na taj način. Stoga je u ovom diplomskom radu primjenjena metoda po Borcheringu (1990,1991). Primjenom računalnog programa Zen 2 Lite analizirala sam 10 histoloških snimaka po životinji, na kojima sam izmjerila ukupno 5190 oocita i isto toliko njihovih jezgri. Izmjerene vrijednosti promjera oocita i promjera jezgri oocita razlikovale su se po

mjesecima uzorkovanja. U ožujku, za koji je značajno da su sve jedinke bile u stadiju gametogeneze, izmjerene oocite bile su manje od 40 μm dok velike oocite nisu pronađene. U travnju su zabilježene zrele oocite, veće od 40 μm , koje su se nalazile u lumenu tubula i bile su brojnije od malih oocita pričvršćenih za stijenu tubula. U lipnju je zabilježena najveća prosječna vrijednost promjera oocita koja je iznosila 35,32 μm . Ova vrijednost proizlazi iz toga što su se jedinke nalazile u stadijima prije i poslije mriještenja koji su karakterizirani velikim oocitama. Najmanja prosječna vrijednost promjera oocita, 10,34 μm , utvrđena je u kolovozu kad su se jedinke nalazile u stadiju mirovanja, a u nekima od njih je počeo proces nove gametogeneze.

U većini znanstvenih istraživanja o reproduktivnom ciklusu *D. polymorpha* sazrijevanje gonada se također pratilo mjerenjem veličine oocita i njihovih jezgri (Antheunisse, 1963; Breitig, 1965; Borcharding, 1991; Haag i Garton, 1992; Dorgelo i Kraak, 1993). Antheunisse (1963) navodi da su vrijednosti zrelih oocita i njihovih jezgri u rasponu 60-90 μm , odnosno 35-55 μm . Moji rezultati su pokazali da je najveća izmjerena vrijednost promjera oocita 60,32 μm , i promjera jezgre 45,86 μm , zabilježena u mjesecu travnju, a razlike u vrijednostima u odnosu na Antheunisse (1963) mogu se objasniti drugačijim tehnikama mjerenja primjenjenim u ova dva istraživanja.

Izmjerene vrijednosti oocita i njihovih jezgri usporedila sam s vrijednostima gonadnog volumena koji je u istoj populaciji izmjerila Eršek (2011). Utvrdila sam da je veličina oocita i njihovih jezgri proporcionalna vrijednosti gonadnog volumena. Najviše vrijednosti gonadnog volumena kao i promjera oocita i njihovih jezgri zabilježila sam u travnju kad su sve ženke bile u stadiju pred mriještenje. Nakon mriještenja gonadni volumen pada što se posebno ističe u srpnju kad se većina jedinki izmrijestila, te u kolovozu kad se jedinke nalaze u stadiju mirovanja. Do istih zaključaka u svom je radu došla Lajtner (2005).

Borcharding (1992) navodi da broj oocita tijekom godine varira od 310 000 do 1 610 000, sa srednjom vrijednosti od 900 000 za ženku duljine školjke od 24 mm. Na temelju višegodišnjih istraživanja, autor je zaključio da broj oocita jako varira od godine do godine, ali i između različitih postaja u istoj godini. Nešto niže vrijednosti u svom je radu zabilježila Lajtner (2005). Kod ženke uzorkovane u rijeci Dravi u travnju 2000. godine (duljine školjke 25,9 mm) izmjerila je vrijednost od 801 977 oocita, a u istom je mjesecu izmjerila i prosječno najviše oocita, 688 964. U kolovozu, kad se najveći dio školjkaša već izmrijestio, utvrdila je najmanje oocita, 35 624. Ranija istraživanja (Stanczykowska, 1977) su pokazivala da je broj gameta koje godišnje stvara jedna ženka znatno manji, od 30 000 do 40 000, međutim metode koje su korištene u tim istraživanjima nisu bile prikladne, pa su i rezultati neusporedivi.

Oslobađanje gameta je najčešće vrlo sinhroniziran proces koji se odvija kroz jedan do dva tjedna (Nichols, 1996). Walz (1978) navodi da se *D. polymorpha* može mrijestiti više puta u sezoni. Prema Borcharding (1991) tri su moguća objašnjenja ovog procesa. Prvo, sve oocite se istovremeno razvijaju i sazrijevaju no samo mriještenje se odvija u nekoliko odvojenih procesa. Drugo, oocite se ne razvijaju i ne sazrijevaju sve zajedno nego u nakupinama (kohortama) i tako se i mrijeste. Treće, sve oocite se počinju istovremeno razvijati, a onda samo sukcesivne kohorte sazrijevaju i mrijeste se. Rezultati mog istraživanja upućuju na to da se kod vrste *D. polymorpha* u akumulaciji Dubrava najvjerojatnije radi o trećoj mogućnosti. Naime, histološka analiza jajnika je pokazala da su u pojedinim dijelovima jajnika bile prisutne oocite u stadiju razvoja dok su se u drugom dijelu već izmrijestile. Do istih je zaključaka došla i Lajtner (2005). Preklapanje procesa sazrijevanja i samog mriještenja uočio je i Borcharding (1991) što je objasnio time što u nekim dijelovima gonade oocite sazrijevaju kasnije. Isti autor navodi da je to prvi put da je takav fenomen uočen kod vrste s izrazito velikim brojem oocita. Slični rezultati poznati su i kod vrsta *Modiolus modiolus* (Brown, 1984) i *Tapes rhomboides* (Morvan i Ansell, 1988). Višegodišnja istraživanja (Antheunisse, 1963; Nichols, 1991) kao i jednogodišnje studije (Garton i Haag, 1993) su pokazale da školjkaši mogu nositi zrele gamete kroz dulje vremensko razdoblje sve dok se ne steknu povoljni uvjeti za njihovo mriještenje.

5. ZAKLJUČCI

1. U ožujku su sve proučavane jedinke u stadiju gametogeneze, a karakteristične su male (<40 μm) oocite pričvršćene za stijenkku tubula. U travnju započinje proces mrijesta i nastavlja se tijekom lipnja i srpnja, prisutne su velike (>40 μm), nepričvršćene oocite u lumenu tubula koje su brojnije od malih oocita pričvršćenih za stijenkku tubula, a jezgra je povećana. U kolovozu školjkaši ulaze u stadij mirovanja koji karakteriziraju atrofirani i prazni tubuli, a kod nekih jedinki počinje proces nove gametogeneze.
2. Ukupno je izmjereno 5190 oocita i isto toliko njihovih jezgri. Promjeri izmjerenih oocita i jezgri oocita razlikovali su se obzirom na gonadne stadije. Najveće prosječne vrijednosti promjera oocita i njihovih jezgri ustanovljene su u gonadnom stadiju pred mriještenje, odnosno u lipnju (35,32 μm ; 23,02 μm), dok su najmanje prosječne vrijednosti utvrđene kod ženki u stadiju mirovanja, u mjesecu kolovozu (10,34 μm ; 6,62 μm).
3. Testiranjem sezonske dinamike utvrđenih gonadnih stadija u istraživanih ženki, utvrđena je statistički značajna razlika (ANOVA, $p < 0,05$) između mjeseci uzorkovanja, pri čemu postoje razlike između svih analiziranih mjeseci.
4. Spearmanova neparametrijska korelacija je pokazala da postoji statistički značajan pozitivan trend između rasta promjera oocita i rasta promjera jezgri oocita što ukazuje na sinkroniziranost procesa njihovog razvoja odnosno sazrijevanja.
5. Kruskal-Wallis test je pokazao da postoje statistički značajne razlike u promjeru oocita i njihovih jezgri kako između istraživanih mjeseci tako i s obzirom na ustanovljene gonadne stadije. Usporedba izmjerenih promjera oocita i njihovih jezgri u odnosu na izmjerene prosječne mjesečne gonadne volumene pokazala je značajnu pozitivnu korelaciju.
6. Utvrđene reproduktivne značajke ove vrste ne razlikuju se značajno od dosadašnjih istraživanja u rijeci Dravi i akumulaciji Dubrava, dok se manje razlike u odnosu na akumulaciju Čakovec mogu objasniti okolišnim čimbenicima, prvenstveno temperaturom vode.

6. LITERATURA

1. Ackerman, J. D., Sim, B., Nichols, S. J., Claudi, R. (1994): A review of the early life history of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): comparisons with marine bivalves. *Can J Zool* 72: 1169-1179.
2. Antheunisse, L. J. (1963): Neurosecretory phenomena in zebra mussel *Dreissena polymorpha* Pallas. *Arch Néerl Zool* 15: 237-314.
3. Bacchetta, R., Mantecca, P., Vailati, G. (2001): Reproductive behaviour of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* in Italy: A comparison between two populations. *Arch Hydrobiol* 151: 247-262.
4. Bastviken, D. T. E, Caraco, N. F., Cole, J. J. (1998): Experimental measurements of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) impacts on phytoplankton community composition. *Freshwat Biol* 39: 375-386.
5. Baxter, J. M. (1983): Annual variation in soft-body dry weight, reproductive cycle and sex ratios in populations of *Patella vulgata* at adjacent sites in the Orkney Islands. *Mar Biol* 76: 149-157.
6. Borcharding, J. (1991): The annual reproductive cycle of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* Pallas in lakes. *Oecologia* 87: 208-218.
7. Borcharding, J. (1992): Morphometric changes in relation to annual reproductive cycle in *Dreissena polymorpha* - a prerequisite for biomonitoring studies with zebra mussels. U: Neumann D, Jenner H. A. (ur.): *The Zebra Mussel Dreissena polymorpha: Ecology, Biological Monitoring and First Applications in the Water Quality Management*. *Limnologie Aktuell*, vol 4, Gustav Fischer, Stuttgart str 87-99.
8. Bowman, M. F., Bailey, R. C. (1998): Upper pH tolerance limit of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Can J Zool* 76: 2119-23.
9. Breitig, G. (1965): Beiträge zur Biologie, Verbreitung und Bekämpfung von *Dreissena polymorpha* (Pall.) 1771 (Lam.). Ph D Thesis, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, Universität zu Grieswald, 131 str.
10. Brown, R. A. (1984): Geographical variations in the reproduction of the horse mussel, *Modiolus modiolus* (Mollusca: Bivalvia) *J Mar Biol Ass UK* 64: 751-770.
11. Carlton, J. T. (1993): Dispersal mechanisms of the zebra mussel. U: Nalepa, T. F., Schloesser D. W. (ur.): *Zebra mussels: Biology, Impacts, and Control*. Lewis Publishers, Boca Raton, str. 677-697.

12. Chipperfield, P. N. J. (1953): Observations on the breeding and settlement of *Mytilus edulis* in British waters. J Mar Biol Ass UK 32: 449-475.
13. Claudi, R., Mackie, G. L. (1994): Practical manual for zebra mussel monitoring and control. Lewis Publishers, Boca Raton, 227. str.
14. Davids, C., Kraak, M. H. S. (1993): Trematode parasites of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) U: Nalepa, T. F., Schloesser, D. W. (ur.): Zebra mussels: Biology, Impacts, and Control. Lewis Publishers, Boca Raton, str. 749-759.
15. Davis, J. P., Wilson, J. G. (1983): Seasonal changes in tissue weight and biochemical composition of the bivalve *Nucula turgida* in Dublin Bay with reference to gametogenesis. Neth J. Sea Res 17: 84-95.
16. Denson, D. R., Wang, S. Y. (1993): Histological observations on the reproductive cycle of the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. American Zoologist 33:49A.
17. Domagala, J. (1997): Annual reproductive cycle of the females of *Dreissena polymorpha* (Pall.) from lake Inulec. Pol Arch Hydrobiol 44:467-475.
18. Dorgelo, J., Kraak, M. H. S. (1993): Seasonal variation in tissue dry biomass and its relative ash and organic carbon and nitrogen content in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas). Arch Hydrobiol 127: 409-421.
19. Erben, R., Lajtner, J., Lucić, A., Maguire, I., Klobučar, G. I. V. (2000): Attachment of the zebra mussel on the artificial substrates in the reservoir Dubrava (River Drava, Croatia). Limnological reports, 33rd Conference, Osijek, Croatia. Internat Assoc Danube Res 33: 225-231.
20. Erben, R., Lajtner, J., Lucić, A., Maguire, I., Hudina, S., Ivančić, Z., Buhin, J., Tarnik, T. (2007): Sagledavanje rješavanja problema naseljavanja školjkaša *Dreissena polymorpha* na čvrste podloge i pronalaženje metoda za njihovo uklanjanje iz sustava PP HE Sjever. Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 123 str.
21. Eršek, M. (2011): Morfometrijske značajke gonadnog ciklusa školjkaša *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771). Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, 44 str.
22. Fong, P. P., Kyozyuka, K., Abdelghani, H., Hardege, J. D., Ram, J. I. (1994): In vivo and in vitro induction of germinal vesicle breakdown in a freshwater bivalve, the zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas). J Exp Zool 269: 467-474.
23. Giamberini, L., Pihan J-C. (1996): The pericardial glands of the zebra mussel: Ultrastructure and implication in lead detoxification process. Bio Cell 86: 59-65.

24. Gist, D. H., Miller, M. C., Brence, W. A. (1997): Annual reproductive cycle of the zebra mussel in the Ohio River: A comparison with Lake Erie. *Arch Hydrobiol* 138: 365-379.
25. Griffiths, R. W. (1993): Effects of Zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) on the benthic fauna of Lake St. Clair. U: Nalepa, T. F.; Schloesser, D. W. (ur.): Zebra mussels: Biology, Impacts, and Control. Lewis Publishers, Boca Raton, 415-437 str.
26. Haag, W. R., Garton, D. W. (1992): Synchronous spawning in a recently established population of mussel, *Dreissena polymorpha*, in western Lake Erie, USA. *Hydrobiologia* 234: 103-110.
27. Heard, W. H., Guckert, R. H. (1970): A re-evaluation of the recent Unionacea (Pelecypoda) of North America, *Malacologia* 10: 333-355 str.
28. Hebert, P. D. N., Muncaster, B.W., Mackie, G. L. (1989): Ecological and genetic studies on *Dreissena polymorpha* (Pallas): a new mollusc in the Great Lakes. *Can J Fish Aquat Sci* 46: 1587-1591.
29. Juhel, G, Culloty, S. C. O'Riordan, R. M., O'Connor, J. O., De Faoite, L., McNamara, R. (2003): A histological study of the gametogenic cycle of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) in Lough Derg, Ireland. *J Moll Stud* 69: 365-373.
30. Karatayev, A. Y. (1997): The effects of *Dreissena polymorpha* (Pallas) invasion on aquatic communities in eastern Europe. *J Shellfish Res* 16: 187-203.
31. Karatayev, A. Y., Burlakova, L. E., Padilla, D. K. (1998): Physical factors that limit the distribution and abundance of *Dreissena polymorpha* (Pall.). *J Shell Res* 17: 1219-1235.
32. Lajtner, J. (2005): Reproductivni ciklus školjkaša *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) u rijeci Dravi. Sveučilište u Zagrebu, 134 str.
33. Lajtner, J., Lucić, A., Marušić, M., Erben, R. (2008): The effects of the trematode *Bucephalus polymorphus* on the reproductive cycle of the zebra mussel *Dreissena polymorpha* in the Drava River. *Acta Parasitol* 53: 85-92.
34. Lowe, R. L., Pillsbury, R. W. (1995): Shifts in benthic algal community structure and function following the appearance of Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in Saginaw Bay, Lake Huron. *J Great Lakes Res* 21: 558-566.
35. Maclsaac, H. J., Rocha, R. (1995): Effects of suspended clay on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) faeces and pseudofaeces production. *Arch Hydrobiol* 135: 53-64.
36. Maclsaac, H. J. (1996): Potential abiotic and biotic impacts of Zebra mussels on the inland waters of North America. *Am Zool* 36: 87-299.

37. Mackie, G. L. (1984): Bivalves. U: Wilbur, K. M. (ur): The Mollusca. Vol 7. Reproduction. Academic Press, str. 351-418.
38. Mackie, G. L., Gibbon, B., Muncaster, B., Gray, I. (1989): Zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): A synthesis of European experiences and preview for North America. BAR Environmental, Queens Printer for Ontario.
39. Mackie, G. L. (1991): Biology of the exotic zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, in relation to native bivalves and its potential impact in Lake St. Clair. Hydrobiologia 219: 251-268.
40. Mackie, G. L., Schloesser, D. W. (1996): Comparative Biology of Zebra Mussels in Europe and North America: An Overview. Am Zool 36: 244-258.
41. Mantecca, P., Vailati, G., Bacchetta, R. (2003): Histological studies on the zebra mussel *Dreissena polymorpha* reproduction from a DDT contaminated area in Lake Maggiore (N. Italy). Arch Hydrobiol 158: 233-248.
42. Martyniak, A., Jerzyk, M. S., Adamek, Z. (1987): The food of bream (*Abramis brama*) in the Pierzchaly Reservoir (Poland). Folia Zool 36: 273-280.
43. Mišetić, S., Mrakovčić, M., Habeković, D., Popović, J., Turk, M., Tomašković, N., Fašaić, G. (1991): Fizikalno-kemijske, biološke i ihtiološke značajke nadzemnih voda hidroenergetskog sustava HE Varaždin, HE Čakovec i HE Dubrava u godini 1990. Institut za ribnjačarstvo, Zagreb, 98 str.
44. Molloy, D. P., Karatayev, A. Y., Burlakova, L. E., Kurandina, D. P., Laruelle, F. (1997): Natural enemies of zebra mussels: predators, parasites, and ecological competitors. Rev Fish Sci. 5: 27-97.
45. Morton, B. S. (1969a): Studies on the biology of *Dreissena polymorpha* Pall. I. General anatomy and morphology. Proc Malacol Soc London 38: 301-321.
46. Morton, B. S. (1969b): Studies on the biology of *Dreissena polymorpha*. II. Correlation of rhythms of feeding, digestion and excretion. Proc Malacol Soc London 38: 401-414.
47. Morton, B. S. (1969c): Studies on the biology of *Dreissena polymorpha* Pall. III. Population dynamics. Proc Malacol Soc London 38: 471-482.
48. Morton, B. S. (1993): The anatomy of *Dreissena polymorpha* and the evolution and success of the heteromyarian form in the Dreissenoidea. U: Nalepa, T. F., Schloesser, D. W. (ur.): Zebra mussels: Biology, Impacts, and Control. Lewis Publishers, Boca Raton, str. 185-216.
49. Morvan, C., Ansell, A. D. (1988): Stereological methods applied to reproductive cycle of *Tapes rhomboides*. Mar Biol 97: 355-364.

50. Mišetić, S., Mrakovčić, M, Habeković, D., Popović, J., Turk, M., Tomašković, N., Fašaić, G. (1991): Fizikalno-kemijske, biološke i ihtiološke značajke nadzemnih voda hidroenergetskog sustava HE Varaždin, HE Čakovec i HE Dubrava u godini 1990. Institut za ribnjačarstvo, Zagreb, 98 str.
51. Neumann, D., Borcharding, J., Jantz, B. (1993): Growth and seasonal reproduction of *Dreissena polymorpha* in the Rhine River and adjacent waters. U: Nalepa, T. F., Schloesser, D. W. (ur.): Zebra mussels: Biology, Impacts, and Control. Lewis Publishers, Boca Raton, str. 95-110.
52. Nichols, S. J. (1993): Spawning of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and rearing of veligers under laboratory conditions. U: Nalepa, T. F., Schloesser, D. W. (ur.): Zebra mussels: Biology, Impacts, and Control. Lewis Publishers, Boca Raton, str. 315-329.
53. Pathy, D. A. (1994): The life history and demography of zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, populations in Lake St. Clair, Lake Erie, and Lake Ontario (Michigan, Ohio, Pennsylvania, New York). M Sc Thesis. University of Guelph (Canada).
54. Penić, T. (2010): Reproductivni ciklus školjkaša *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) u hidroakumulaciji Čakovec. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, 46 str.
55. Pflieger, V. (1990): A field guide in colour to Molluscs. Aventium nakladatelstvi, Prag, str. 186-187.
56. Ram, J. L., Fong, P. P., Croll, R. P., Nichols, S. J., Wall, D. (1992): The zebra mussel (*D. polymorpha*), a new pest in North America: reproductive mechanisms as possible targets of control strategies. Invert Reprod Dev 22: 77-86.
57. Ram, J. L., Nichols, S. J. (1993): Chemical regulation of spawning in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) U: Nalepa TF, Schloesser DW (ur.): Zebra mussels: Biology, Impacts, and Control. Lewis Publishers, Boca Raton, str. 307-314.
58. Roberts, L. (1990): Zebra Mussel Invasion Threatens US Waters. Science 249:1370-1374.
59. Romeis, B. (1968): Mikroskopische technik. 16 Aufl Oldenbourg, München, 695 str.
60. Silverman, H., Lynn, J. W., Dietz, T. H. (1996): Particle Capture by the Gills of *Dreissena polymorpha*: Structure and Function of Latero-frontal Cirri. Biol Bull 191: 42-54.
61. Stanczykowska, A. (1977): Ecology of *Dreissena polymorpha* (Pall.) (Bivalvia) in lakes. Pol Arch Hydrobiol 24: 461-530.
62. Švob, M. (1974): Histološke i histokemijske metode. Svjetlost, Sarajevo, 362 str.

63. U.S. Geological Survey (2008): Zebra and Quagga Mussel Page (On-line). Non-indigenous Aquatic Species. <http://nas.er.usgs.gov/taxgroup/mollusks/zebramussel/>., pristupljeno 17. prosinca 2017.
64. Walz, N. (1978): The energy balance of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* Pallas in laboratory experiments and in the Lake Constance. II. Reproduction. Arch Hydrobiol/Suppl. 55: 106-119.
65. Wacker, A., von Alert, E. (2003): Food quality controls reproduction of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). Oecologia 135: 332-338.
66. Wiktor, J. (1963): Research on the ecology of *Dreissena polymorpha* (Pall.) in the Szczecin Lagoon (Zalew Szczecinski). Ekol Pol 11: 275-280.
67. Yonge, C. M., Campbell, J. I. (1968): On the heteromyarian condition in the Bivalvia with special reference to *Dreissena polymorpha* and certain Mytilacea. Transactions of the Royal Society of Edinburgh 68: 21-43.
68. Zhadin, V. (1946): The travelling shell of *Dreissena*. Priroda (Moskva) 5: 29-37.

Izvori slika:

<http://prairiewaters.ca/data/documents/PWWG-AIS-MacIsaac-Sask1.pdf>, pristupljeno 12. siječnja 2017.

<http://invasivemusselcollaborative.net/files/Gilroy-and-Wright-2016.pdf>, pristupljeno 17. siječnja 2017.

http://www.europe-aliens.org/images/factsheetMaps/60_drepol.jpg, pristupljeno 14. prosinca 2016.

http://www.earthwave.org/yahoo_site_admin/assets/images/2001USAzebramussel.283192626_std.gif, pristupljeno 20. prosinca.2016.

www.google.hr/maps, pristupljeno 12. siječnja 2017.

