

# Genska raznolikost gujavica rodova *Aporrectodea* Orley, 1885 i *Lumbricus* Linnaeus, 1758 (Oligochaeta, Annelida) u kontinentalnoj Hrvatskoj

---

Hodak, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:217:043561>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-07**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Lucija Hodak

Genska raznolikost gujavica rodova *Aporrectodea* Örley, 1885 i *Lumbricus* Linnaeus, 1758  
(Oligochaeta, Annelida) u kontinentalnoj Hrvatskoj

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad izrađen je na Zoologijskom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Davorke Hackenberger Kutuzović i prof. dr. sc. Görana Klobučar te pomoćnim voditeljstvom dr. sc. Mišela Jelić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Davorki Hackenberger Kutuzović na voditeljstvu i pomoći pri determinaciji uzoraka.

Posebno zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Göranu Klobučar na ukazanom povjerenju, trudu i stručnom vođenju tijekom pisanja ovog diplomskog rada.

Najveća hvala dr. sc. Mišelu Jelić koji me vodio kroz ovo istraživanje, pomogao mi svojim savjetima, unaprijedio moje znanje u području istraživanja te što je imao strpljenja i vremena za sve moje upite.

Uz to, zahvaljujem i prof. dr. sc. Branimiru Hackenberger Kutuzović koji je zajedno s doc. dr. sc. Davorkom Hackenberger Kutuzović pomogao kod prikupljanja jedinki i tehničkoj provedbi te kolegi Dini De Bona koji mi je također pomogao u pripremi uzoraka za analizu.

Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima i cijeloj obitelji koji su mi bili najveća podrška tijekom studija.

Velika hvala Filipu i svim mojim dragim prijateljima koji su uvijek bili uz mene i učinili ove studentske dane posebnijim.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno–matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

### **Genska raznolikost gujavica rodova *Aporrectodea* Örley, 1885 i *Lumbricus* Linnaeus, 1758 (Oligochaeta, Annelida) u kontinentalnoj Hrvatskoj**

Lucija Hodak

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Fauna gujavica u Hrvatskoj vrlo je raznolika i bogata vrstama, no još uvijek nedovoljno istražena. Mnoga dosadašnja istraživanja pokazala su da je određivanje vrste gujavica (posebice juvenilnih) na temelju morfoloških karakteristika vrlo složeno te da unutar opisanih vrsta vrlo vjerojatno postoji velik broj linija, odnosno podvrsta. Istraživanje je provedeno u svrhu utvrđivanja raznolikosti vrsta unutar rodova *Aporrectodea* i *Lumbricus* na temelju analize gena COI regije mtDNA. Na devet lokaliteta kontinentalne Hrvatske (Zagreb, Samoborsko gorje, Sunger, Kalnik, Ivanščica, Lipik, Orahovica, Osijek i Halaševo) morfološkom determinacijom izdvojeno je 33 jedinki roda *Aporrectodea* i 26 jedinki roda *Lumbricus*. Utvrđeno je ukupno 18 haplotipova za rod *Aporrectodea* i 16 haplotipova za rod *Lumbricus* te su zajedno sa pripadajućim sekvencama za te rodove preuzetima iz BOLD baze podataka (za područje Europe) konstruirani filogenetski odnosi. Molekularno-filogenetičke analize pokazale su da u Hrvatskoj unutar kompleksa vrsta *A. caliginosa* nije zabilježena vrsta *A. caliginosa* sensu stricto te da postoji visoka genska divergencija unutar vrsta *A. rosea*, *L. terrestris* i *L. rubellus* što može upućivati na nove linije ili vrste. Utvrđeno je preklapanje pojedinih haplotipova roda *Lumbricus* iz Hrvatske i Skandinavije što se može povezati s migracijama nakon posljednjeg ledenog doba. Da bi se dobila kompletna slika raznolikosti faune gujavica u Hrvatskoj, potrebno je provesti istraživanja na većem broju uzoraka.

(54 stranica, 14 slika, 4 tablica, 76 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: rod *Aporrectodea*, rod *Lumbricus*, filogenetika, kompleks vrsta, COI

Voditelj 1: Dr. sc. Davorka Hackenberger Kutuzović, doc.

Voditelj 2: Dr. sc. Göran Klobučar, red. prof.

Neposredni voditelj: Dr. sc. Mišel Jelić

Ocjenitelji: 1. Dr. sc. Göran Klobučar, red. prof.

2. Dr. sc. Mirela Sertić Perić, doc.

3. Dr. sc. Vesna Petrović Peroković, izv. prof.

Rad prihvaćen: 4.7.2018.

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation Thesis

### **Genetic variability in earthworms of genera *Aporrectodea* Örley, 1885 and *Lumbricus* Linnaeus, 1758 (Oligochaeta, Annelida) in continental Croatia**

Lucija Hodak

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The earthworm fauna of Croatia is very diverse and rich in species, but still insufficiently explored. Studies have shown that the determination of earthworm species (especially juvenile) on the basis of morphological characteristics is very complex and that large number of lineages, i.e. subspecies can be found within the established species. The study was conducted to determine the diversity of species within the genera *Aporrectodea* and *Lumbricus* using analysis of mtDNA COI gene sequences. Using morphological analysis of collected specimens from nine localities of continental Croatia (Zagreb, Samoborsko gorje, Sunger, Kalnik, Ivanščica, Lipik, Orahovica, Osijek and Halaševno) 33 *Aporrectodea* and 26 *Lumbricus* specimens were chosen for molecular analyses. A total of 18 haplotypes were identified within the *Aporrectodea* genus and 16 haplotypes within *Lumbricus* genus, and phylogenetic relationships were constructed with the sequences from the BOLD database (Europe). Molecular phylogenetic analyses showed that there was no *A. caliginosa* specimens recorded within specimens belonging to *A. caliginosa* complex, while high genetic divergence within the established species *A. rosea*, *L. terrestris* and *L. rubellus* was revealed which may indicate new lineages or species of earthworms. It was found that some haplotypes of *Lumbricus* genus from Croatia and Scandinavia overlap, what can be related to migrations after the last ice age. In order to obtain a complete picture of the variety of earthworm fauna in Croatia, it is necessary to conduct research on larger number of samples.

(54 pages, 14 figures, 4 tables, 76 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: genus *Aporrectodea*, genus *Lumbricus*, phylogenetics, species complex, COI

Supervisor 1: Dr. Davorka Hackenberger Kutuzović, Asst. Prof.

Supervisor 2: Dr. Göran Klobučar, Prof.

Assistant Supervisor: Dr. sc. Mišel Jelić

Reviewers: 1. Dr. Göran Klobučar, Prof.

2. Dr. Mirela Sertić Perić, Asst. Prof.

3. Dr. Vesna Petrović Peroković, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 4.7.2018.

## Sadržaj

Sadržaj .....	6
1. UVOD .....	1
1.1. Ekologija gujavica.....	2
1.2. Koljeno: Annelida (kolutićavci) .....	4
1.3. Razred: Clitellata (pojasnici).....	4
1.4. Podrazred: Oligochaeta (maločetinaši).....	5
1.5. Porodica Lumbricidae .....	6
1.6. Rod <i>Aporrectodea</i> .....	7
1.6.1. Pregled očekivanih vrsta roda <i>Aporrectodea</i> na području istraživanja .....	7
1.7. Rod <i>Lumbricus</i> .....	10
1.7.1. Pregled očekivanih vrsta roda <i>Lumbricus</i> na području istraživanja .....	11
1.8. Molekularna filogenija .....	13
1.8.1. Mitohondrijska DNA (mtDNA) .....	15
1.8.2. Filogenetsko stablo.....	15
1.8.3. Filogenetske mreže.....	19
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	20
3. MATERIJALI I METODE .....	21
3.1. Područje istraživanja .....	21
3.2. Materijali .....	22
3.2.1. Životinjski materijali .....	22
3.2.2. Kemikalije i laboratorijski pribor .....	25
3.3. Metode.....	26
3.3.1. Vanjska morfologija .....	26
3.3.2. Izolacija DNA.....	26
3.3.3. Lančana reakcija polimerazom (engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i> – PCR) .....	27
3.3.4. Elektroforeza .....	27
3.3.5. Sekvenciranje .....	28
3.3.6. Analiza sekvenci.....	28
4. REZULTATI.....	30
4.1. Sravnjivanje nukleotidnih sekvenci.....	30
4.2. Filogenetičke analize sekvenci .....	33
4.2.1. Genska raznolikost gujavica roda <i>Aporrectodea</i> u kontinentalnoj Hrvatskoj u ovom istraživanju .....	33

4.2.2. Genska raznolikost gujavica roda <i>Lumbricus</i> u kontinentalnoj Hrvatskoj u ovom istraživanju .....	37
5. RASPRAVA.....	40
5.1. Genska raznolikost gujavica roda <i>Aporrectodea</i> u kontinentalnoj Hrvatskoj .....	41
5.2. Genska raznolikost gujavica roda <i>Lumbricus</i> u kontinentalnoj Hrvatskoj.....	43
6. ZAKLJUČAK .....	46
7. LITERATURA .....	47
8. ŽIVOTOPIS .....	54



## POPIS KRATICA

DNA	deoksiribonukleinska kiselina
RNA	ribonukleinska kiselina
mtDNA	mitohondrijska DNA
pb	parovi baza
kb	kilobaza
rRNA	ribosomska RNA
NJ	metoda susjednog sparivanja (engl. <i>Neighbor joining</i> )
MP	metoda najveće štedljivosti (engl. <i>Maximum parsimony</i> )
ML	metoda najveće vjerojatnosti (engl. <i>Maximum likelihood</i> )
BA	Bayesova analiza (engl. <i>Bayesian analysis</i> )
COI	podjedinica 1 citokrom C oksidaze
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. <i>Polimerase chain reaction</i> )
UV	ultraljubičasto
dATP	deoksiadenozin trifosfat
dTTP	deoksitimidin trifosfat
dGTP	deoksigvanozin trifosfat
dCTP	deoksicitidin trifosfat

## 1. UVOD

Gujavice pripadaju koljenu Annelida (kolutićavci), razred Clitellata (pojasnici), podrazred Oligochaeta (maločetinaši). One su među najraširenijim i najdominantnijim životinjama koje žive u tlu i imaju najveći udio u biomasi beskralješnjaka u tlima umjerenih kopnenih ekosustava (Lavelle i Spain, 2001; Domínguez i sur., 2018). Smatraju se najvažnijim organizmima tla jer imaju značajan učinak na njegova fizikalna, kemijska i biološka svojstva te igraju ključnu ulogu u modifikaciji strukture tla, ubrzavaju raspadanje organske tvari i promet hranjivih tvari (Lee, 1985; Edwards i Bohlen, 1996; Domínguez i sur., 2018). Zbog svoje iznimne ekološke važnosti, gujavice su među najbolje istraženim životinjskim skupinama. U svijetu je opisano više od 3000 vrsta, a korištenje molekularno-filogenetičkih analiza upućuje na postojanje novih vrsta i podvrsta. Postoji niz vrsta na globalnoj razini koje su zapravo više od jedne vrste, ali taksonomski još nisu opisane. Često se svrstavaju u kompleks vrsta što znači da molekularne analize ukazuju da se određena, već opisana vrsta gujavice zapravo sastoji od nekoliko vrsta i/ili podvrsta.

Porodica Lumbricidae jedna je od najpoznatijih i najbrojnijih skupina maločetinaša zbog svoje dominacije u europskoj fauni. Razlog tome je i njihovo ubrzano širenje svijetom uzrokovano antropogenim djelovanjem. Unutar porodice Lumbricidae izdvajaju se rodovi *Lumbricus* i *Aporrectodea* kao heterogene skupine s velikim brojem vrsta. Fauna Hrvatske vrlo je bogata i raznolika gujavicama, ali relativno slabo istraжена. Od objavljivanja monografije gujavica Balkana koju je objavio Mršić (1991) do danas provedeno je tek nekoliko istraživanja raznolikosti faune gujavica u Hrvatskoj (Hackenberger Kutuzović, 2012; Hackenberger Kutuzović i Hackenberger Kutuzović, 2013). Prema Michaelsenu (1903) i Černosvitovu (1935) smatra se da je za vrijeme ledenog doba prvobitna fauna Lumbricidae bila uništena na područjima koja su bila prekrivena ledom. S obzirom da područje Balkanskog poluotoka, uključujući i teritorij Republike Hrvatske nije bilo zahvaćeno oledbom, fauna gujavice ostala je očuvana i održala visok stupanj bioraznolikosti (Hewitt, 1999; Halavuk, 2013) što je rezultiralo visokim udjelom endemskih vrsta (Omodeo, 1952; Stojanović i sur., 2008). Na temelju dosadašnjih preliminarnih istraživanja u kojima je utvrđena relativno velika raznolikost gujavica na ograničenom broju lokaliteta može se pretpostaviti da u Hrvatskoj postoje vrste koje još nisu zabilježene. U Hrvatskoj je do sada zabilježeno 12 vrsta iz roda *Aporrectodea* i 5 vrsta roda *Lumbricus* (Hackenberger Kutuzović i sur. 2015). U kontinentalnom dijelu Hrvatske unutar roda *Aporrectodea* najrasprostranjenija je vrsta

*Aporrectodea rosea* (Savigny, 1826), dok je unutar roda *Lumbricus* najrasprostranjenija vrsta *Lumbricus rubellus* (Hoffmeister, 1843) (Halavuk, 2013). Mnoga nedavna istraživanja na europskoj razini navode postojanje kriptičkih vrsta unutar navedenih rodova, odnosno visoku gensku varijabilnost (James i sur., 2010).

Budući da gujavice imaju značajnu ulogu u ekosustavima, taksonomija i točna identifikacija vrsta neophodna je za većinu ekoloških istraživanja. Problemi u identifikaciji vrsta znatno smanjuju napredak u istraživanju biologije i ekologije gujavica. Identifikacija vrsta pomoću analize DNA može ponuditi rješenje ovog problema i pružiti sredstvo za prepoznavanje ne samo odraslih, već i juvenilnih jedinki, kao i loše očuvanih primjeraka i ostataka dijelova gujavica (Admassu i sur., 2006; Chang i sur., 2009; Porco i sur., 2013). Genska sekvenca koja se najviše koristi za identifikaciju životinjskih vrsta je fragment od oko 700 pb mitohondrijske citokrom C oksidaze podjedinica I gena (COI) (Folmer i sur., 1994; Klarica i sur., 2011).

### **1.1. Ekologija gujavica**

Brojnost gujavica u tlu varira ovisno o staništu, od 10 do nekoliko stotina gujavica po m<sup>2</sup> (Lee, 1985; Halavuk, 2013), a najviše ih ima u tlima koja su bogata organskim tvarima. Nastanile su se diljem svijeta, no rijetko nastanjuju područja u kojim vladaju ekstremni uvjeti, poput područja prekrivenih ledom ili pustinja. Najvažniji čimbenici koji utječu na rasprostranjenost gujavica su vlažnost tla te kvaliteta i količina organske tvari što je u izravnoj vezi s vrstom staništa (Edwards i Bohlen, 1996). Gujavice imaju važnu ulogu u kopnenim ekosustavima te je njihova raznolikost indikator stanja tih ekosustava.

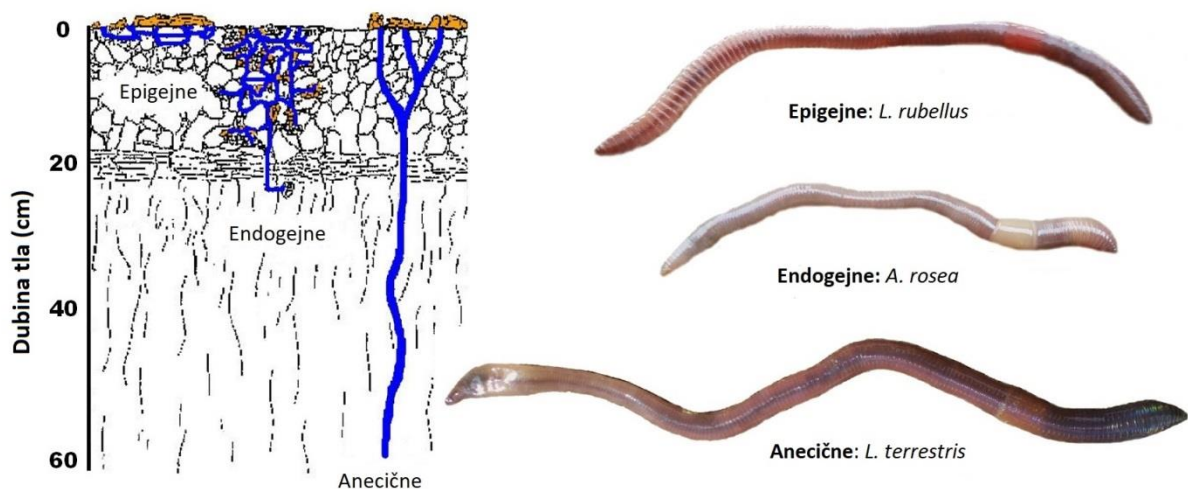
Bouché (1977) i Lee (1985) su podijelili gujavice s obzirom na način života u tri ekološke kategorije - epigejne, endogejne i anecične gujavice (Paoletti, 1999) (Slika 1).

Epigejne gujavice žive na površini tla, ispod biljnih ostataka te ne buše hodnike u tlu. Većinom su tamnijeg obojenja (crvene, ljubičaste ili smeđe) i male veličine. Hrane se lišćem i organskim tvarima. Najpoznatiji predstavnici iz Hrvatske su *Dendrobaena octaedra* (Savigny, 1826), *Dendrodrilus rubidus* (Savigny, 1826), *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) i *L. rubellus*.

Endogejne gujavice žive i hrane se na tlu, ali stvaraju vodoravne hodnike dubine 10 do 15 cm od površine tla. Često su nepigmentirane, no mogu biti i ružičaste, zelene ili plave boje, različitih veličina. Sporo se kreću te su relativno pod niskim pritiskom predacije. Najvažniji

predstavnicu iz Hrvatske su *Allolobophora chlorotica* (Savigny, 1826), *Aporrectodea caliginosa* (Savigny, 1826), *A. rosea* i *Octolasion lacteum* (Rosa, 1884).

Anecične gujavice stvaraju trajne vertikalne hodnike u mineralnom sloju tla do 3 m dubine u kojima žive. Na površini zemlje hrane se lišćem koje povlače u svoje hodnike. Često se na otvoru hodnika može zamijetiti sadržaj probavila koji izbacuju na površinu tla. Vrste iz ove skupine tamnije su boje na dorzalnoj strani tijela, a najpoznatiji predstavnici su *Lumbricus terrestris* (Linnaeus, 1758) i *Aporrectodea longa* (Ude, 1885).



**Slika 1.** Podjela gujavica prema načinu života. Izvor:

<https://www.sciencelearn.org.nz/resources/7-niches-within-earthworms-habitat>.

Gujavice se smatraju inženjerima ekoloških sustava jer svojim načinom života stvaraju slojeve tla i povećavaju poroznost tla. One imaju važnu ulogu u razgradnji mrtve organske tvari iz uginulih životinja i biljaka. Miješanjem slojeva tla povećava se plodnost tla te se organske tvari razlažu u tvari kojima se hrane gljive i bakterije kojih ima više na mjestima gdje su gujavice aktivnije. S druge strane, bakterije i gljive odgovorne su za oslobađanje hranjivih tvari koje postanu dostupne biljkama. Također, izmet koje gujavice izbacuju vrlo je važan za finu strukturu tla.

Gujavice su najaktivnije tijekom proljeća i jeseni. Previsoke ili preniske temperature im ne odgovaraju, stoga tijekom ljeta mogu smanjiti svoju aktivnost dok se ne uspostave povoljni uvjeti, a zimi ulaze u stanje hibernacije. Tijekom cijele godine u populaciji ima više juvenilnih u odnosu na odrasle jedinke.

## 1.2. Koljeno: Annelida (kolutićavci)

Koljeno Annelida obuhvaća dva razreda: Polychaeta (mногоčestinaši) koji su najbrojniji vrstama i Clitellata (pojasnici) među kojima su najbrojnije gujavice, a manji broj pripada pijavicama te branhiobdelama. Mnogočestinaši uglavnom nastanjuju mora, dok većina pojasnika živi u vodama na kopnu i vlažnim staništima.

Kolutićavci su bilateralno simetrične životinje čije je tijelo produljeno i građeno od kolutića. Na kolutićima se mogu nalaziti parapodiji (mногоčestinaši), četine za kretanje (maločestinaši) ili dvije prijanjaljke (pijavice). Na tijelu se razlikuju prostomij (akron), peristomij (kolutići na kojima su usta), trupni kolutić te analni kolutić (pigidij). Na površini se nalazi jednoslojni epiderm koji izlučuje tanku kutikulu. Ispod jednoslojnog epiderma i kutikule nalazi se bazalna lamina i mišićni snopovi od kružnih i uzdužnih mišića koji omogućuju peristaltičke pokrete. Imaju sekundarnu tjelesnu šupljinu, celom, koja je nastala puknućem mezoderma, a nalazi se između kožno-mišićnog sloja i probavila. Puknuća koja su se širila formirale su dvije celomske vrećice. Celom je ispunjen tjelesnom tekućinom koja služi kao potpora organizmu (hidroskelet), prenosi hranjive tvari i metabolite. Mjesto na kojem se celomske vrećice spajaju razvile su se leđna i trbušna mezentera unutar koje su se smjestile krvne žile i živčani sustav. Kolutićavost je jednolika (homonomna metamerija), a između kolutića nalazi se pregrada. Optjecajni sustav im je zatvoren, a organi za izlučivanje (protonefridiji i metanefridiji) su kolutićavo raspoređeni pa se nazivaju i segmentalnim organima (Matoničkin i sur., 2010). Kolutićavci imaju ljestvičast živčani sustav koji se nalazi na trbušnoj strani, dok se na prednjem dijelu tijela nalazi cerebralni ganglij.

## 1.3. Razred: Clitellata (pojasnici)

Unutar razreda razlikuju se dva podrazreda: Oligochaeta (maločestinaši) i Hirudinomorpha (pijavice). Kao što i ime govori, pojasnici su specifični po tome što imaju prisutan pojas ili *clitellum* koji čini niz kolutića na prednjem dijelu tijela sa zadebljanom žljezdanom epidermom. Pojas izlučuje sluz koja pomaže pri kopulaciji i oplodnji te hranjive tvari za jajne stanice i kokon (ovojnicu oko jaja) u koji se pohranjuju oplodena jaja. To područje ističe se kod maločestinaša čitav život, a kod pijavica samo za vrijeme spolne aktivnosti. Dvospolci su, a razlikuju se od mnogočestinaša po tome što nemaju izraženu glavu, parapodije, pipala ni ticala, a neki čak ni četine (pijavice). Mozak se nalazi na prednjim kolutićima tijela. Kolutićavo raspoređena tjelesna šupljina potpuno je razvijena kod

maločetinaša, dok je kod pijavica stisnuta vezivnim tkivom na uske cijevi koje nisu podijeljene (Matonićkin i sur., 2010).

#### **1.4. Podrazred: Oligochaeta (maločetinaši)**

Tijelo maločetinaša građeno je od kolutića čiji broj varira ovisno o vrsti. Na svakom kolutiću nalazi se četiri snopa jednostavnih četina, po dva snopa četina na bočnoj i ventralnoj strani. Broj i oblik četina ovisi o vrsti, kod terestričkih vrsta one su kratke i može ih biti do osam po kolutiću, dok su kod akvatičkih vrsta dugačke. Na prednjem dijelu tijela razlikuje se prostomij ispod kojeg se nalaze usta na peristomiju, nakon čega se kroz nekoliko kolutića proteže pojas koji se nalazi bliže glavi. Kod ovih skupina prisutna je potpuna vanjska i unutrašnja kolutićavost.

Na površini tijela nalazi se tanka kutikula koja prekriva epidermalni sloj stanica sa sluznim žljezdanim stanicama. Ispod epidermalnog sloja nalazi se sloj prstenastih i uzdužnih mišića, dok kolutiće odvajaju celomske pregrade. Svaki kolutić sadrži pore koje se nalaze u žljebovima između kolutića te se kroz njih na površinu tijela izlučuje celomska tekućina koja služi podmazivanju tijela ili odbijanju predatora.

Ovisno o načinu života, maločetinaši se služe peristaltičkim kontrakcijama prilikom puzanja i rovanja. Prilikom gibanja dužina tijela se skraćuje ili povećava, no volumen pojedinog kolutića ostaje stalan. Četine se izvlače pri skraćivanju tijela što omogućuje kretanje prema naprijed (Habdija i sur., 2011).

Maločetinaši imaju ljestvičast živčani sustav što znači da su živčane vrpce ljestvičasto građene i međusobno srasle, a sastoji se od velikog cerebralnog ganglija koji je okoždrijelnim prstenom povezan podždrijelnim ganglijem. Podždrijelni ganglij služi za motoričke i refleksne radnje, a oči im nisu razvijene, već imaju jednostanične fotoreceptore na leđnoj strani tijela u epidermi.

Hrane se detritusom na površini, a organske tvari gutaju dok ruju. Probavilo je jednostavno, započinje ustima koja se nalaze ispod prostomija. Na ždrijelo se nastavlja jednjak koji može posteriorno biti zamijenjen voljom koja služi za spremanje hrane ili mišićnim želucem koji služi za usitnjavanje hrane. Mnoge vrste unutar jednjaka sadrže vapnene žlijezde koje izlučuju kristaliće kalcita za koje se smatra da služe izbacivanju ugljikova(IV) oksida koji je u tlu prisutan u visokim koncentracijama (Habdija i sur., 2011). U

prednji dio crijeva izlučuju se enzimi, dok stražnje crijevo služi za apsorpciju hranjivih tvari. Posljednji kolutić je analni kolutić, pigidij.

Za izlučivanje koriste metanefridijski sustav u kojem se metanefridiji nalaze na bočnim stranama svakog kolutića. Krvotok je zatvoren te se razlučuju dvije krve žile, leđna i trbušna koje su u svakom kolutiću spojene kružnim krvnim žilama. Nemaju srce, već kružne žile koje imaju mogućnost kontrakcije pa se nazivaju lažnim ili bočnim srcima kojih obično ima po pet (Matoničkin i sur., 2010).

Žive u vodama na kopnu ili u vlažnoj zemlji gdje prave cjevaste hodnike, a postoji i nešto morskih i nametničkih vrsta. Izmjena plinova odvija se preko površine tijela, a mali broj ima škrge u obliku izvrata kože na stražnjem dijelu tijela. Dišni pigment je hemoglobin pomoću kojeg se prenosi oko 20% kisika. Nakon kiše gujavice izlaze na površinu jer padne parcijalni tlak kisika, dok vodene vrste podnose niske količine kisika (Habdija i sur., 2011).

Rasplodni sustav gujavica ograničen je na nekoliko kolutića u prednjem dijelu tijela. Dva para sjemenika nastavljaju se u sjemene vrećice s kojima su povezani sjemeni mjehurići. Iz sjemenih mjehurića nastavlja se sjemenovod s otvorima na petnaestom kolutiću kod većine vrsta porodice Lumbricidae. Ženski spolni sustav je manji te ga čini jedan par kratkih jajovoda koji se otvara na četrnaestom kolutiću (ovisno o vrsti). Sjemeni spremišta odvojena su od jajnika i nalaze se na prednjem djelu rasplodnog sustava. Kopulacije se zbiva tokom cijele godine.

## **1.5. Porodica Lumbricidae**

Porodica Lumbricidae je najpoznatija i dobro proučena monofiletska skupina gujavica koja je prirodno rasprostranjena na području Holarktike. Unutar ove porodice opisano je oko 670 vrsta unutar 63 roda (Blakemore, 2009). Većina vrsta i rodova prirodno su rasprostranjeni u Palearktičkoj regiji, a velik broj vrsta unutar ove porodice smatra se peregrinim vrstama što znači da su te vrste široko rasprostranjene i na geografski udaljenim lokacijama (Blakemore, 2009). Gujavice porodice Lumbricidae obično se koriste kao modelni organizmi u istraživanjima ekologije tla, bioraznolikosti, biogeografije, evolucije i ekotoksikologije (Pérez-Losada i sur., 2009). Unatoč njihovom biološkom i ekološkom značaju, taksonomski i evolucijski odnosi još su uvijek predmet rasprave nekih rodova unutar ove porodice (Pérez-Losada i sur., 2011).

Identifikacija odraslih jedinki temelji se na izgledu prostomija, rasporedu kolutića, položaju i obliku pojasa te nekih unutarnjih organa poput sjemenih vrećica ili sjemenih spremišta (Pérez-Losada i sur., 2009). Međutim, ovi morfološki i anatomske karakteri vrlo su varijabilni. Kod gujavica je uočeno da različiti taksoni mogu pokazivati preklapanje većeg broja karaktera što otežava njihovu morfološku determinaciju (Pérez-Losada i sur., 2009). Unutar porodica Lumbricidae, u Hrvatskoj su najčešće vrste *A. rosea*, *O. lacteum*, *L. rubellus*, *Dendrodrilus rubidus rubidus* i *Eiseniella tetraedra* (Savigny, 1826) (Hackenberger Kutuzović i Hackenberger Kutuzović, 2013).

## **1.6. Rod *Aporrectodea***

Gujavice roda *Aporrectodea* čine vrlo heterogenu skupinu s velikim brojem vrsta te su jedne od najzastupljenijih gujavica travnjaka i poljoprivrednih ekosustava Palearktičke regije. Najčešće vrste ove regije su *A. caliginosa*, *A. trapezoides* (Duges, 1828), *A. tuberculata* (Eisen, 1874) i *A. nocturna* (Evans, 1946) koje čine kompleks vrsta *A. caliginosa* (Pérez-Losada i sur., 2009). Ove četiri vrste morfološki su vrlo slične i teško ih je razlikovati zbog njihove morfološke varijabilnosti.

Dužina tijela kao i broj kolutića varira ovisno o vrsti. Neke mogu biti vrlo male, tek 20 mm, dok postoje veće vrste do 500 mm duljine. Pigmentacija nedostaje, ali mogu biti sive, smeđe ili čak ljubičasto obojene. Muški spolni otvor nalazi se na 15. kolutiću, dok se sjemenici nalaze u 10. i 11. kolutiću. Tri ili četiri para sjemenih vrećica smješteni su od 9. do 12. kolutića. Četine su usko sparene, a prostomij je epiloban.

### **1.6.1. Pregled očekivanih vrsta roda *Aporrectodea* na području istraživanja**

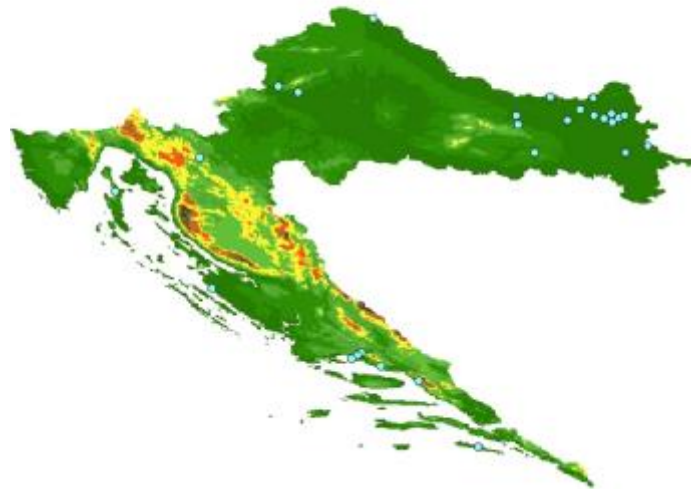
#### **1.6.1.1. *Aporrectodea caliginosa***

*Aporrectodea caliginosa* jedna je od najraširenijih invazivnih vrsta gujavica u području umjerene zone. Smatra se da se antropogenim djelovanjem rasprostranila iz Europe po svim kontinentima osim Antarktike (Shekhovtsov i sur., 2015). Palearktička je vrsta, jedna je od najčešćih gujavica u Hrvatskoj (Slika 2). Jedinke se mogu naći u šumama, na pašnjacima ili u vrtovima, ali i u najsiriromašnijim pjeskovitim tlima. S obzirom na način života, spada u skupinu endogejskih gujavica što znači da se hrani i živi u mineralnom sloju tla gdje stvara vodoravne hodnike. Unutar vrste postoje različiti poliploidni oblici opisani kao



zasebne vrste (Hackenberger Kutuzović i sur., 2015). Novija istraživanja pokazala su da postoji velika genska raznolikost unutar kompleksa vrsta *A. caliginosa* (Pérez-Losada i sur., 2009; Fernández i sur. 2012). Za *A. caliginosa* dokazano je da postoje dvije (Pérez-Losada i sur., 2009; Fernández i sur., 2012) ili čak tri (Porco i sur., 2013) vrlo divergentne genske linije (Klarica i sur., 2011). Determinacija jedinki ove vrste vrlo je zahtjevna te su mnogi znanstvenici određivali nove vrste na osnovu položaja žljezdanih papila što je vrlo nepouzdana s obzirom da se položaj papila mijenja unutar populacije i ovisi o spolnoj aktivnosti jedinke (Hackenberger Kutuzović i sur., 2015).

Dužina tijela može varirati od 59 do 164 mm s oko 100 do 180 kolutića (Mršić, 1991). Slabe su pigmentacije, a boja je smeđa, zelenkasta, siva ili ružičasta. Četine su usko sparene, a prostomij je epiloban i zatvoren. Pojas je sedlastog oblika koji se proteže od 25.-29. do 34.-35. kolutića, dok su pubertetske izbočine u obliku ovalnih kvržica koje mogu biti spojene (Hackenberger Kutuzović i sur., 2015).



**Slika 2.** Geografska rasprostranjenost vrste *A. caliginosa* u Hrvatskoj. Plave točke označavaju područja u kojima je zabilježena ova vrsta. Izvor: Hackenberger Kutuzović i sur. (2015).

### 1.6.1.2. *Aporrectodea rosea*

*Aporrectodea rosea* je nativna palearktička vrsta koja je antropogenim utjecajem raširena diljem svijeta (Europa, Sjeverna i Južna Amerika, Azija i Australija). Kao *A. caliginosa* jedna je od najčešćih vrsta kontinentalne Hrvatske, ali može biti prisutna u području cijele Hrvatske (Slika 3). Jedinke je moguće pronaći u šumama, vrtovima i na pašnjacima. Najviše im odgovara vlažno tlo, no nema sklonosti prema određenom tipu tla (Hackenberger Kutuzović i sur., 2015). Živi i hrani se u mineralnom sloju tla što znači da pripada kategoriji endogejnih vrsta.

Jedinke mogu biti različite veličine, od 20 do 80 mm, a tijelo im se sastoji od 98 do 170 kolutića (Mršić, 1999). Slabo su pigmentirane, ali mogu biti ružičasto obojene na dorzalnom anteriornom djelu. Pojas je sedlastog oblika i proteže se od 23.-26. do 31.-33. kolutića te može biti tamnije obojan, ali i žuti ili narančasti. Prostimij je epiloban, a na dorzalnoj strani lako su uočljive velike leđne pore (Hackenberger Kutuzović i sur., 2015).

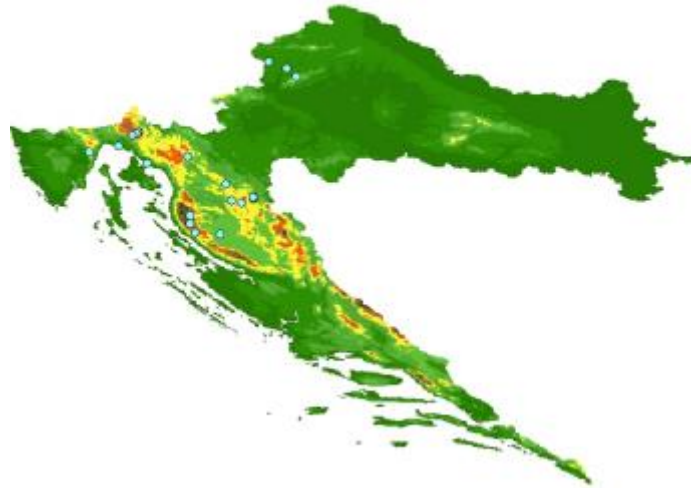


**Slika 3.** Geografska rasprostranjenost vrste *A. rosea* u Hrvatskoj. Plave točke označavaju područja u kojima je zabilježena ova vrsta. Izvor: Hackenberger Kutuzović i sur. (2015).

### 1.6.1.3. *Aporrectodea smaragdina*

*Aporrectodea smaragdina* (Rosa, 1892) ima alpsko-dinarsko-karpatški tip rasprostranjenosti te se nalazi u zapadnom dijelu Hrvatske (Slika 4). Nastanjuje travnjake i vlažne šume te živi u mineralnom sloju tla, ali i ponekad na površini tla pa je stoga epigejna i endogejna vrsta. Mjesto nalaza ove vrste (*locus typicus*) zabilježen je u Austriji (Mršić, 1991).

Dužina tijela varira od 40 do 90 mm, a tijelo se sastoji od 65 do 120 kolutića (Mršić, 1991). Smeđe su ili zelene boje. Pojas je sedlastog oblika i nalazi se od 24.-26. do 33. kolutića, a prostomij je epiloban (Hackenberger Kutuzović i sur., 2015).



**Slika 4.** Geografska rasprostranjenost vrste *A. smaragdina* u Hrvatskoj. Plave točke označavaju područja u kojima je zabilježena ova vrsta. Izvor: Hackenberger Kutuzović i sur. (2015).

### 1.7. Rod *Lumbricus*

Gujavice roda *Lumbricus* pripadaju Palearktičkoj regiji, ali su se antropogenim utjecajem raširile po cijelom svijetu. Unutar roda opisan je nešto manji broj vrsta, a u Hrvatskoj su najbrojnije *L. rubellus* te *L. terrestris* kao tipičan predstavnik gujavica.

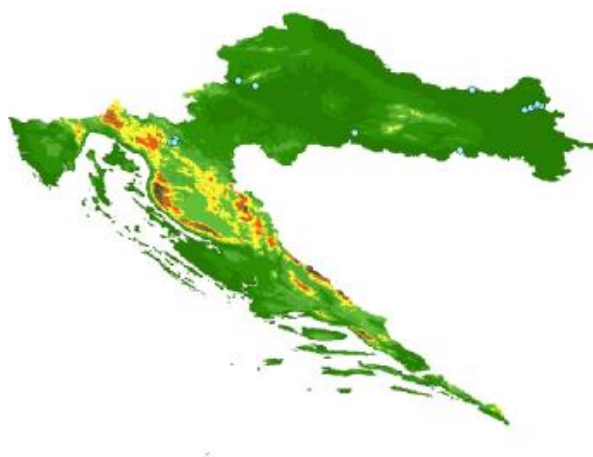
Dužina tijela varira ovisno o vrsti (od 30 do 500 mm) te mogu biti crveno-ljubičaste do ljubičaste boje. Muški spolni otvor nalazi se na 15. kolutiću, dok su sjemenici smješteni u subezofagalnu testikularnu vrećicu. Četine su usko sparene, a prostomij je taniloban.

## 1.7.1. Pregled očekivanih vrsta roda *Lumbricus* na području istraživanja

### 1.7.1.1. *Lumbricus terrestris*

*Lumbricus terrestris* nativna je palearktička invazivna vrsta koja je raširena gotovo po čitavom svijetu. Jedna je od najčešćih vrsta kontinentalne regije (Slika 5), pronađena u alpskoj regiji, ali nedostaju nalazi iz mediteranske regije (Hackenberger Kutuzović i sur., 2015). Smatra se da je vjerojatno nastala tijekom posljednjeg ledenog doba prije 150 000 godina (Bouché, 1969, 1972; Richter, 2010). Jedinke ove vrste stvaraju duboke vertikalne hodnike u mineralnom sloju tla i imaju važnu ulogu u razgradnji otpalog lišća. Jedina je anecična vrsta koja se uspjela rasprostraniti po čitavom svijetu (Hackenberger Kutuzović i sur., 2015). Živi u kultiviranim tlima, a manjim djelom u listopadnim šumama. *L. terrestris* zauzima važno mjesto u nomenklaturi gujavica jer je bila jedna od prvih imenovanih gujavica te ima visoki značaj u biološkoj znanosti i znanstvenoj edukaciji. Koristi se u mnogim istraživanjima anatomije gujavice, kao i fiziologije i ekologije čime je stekla status modelnog organizma (James i sur., 2010).

Jedinke mogu narasti do 300 mm, a tijelo se sastoji od 110 do 180 kolutića. Dorzalno obojenje je crveno do crveno-ljubičasto, a ventralno je žućkasto. Pojas je sedlastog oblika koji se proteže od 31. (32.) do 37. (38.) kolutića, dok je prostomij taniloban (Hackenberger Kutuzović i sur., 2015).

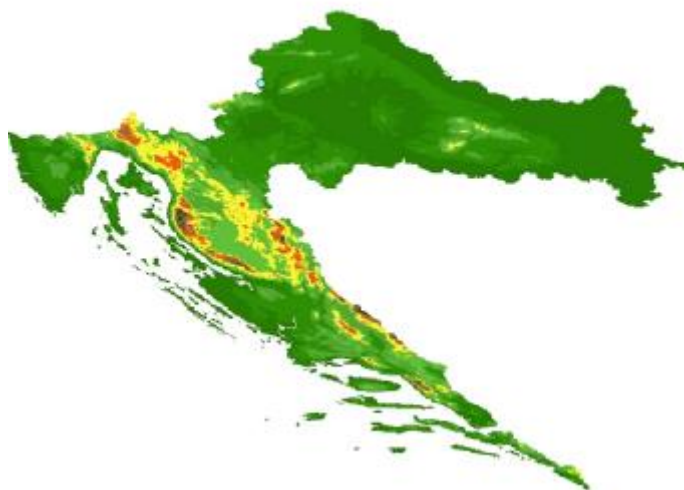


**Slika 5.** Geografska rasprostranjenost vrste *L. terrestris* u Hrvatskoj. Plave točke označavaju područja u kojima je zabilježena ova vrsta. Izvor: Hackenberger Kutuzović i sur. (2015).

### 1.7.1.2. *Lumbricus polyphemus*

*Lumbricus polyphemus* (Fitzinger, 1833) ima srednjoeuropski tip rasprostranjenosti, dok je u Hrvatskoj najrasprostranjenija u kontinentalnoj regiji (Slika 6). Živi u šumama ili kultiviranim tlima u dubokim okomitim hodnicima. Poput vrste *L. terrestris*, ima značajnu ulogu u razgradnji biljnih ostataka. *Locus typicus* ove vrste zabilježen je u Austriji (Beč) (Mršić, 1991).

Tijelo je dugačko od 150 do 450 mm te se sastoji od 90 do 182 kolutića. Jedinke mogu biti crveno-ljubičaste boje, dok su dorzalno vidljive pruge. Pojas je sedlastog oblika koji se proteže od 37.-39. do 43.-47. kolutića. Prostomij je taniloban te nema prisutnih leđnih pora (Hackenberger Kutuzović i sur., 2015).



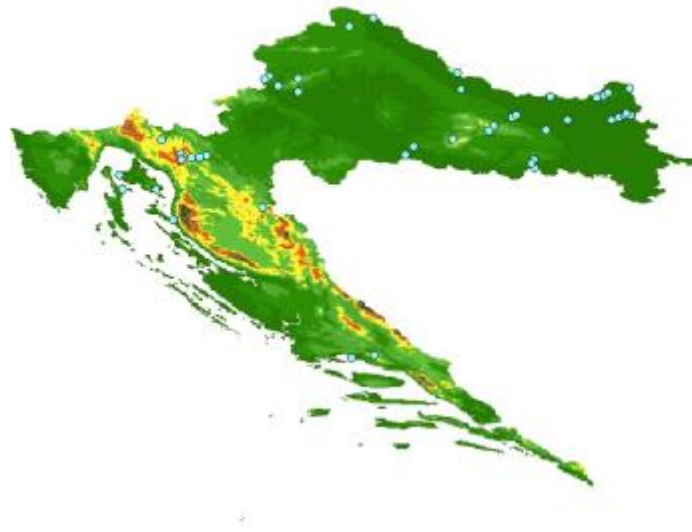
**Slika 6.** Geografska rasprostranjenost vrste *L. polyphemus* u Hrvatskoj. Plava točka označava područje u kojima je zabilježena ova vrsta. Izvor: Hackenberger Kutuzović i sur. (2015).

### 1.7.1.3. *Lumbricus rubellus*

*Lumbricus rubellus* nativna je palearktička vrsta rasprostranjena po čitavom svijetu, a u Hrvatskoj je jedna od najčešćih (Slika 7). Ova vrsta široko je korištena u području ekotoksikologije tla (Spurgeon i sur., 2003; Fränzle, 2006; Bundy i sur., 2007; Sechi, 2013). Tipičan je primjer epigejne vrste te preferira vlažna tla bogata organskim tvarima tolerirajući pH vrijednost od 3,5 do 8,4 (Sims i Gerard, 1999; Sechi, 2013). Može se pronaći u šumi pod

otpalim lišćem, trulim panjevima i deblima te u vrtu u kompostištu. *Locus typicus* ove vrste zabilježen je u Njemačkoj (Berlin) (Mršić, 1991).

Tijelo je dugačko od 33 do 150 mm te se sastoji od 56 do 145 kolutića. Prepoznatljiva je po svom tamno-crvenom do crveno-smeđem obojenju, dok je ventralno obojenje blijedo-žuto. Pojas je sedlastog oblika te se proteže od 26. (27.) do 32. (33.) kolutića. Četine su usko sparene, a prostomij je taniloban (Hackenberger Kutuzović i sur., 2015).



**Slika 7.** Geografska rasprostranjenost vrste *L. rubellus* u Hrvatskoj. Plave točke označavaju područja u kojima je zabilježena ova vrsta. Izvor: Hackenberger Kutuzović i sur. (2015).

### 1.8. Molekularna filogenija

Filogenija je grana prirodnih znanosti koja se bavi rekonstrukcijom filogenetskih odnosa među organizmima proučavajući evoluciju pojedinih svojti te određivanjem stupnja međusobne srodnosti pojedinih svojti organizama na temelju taksonomskih karaktera (morfološki, anatomski, ekološki, fiziološki, biogeografski i paleontološki). Cilj filogenije je rekonstruirati genealogiju među organizmima i odrediti vrijeme divergencije od vremena kada su dijelili zajedničkog pretka. Pojam „filogenija“ prvi je upotrijebio Ernest Haeckel koji je pokušao konstruirati razvojno stablo živoga svijeta. S obzirom da se evolucija temelji na paleontološkim nalazima i komparativnoj morfologiji i anatomiji koje se nisu pokazale najpouzdanije, istraživanja i utvrđivanja filogenetskih odnosa između vrsta, odnosno skupina

započela je na osnovi analize sljedova nukleotida rRNA i DNA. Iako se evolucija i filogenija naizgled čine vrlo slične, među njima postoje značajne razlike. Evolucija proučava zakonitosti koje su zajedničke svim živim bićima, dok filogenija opisuje proces razvoja i podrijetla neke svojte. Molekularna biologija danas je neizostavna u mnogim taksonomskim istraživanjima, stoga važno mjesto u analizi srodstvenih odnosa zauzima grana filogenije - molekularna filogenija koja proučava evolucijsku prošlost i odnose među organizmima na molekularnoj razini (DNA, RNA i proteina). Molekularno-filogenetička analiza uključuje lančanu reakciju polimerazom (PCR), sekvenciranje i višestruko sravnjivanje sekvenci čime se omogućava konstrukcija najtočnijih filogenetskih odnosa među živim organizmima te u konačnici analiza filogenetskog stabla. Uporabom statističkih metoda i računalnih programa te metodom sekvenciranja i analizom sekvenci DNA razmatraju se, definiraju i konstruiraju srodstveni odnosi među organizmima. Rezultati dobiveni molekularno-filogenetičkim analizama predstavljaju hipotezu o evolucijskoj povezanosti taksonomskih grupa. Kod filogenetičkih analiza najčešće se koristi DNA koja sadrži više podataka od proteina jer mutacije koje rezultiraju sinonimnim promjenama mijenjaju DNA sekvencu, ali ne utječu na aminokiselinske sekvence (tj. dolazi do promjene nukleotida, ali aminokiselina ostaje ista). Prednost proteinskih sekvenci je u tome što se efikasnije poravnavaju od sekvenci molekule DNA.

U procesu sekvenciranja koriste se molekulski biljezi, odnosno fragmenti kodirajuće ili nekodirajuće DNA s obzirom da je sekvenciranje čitavog genoma vrlo skup i dugačak proces. Za proučavanje srodstvenih odnosa važan je odabir molekulskih biljega koji mogu biti varijabilni i visoko konzervirani. Razlika je u tome što se visoko konzervirani molekulski biljezi, poput histonskih gena ili 16S RNA koriste kod proučavanja filogenetskih odnosa između udaljenih skupina, dok varijabilni biljezi otkrivaju filogenetske odnose bliskih srodnih skupina koje su se nedavno odvojile (Hwang i Kim, 1999). Najčešće se koriste varijabilni biljezi poput mitohondrijske DNA jer se lako izoliraju i mogu se koristiti u detekciji genske varijabilnosti nastale zbog promjena u slijedu nukleotida djelovanjem mutacija (Schulman i sur., 2004). Također, odabir molekulskog biljega ovisi o skupini organizma pa se u zoologijskim istraživanjima najčešće koriste biljezi jezgrine ili mitohondrijske DNA. Za proučavanje odnosa među vrlo srodnim organizmima koriste se nukleotidne sekvence mitohondrijske DNA zbog toga što one evoluiraju brže od proteina.

### 1.8.1. Mitohondrijska DNA (mtDNA)

Prema teoriji molekularnog sata, Pauling i Zuckerkandle (1965) zaključili su da je “evolucijska stopa konstantna u vremenu za svaku promatranu evolucijsku liniju”. To znači da se mutacijske promjene javljaju uvijek određenom konstantnom brzinom pa se na osnovu kvantifikacije razlika u strukturi određenih proteina može procijeniti kada su se vremenski odvojili. U molekularno-filogenetičkim istraživanjima posebno su korisne mitohondrijska DNA i ribosomska RNA. S obzirom da molekularni sat mitohondrijske DNA “kuca brzo“ te se nasljeđuje putem citoplazme, odnosno majčinskom linijom, koristi se za proučavanje relativno mladih filogenetskih događaja. Mitohondrijska DNA je kružna dvolančana molekula DNA koja se nalazi u matriksu mitohondrija i ima vrlo visoku stopu mutacije, stoga je varijabilnost među sekvencama mtDNA velika među različitim vrstama, a mala unutar jedne vrste. Organizmi koji su u srodstvenom odnosu imaju DNA koja potječe od zajedničkog pretka što znači da su im geni sličniji od gena organizma koji su u dalekom srodstvu. Na temelju analize sljedova nukleotida i određivanja konstante stope mutacije (molekularnog sata), može se odrediti vrijeme koje je proteklo od odvajanja dva taksona od zajedničkog pretka.

Mitohondrijska DNA koristi se kao molekularni biljeg u filogeniji zbog lake izolacije, velikog broja kopija i vrlo brze evolucije u odnosu na jezgrinu DNA. Predloženo je da DNA barkodiranja budu provedena s mitohondrijskim genom za COI (podjedinica 1 citokrom C oksidaze) jer je visoko konzervirana među koljenima što omogućuje jednostavno sravnjivanje sekvenci (Matoničkin i sur., 2010). S druge strane, ribosomska RNA se koristi uglavnom za proučavanje filogenetskih odnosa unutar protista, sporo se mijenja tijekom vremena te je zato najpouzdanija metoda za istraživanje skupina koje su se razdvojile u davnoj evolucijskoj prošlosti.

### 1.8.2. Filogenetsko stablo

Filogenetsko stablo predstavlja model evolucijske povijesti i prikazuje odnose između različitih vrsta i taksona za koje se pretpostavlja da imaju zajedničke pretke. Filogenetska stabla mogu biti ukorijenjena i neukorijenjena. Za ukorijenjivanje stabla koristi se vanjska grupa ili skupina (engl. *outgroup*) koja nije član analizirane grupe, već može biti sestrinska grupa. Kod neukorijenjenih stabla ne može se definirati vanjska grupa ili je stablo ne posjeduje. Ukorijenjena stabla važna su jer govore o precima, objašnjavaju karakter evolucije

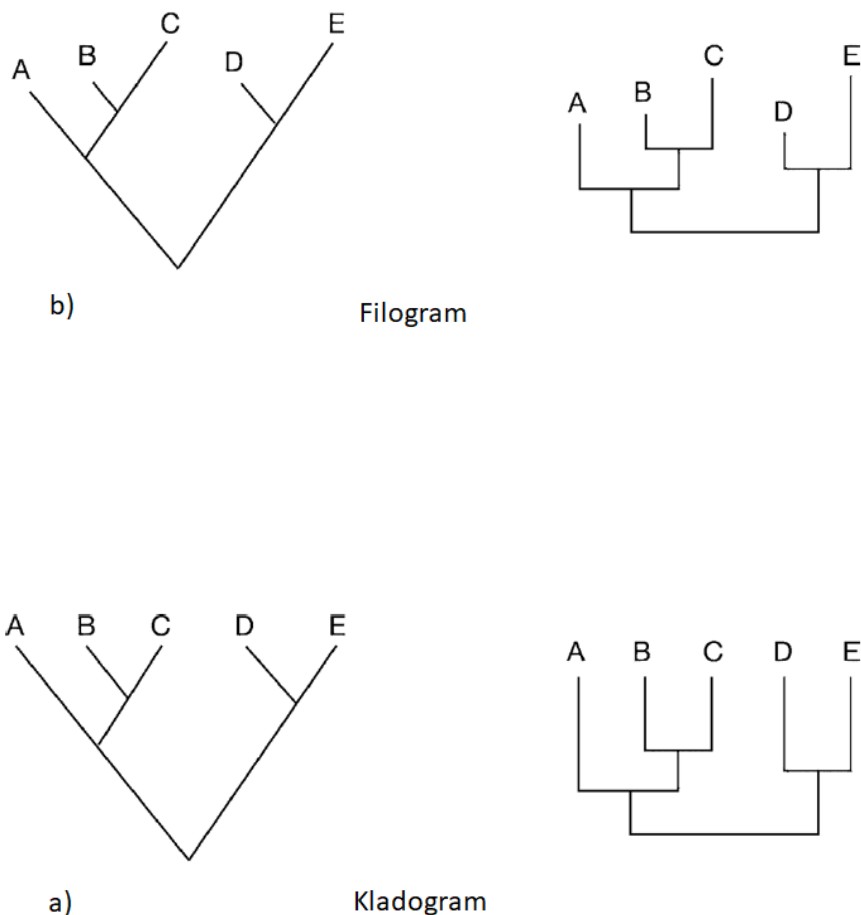


te sadrže jedinstveni čvor (korijen) koji predstavlja najstariji dio stabla, odnosno posljednji zajednički predak svih taksonomskih jedinica u stablu.

Kod svakog filogenetskog stabla razlikujemo čvorove koji predstavljaju taksonomske jedinice i ogranke ili grane koji predstavljaju odnose među jedinicama u smislu potomaka i pretka. Čvorovi mogu biti unutarnji (HTU, engl. *Hypothetical Taxonomic Unit*) te predstavljaju hipotetskog pretka čije su karakteristike nepoznate za razliku od krajnjih (vanjskih) čvorova (OTU, engl. *Operational Taxonomical Unit*) koji opisuju taksone čije su karakteristike poznate. Unutar filogenetskog stabla može se vidjeti i jedan jedinstveni interni čvor koji je predstavlja korijen stabla, odnosno predak je svih čvorova. Ogranci mogu biti periferni koji završavaju opisanim skupinama ili unutarnji koji povezuju hipotetske pretke.

Proučavajući odnose između taksonomskih jedinica na filogenetskom stablu, taksoni mogu imati monofiletsko, parafiletsko i polifiletsko podrijetlo. Monofiletsko podrijetlo imaju taksoni koji potječu od zajedničkog pretka i pripadaju istoj grani. Monofiletska grupa često se u sistematici naziva kladij (engl. *clades*). Polifiletsko podrijetlo imaju taksoni koji imaju više zajedničkih predaka, evolucijski su srodni, ali ne predstavljaju filogenetsku grupu. Članovi parafiletska skupina sadrže najmlađeg zajedničkog pretka, ali mnogi potomci tog pretka još nisu opisani ili su uvršteni u druge skupine.

Stabla se mogu konstruirati na različite načine, poput kladograma i filograma (Slika 8). U filogramu duljine grana predstavljaju iznos evolucijske divergencije, odnosno govore o trajanju evolucije između taksona. Dulje grane govore da se dogodilo više promjena u proučavanoj molekuli DNA za razliku od kraćih ogranaka. U kladogramu vanjske su grupe, odnosno ogranci u ravnini, no njihove duljine grana ne govore o broju promjena koje su se dogodile tijekom evolucije. Kladogram prikazuje samo topologiju stabla u kojima je važan samo poredak taksona (Xiong, 2006).



**Slika 8.** Filogenetičko stablo: a) filogram b) kladogram. Izvor: Xiong (2006).

Napredak tehnologije omogućio je noviji i pouzdaniji način obrade podataka i izradu pouzdanih filogenetskih stabala. Prilikom izrade filogenetskog stabla potrebni su sljedeći koraci:

1. Prikupljanje podataka: iz javnih baza podataka (GenBank, EMBL...), DNA ili proteini
2. Višestruko poravnavanje sekvenci
3. Filogenetska rekonstrukcija: izbor analitičkih modela i metoda
4. Testiranje filogenetskog stabla (metoda neparametrijskih replikata samoučitanja, engl. *Bootstrapping* ili posteriorne vjerojatnosti)
5. Prikaz rezultata

U izradi filogenetskih stabla odabiru se metode koje mogu biti temeljene na udaljenosti (engl. *Distance methods*) koje uključuju metodu susjednog sparivanja (NJ, engl.

*Neighbor joining*) te metode temeljene na karakteru (engl. *character state*) unutar koje su najpoznatije metode najveće štedljivosti (MP, engl. *Maximum parsimony*), metoda najveće vjerojatnosti (ML, engl. *Maximum likelihood*) i Bayesova analiza (BA, engl. *Bayesian analysis*). Metode temeljene na stanju karaktera proučavaju nukleotide i aminokiseline na određenoj poziciji srađnjene sekvence te pojavu delecije i insercije (Li, 1997). U filogenetičkim analizama za dobivanje najvjerodostojnijih rezultata danas se najčešće koristi metoda Bayesove analize te metoda najveće vjerojatnosti i najveće štedljivosti.

**Metoda susjednog sparivanja** (NJ) izračunava set udaljenosti između parova sekvenci i koristi strategiju postepenog klasteriranja. Ova metoda pronalazi susjedne taksonomske jedinice koje algoritam spaja kako bi se dobilo najkraće stablo (Saitou i Nei, 1987). Ova metoda je brza i računalno nije zahtjevana te se u kratkom vremenu može obraditi veliki set podataka. Nedostaci su u tome što ne daje najpouzdanije stablo.

**Metoda najveće štedljivosti** (MP) jedna je od najčešćih metoda za konstrukciju filogenetskog stabla i dobra je za vrlo slične sekvence ili grupe sekvenci s malim iznosom varijacije. Ova metoda ne prikazuje duljine grana, već poredak ogranaka. Temelji se na principu Okamove oštrice po kojoj je najjednostavnija hipoteza najbolja pa odabire stabla koja imaju najmanji broj evolucijskih promjena ili najkraće ukupne dužine ogranaka (Swofford, 2001). Često stablo najveće štedljivosti zanemaruje evolucijske promjene koje su se dogodile, stoga statistički nije dovoljno pouzdano kod većeg broja podataka.

**Metoda najveće vjerojatnosti** (ML) smatra se najboljom i najkorisnijom u konstrukciji molekularno-filogenetskog stabla. Izračunava se vjerojatnost pojavljivanja nukleotidnih baza ili aminokiselina u unutarnjim čvorovima. Potom se rekonstruira vjerojatnost strukture stabla iz tih podataka. Isto kao MP, koristi metodu iscrpnog pretraživanja, tj. izvodi svoje analize na svakom mjestu (poziciji) višestrukog poravnanja. Koristi model stabla za nukleotidne supstitucije i pokušava naći najsličnije stablo (izvan svih stabala koja se nalaze u bazi podataka). Vrlo osjetljiva metoda na velikim evolucijskim udaljenostima te vremenski i računalno vrlo zahtjevana (Felsenstein, 1973, 1981).

**Bayesova analiza** (BA) je vrlo kvalitetna metoda, ali računalno zahtjevana. Temelji se na spoznaji o naknadnim vjerojatnostima, odnosno vjerojatnostima koje su procijenjene po nekom evolucijskom modelu. Prednost ove metode je što algoritam traži grupu najpouzdanijih stabala, a ne samo jedno najbolje stablo (Mau i sur., 1999).

Iznos evolucijskog vremena koji je prošao tijekom razdvajanja dviju sekvenci nije poznat, što znači da analize pokazuju samo procjenu broja promjena koje su se dogodile od vremena razdvajanja. Važno je napomenuti da ne postoji točno stablo, već samo aproksimacije stabala te da nema idealne metode. Pri izradi stabla, nužno je kombinirati različite metode i uspoređivati rezultate te koristiti metode za procjenu pouzdanosti stabla. Također je ključan izbor sekvenci te izbacivanje neodgovarajućih regija nakon višestrukog poravnavanja kako bi se dobilo što pouzdanije stablo.

### **1.8.3. Filogenetske mreže**

Osim filogenetskog stabla, filogenetski odnosi među organizmima mogu se prikazivati pomoću filogenetske mreže kojom su bolje prikazani odnosi između i unutar taksona. Dobivene informacije korisne su u razgraničavanju vrsta i otkrivanju rekombinacije te govore o načinima specijacije (Posada i Crandall, 2001). Filogenetskim mrežama prikazani su inraspecifični evolucijski odnosi koji ne prikazuju hijerarhiju za razliku od evolucijski odnosa dobiveni klasičnim filogenetskim metodama. Evolucijski odnosi u filogenetskoj mreži rezultat su malog broja nedavnih mutacija, rekombinacija i seksualne reprodukcije. Filogenetske mreže bolje su na razini populacija od tradicionalnih filogenetskih metoda iz razloga što uzimaju u obzir nizak stupanj različitosti, prisutnost ancestralnih haplotipova koji koegzistiraju s haplotipovima koji su iz njih nastali, pojavu politomije i prisutnost retikulacije. Za izradu filogenetske mreže potrebno je uzeti u obzir frekvencije haplotipova te njihovu geografsku distribuciju (Posada i Crandall, 2001).

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj istraživanja je među gujavicama uzorkovanim u kontinentalnom dijelu Hrvatske morfološkom determinacijom izdvojiti jedinke koje pripadaju vrstama unutar rodova *Aporrectodea* i *Lumbricus* te zatim molekularno-filogenetskim metodama provjeriti prethodnu morfološku determinaciju. Sljedeći cilj je procijena genske raznolikosti gujavica navedenih rodova analizom nukleotidnih sekvenci mitohondrijskih gena za COI i utvrđivanje rasprostranjenost genskih linija rodova *Aporrectodea* i *Lumbricus* u Hrvatskoj.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Područje istraživanja

Jedinke su uzorkovane na području Republike Hrvatske na devet lokaliteta kontinentalne Hrvatske: Zagreb, Samoborsko gorje, Sunger, Kalnik, Ivanščica, Lipik, Orahovica, Osijek i Halaševo (Slika 9).



**Slika 9.** Karta s oznakama lokaliteta uzorkovanja gujavica rodova *Aporrectodea* i *Lumbricus*:

1. Zagreb (kvart Sigečica), 2. Žumberak-Samoborsko gorje, 3. Kalnik, 4. Lipik, 5. Osijek, 6. Sunger, 7. Orahovica, 8. Halaševo, 9. Ivanščica.

## **3.2. Materijali**

### **3.2.1. Životinjski materijali**

Jedinke su prikupljene na terenu tijekom 2016. i 2017. godine. Na svakom lokalitetu odabrano je mjesto uzorkovanja, zabilježene su koordinate te se pomoću lopate iskopala zemlja promjera oko 20 cm i dubine oko 50 cm. Prikupljene jedinke najprije su stavljene u boce sa 70%-tnom otopinom etanola, isprane kako bi se maknuo zaostali uzorak tla s površine tkiva te su zatim kasnije stavljene u 96%-tni etanol. Svakoj jedinki se dala šifra (kratica lokaliteta, broj lokacije i redni broj jedinke), uzeo uzorak tkiva za DNA analizu i stavio u mikroeprevetu s 96%-tnim etanolom. Uzorci tkiva spremljeni su u hladnjak na +4 °C na Biološkom odsjeku Prirodoslovno–matematičkog fakulteta u Zagrebu, a jedinke su poslane na Odjel za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku radi determinacije na temelju morfoloških karakteristika opisanih u Mršić (1991) i Hackenberger Kutuzović i sur. (2015) (Tablica 1 i 2).

**Tablica 1.** Popis gujavica roda *Aporrectodea* uzorkovanih na području kontinentalne Hrvatske.

Broj	Lokalitet	GPS koordinate	Oznaka uzorka	Vrsta na temelju morfoloških karakteristika
1	Zagreb (kvart Sigečica) / SIG	45.799529°N 16.002603°E	SIG0-12 SIG0-14 SIG0-15 SIG0-16 SIG0-17 SIG0-18 SIG0-20 SIG0-21 SIG0-22	<i>A. caliginosa</i> <i>A. caliginosa</i> <i>A. caliginosa</i> <i>A. caliginosa</i> <i>A. caliginosa</i> <i>A. caliginosa</i> <i>A. caliginosa</i> <i>A. caliginosa</i> <i>A. caliginosa</i>
2	Žumberak - Samoborsko gorje / ZUM	45.824965°N 15.647939°E	ZUM1-1 ZUM2-1 ZUM2-3 ZUM4-4 ZUM10-7 ZUM12-1 ZUM12-2 ZUM12-3 ZUM12-4 ZUM12-5 ZUM12-7 ZUM12-8 ZUM12-9 ZUM12-10	<i>A. caliginosa</i> <i>Aporrectodea</i> sp. <i>A. rosea</i> <i>A. caliginosa</i> <i>A. caliginosa</i> <i>A. caliginosa</i> <i>A. caliginosa</i> <i>A. caliginosa</i> <i>A. caliginosa</i> <i>A. caliginosa</i> <i>A. caliginosa</i> <i>A. caliginosa</i> <i>A. caliginosa</i> <i>A. caliginosa</i> <i>A. rosea</i>
3	Kalnik / KAL	46.165297°N 16.515861°E	KAL1-6 KAL5-1 KAL5-7 KAL6-9 KAL6-11	<i>A. caliginosa</i> <i>A. caliginosa</i> <i>A. rosea</i> <i>A. rosea</i> <i>A. rosea</i>
4	Ivanščica / JEL	46.129475°N 16.289337°E	JEL3-1	<i>A. caliginosa</i>
5	Lipik / LAR	45.421424°N 17.144960°E	LAR4-1	<i>A. rosea</i>
6	Osijek / IB	45.567833°N 18.687528°E	IB-6	<i>A. rosea</i>
7	Sunger	45.326861°N 14.809139°E	sunger-1 sunger-2	<i>A. smaragdina</i> <i>A. rosea</i>
8	Orahovica / ORA	45.519733°N 17.862142°E	ORA0-7 ORA0-8 ORA0-9 ORA0-10	<i>A. caliginosa</i> <i>Aporrectodea</i> sp. <i>Aporrectodea</i> sp. <i>A. rosea</i>
9	Halaševo / BAR	45.592436°N 18.639561°E	BAR2-1 BAR2-2 BAR2-3 BAR2-4 BAR2-11 BAR3-3 BAR3-6	<i>A. georgii</i> <i>A. georgii</i> <i>A. caliginosa</i> <i>A. rosea</i> <i>A. caliginosa</i> <i>A. rosea</i> <i>A. rosea</i>



**Tablica 2.** Popis gujavica roda *Lumbricus* uzorkovanih na području kontinentalne Hrvatske.

Broj	Lokalitet/ID	GPS koordinate	Oznaka uzorka	Vrsta na temelju morfoloških karakteristika
1	Zagreb (kvart Sigečica) / SIG	45.799529°N 16.002603°E	SIG0-1	<i>L. terrestris</i>
			SIG0-2	<i>L. terrestris</i>
			SIG0-3	<i>L. terrestris</i>
			SIG0-4	<i>L. terrestris</i>
			SIG0-5	<i>L. terrestris</i>
			SIG0-6	<i>L. terrestris</i>
			SIG0-7	<i>L. terrestris</i>
			SIG0-8	<i>L. terrestris</i>
			SIG0-9	<i>L. terrestris</i>
			SIG0-10	<i>L. terrestris</i>
			SIG0-11	<i>L. terrestris</i>
			SIG0-13	<i>L. terrestris</i>
			SIG0-19	<i>L. terrestris</i>
2	Žumberak - Samoborsko gorje / ZUM	45.824965°N 15.647939°E	ZUM2-4	<i>L. terrestris</i>
			ZUM3-3	<i>L. rubellus</i>
			ZUM4-1	<i>L. terrestris</i>
			ZUM4-2	<i>L. terrestris</i>
			ZUM4-3	<i>L. terrestris</i>
			ZUM7-1	<i>L. terrestris</i>
			ZUM10-1	<i>L. terrestris</i>
			ZUM14-1	<i>L. terrestris</i>
			ZUM15-1	<i>L. terrestris</i>
3	Kalnik / KAL	46.133372°N 16.444165°E	KAL1-10	<i>Lumbricus</i> sp.
			KAL2-1	<i>L. rubellus</i>
			KAL2-2	<i>L. rubellus</i>
			KAL2-4	<i>L. rubellus</i>
			KAL3-1	<i>L. terrestris</i>
			KAL3-4	<i>L. terrestris</i>
			KAL6-5	<i>L. rubellus</i>
			KAL6-6	<i>L. rubellus</i>
4	Ivanščica / JEL	46.129475°N 16.289337°E	JEL1-1	<i>L. terrestris</i>
			JEL4-1	<i>L. terrestris</i>
			JEL4-2	<i>L. terrestris</i>
			JEL4-3	<i>L. terrestris</i>
			JEL4-4	<i>L. terrestris</i>
			JEL4-5	<i>L. terrestris</i>
			JEL4-10	<i>L. terrestris</i>
			JEL4-11	<i>L. terrestris</i>
JEL4-12	<i>L. terrestris</i>			
5	Osijek / IB	45.567833°N 18.687528°E	IB-1	<i>L. rubellus</i>
6	Halaševo / BAR	45.592436°N 18.639561°E	BAR2-10	<i>L. rubellus</i>
			BAR3-5	<i>L. rubellus</i>

### **3.2.2. Kemikalije i laboratorijski pribor**

#### **Kemikalije**

Agarozna

Chelex, 100 sodim form

Proteinase K (*Tritirachium album*) lyophilized powder,  $\geq 30$  units/mg protein

DreamTaq Green PCR Master MIC

Etanol (96%)

#### **Osnovni materijal**

Mikroepuvete 1.5 i 2 mL

PCR mikroepuvete 0.2 mL

Poklopci za PCR 0.2 mL mikroepuvete

Nastavci za mikropipete 10  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L

Zaštitne rukavice

Pincete

Petrijeve zdjelice

Mini brener

#### **Tehnički pribor**

Centrifuga

Digitalni fotoapararat

Kadice za elektroforezu

Kadice za pripremu agaroznih gelova

Mikrovalna pećnica

Mikropipete

Nanodrop spektrofotometar

PCR uređaj

PCR ploče s 96 jažica

Transiluminator

Vodene kupelji

Vorteks miješalica

Zamrzivač i hladnjak

### 3.3. Metode

#### 3.3.1. Vanjska morfologija

Prikupljene i šifrirane jedinke poslane su na Odjel za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku radi determinacije te su svi rezultati morfoloških karakteristika upisani u tablicu Microsoft Excel (Prilog 1 i 2).

Usporedba vanjskih svojstava gujavica temeljene na vanjskim karakteristikama koje je koristio Mršić (1991) pri određivanju jedinki:

1. Položaj pojasa
2. Oblik prostomija: epiloban zatvore, epiloban otvoren, taniloban
3. Dulžina jedinke/mm
4. Širina jedinke/mm
5. Broj kolutića
6. Položaj leđne rupice
7. Položaj pubertetskih izbočina
8. Oblik pubertetskih izbočina: trakasta, razdvojena
9. Oblik četina: usko sparene, široko sparene, razdvojene
10. Položaj muškog spolnog otvora
11. Atrij muškog spolnog otvora
12. Boja: pigmentirana, nepigmentirana, dorzalno smeđa, ljubičasto-prugasta, plavo-siva itd.
13. Napomene: juvenilna, poluodrasla

Oblik mišićnih snopova kao i neke unutarnje karakteristike opisane u Mršić (1991) poput oblika nefridijalnog mjehura, položaj sjemenih spremišta i sjemenih vrećica u ovom radu nisu određivane.

#### 3.3.2. Izolacija DNA

Za daljnja molekularna istraživanja iz zbirke gujavica koje su uzorkovane na području kontinentalne Hrvatske izdvojene su vrste koje su morfološki određene da pripadaju rodovima *Aporrectodea* i *Lumbricus*. Svakoj jedinki je odrezan dio integumenta (0.025 g muskulature tjelesne stjenke) sa stražnjeg dijela tijela koji je zatim pohranjen u mikroepruvete s 96%-tnim etanolom. Iz tkiva gujavica DNA je izolirana pomoću komercijalnih kitova i/ili Chelex

metode prema protokolu u Casquet i sur. (2012). Iz tkiva se najprije odrezalo 1-2 mm<sup>3</sup> epitela koji se stavio na dno jažice PCR ploče. Kada se popunilo svih 96 jažica na PCR ploči, PCR ploča se stavila u termostat s cirkulacijom zraka i temperaturom postavljenom na 25 °C dok nije ispario sav etanol iz tkiva. Nakon toga se u svaku jažicu dodalo 10 µL Proteinaze K (>600 mAU/mL, Sigma-Aldrich) i 150 µL 10%-tne otopine Chelex 100 resin (Sigma-Aldrich) u vodi slobodnoj od nukleaza. Tkivo u Chelex otopini se inkubiralo preko noći na 55 °C pomoću PCR uređaja. Izolirana DNA se čuvala na -20 °C do primjene PCR metode.

### **3.3.3. Lančana reakcija polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction* – PCR)**

Pomoću lančane reakcije polimerazom umnoženi su dijelovi citokrom oksidaza podjedinice I (COI) regije mitohondrijske DNA koji se koriste kod genetičkog barkodiranja životinjskog organizma, tzv. „Folmerova regija“ (Folmer i sur. 1994; <http://boldsystems.org/>).

Umnožavanje COI regije je izvedeno u 20 µL PCR smjese (DreamTaq polimeraze (Thermo-Scientific), 400 nM „forward“ početnice, 400 nM „reverse“ početnice, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dATP, 0.2 mM dCTP, 0.2 mM dGTP, 0.2 mM dTTP, voda slobodna od nukleaza i 20 do 100 ng ukupne genomske DNA).

Pri umnažanju COI regije korištene su početnice LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') i HC02198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3') (Folmer i sur., 1994). Umnažanje DNA započinje denaturacijom na 95 °C tijekom 3 minute, zatim slijedi 35 ciklusa denaturacije na 94 °C tijekom 1 minute, sljepljivanje početnica na 46 °C tijekom 1 minute i sinteze na 72 °C tijekom 1 minute i 10 sekundi. Slijede završne sinteze na 72 °C tijekom 10 min te hlađenje PCR uzorka na 10 °C nakon završetka PCR-a.

### **3.3.4. Elektroforeza**

Kako bi se utvrdila uspješnost PCR proizvoda, proizvodi PCR na COI regiji stavljeni su na gel elektroforezu čime se molekule DNA razdvajaju na temelju naboja i molekularne mase. Tri mikrolitra PCR proizvoda je preneseno na 1%-tni agarozni gel. Veličina amplikona je utvrđena usporedbom s elektroforetskog standardima 100-bp Gene Ruler Plus DNA ladder (Fermentas) i Gene Ruler 1kb DNA ladder (Fermentas) koji su se nalazili u rubnim jažicama na gelu. PCR amplikoni su vizualizirani pomoću boje Midori Green Advance DNA stain (Nippon Genetics Europe GmbH) koja se izravno dodavala u gel. Elektroforeza je izvedena

pomoću uređaja EP-2117: RunOne™ Electrophoresis Unit (EmbiTec), u TAE puferu na 100 V te je trajala 13 minuta. Vizualizacija amplikona na gelu pomoću UV svjetla i fotodokumentiranje rezultata su izvedeni upotrebom uređaja UV Transilluminator TR2000 (Bio-Rad, SAD) u kombinaciji s digitalnim fotoaparatom Camedia C-4000 Zoom (Olympus, Japan).

### 3.3.5. Sekvenciranje

Proizvodi PCR-a pročišćeni su od ostataka početnica korištenjem enzima Exonuclease I i AnP (Antarctic Phosphatase) (New England Biolabs). Amplikoni COI regije poslani su u tvrtku Macrogen Corporation (Amsterdam, Nizozemska) kako bi se odredio slijed nukleotidnih baza (sekvenci) umnoženih gena. Sekvenciranje je provedeno s istim početnicama koje su korištene i u PCR-u.

### 3.3.6. Analiza sekvenci

Datoteke sa sirovim podacima dobivene nakon sekvenciranja u Macrogen-u obrađene su u programu SEQUENCHER (version 5.3; Gene Codes Corp., Ann Arbor, USA) kako bi se izrezali krajevi sekvenci i utvrdila kvaliteta očitavanja nukleotida u sekvencama. Nakon provjere, obrađene sekvence su izvedene iz programa SEQUENCHER u pojedinačne fasta datoteke koje su nakon toga obrađene u programskom paketu MEGA verzija 6.06 (Tamura i sur. 2013). Završni set COI sekvenci sa svim metapodacima bit će učitani u bazu podataka Barcode of Life Database (BOLD; <http://www.boldsystems.org/>) te će nakon objave budućeg znanstvenog rada postati javno dostupni.

U BOLD bazi (<http://boldsystems.org/>) pronađene su sve javno dostupne COI sekvence rodova *Aporrectodea* i *Lumbricus* iz Europe. Sve COI sekvence ujedinjene u skupnu fasta datoteku i učitane u programski paket MEGA 6.06. Kako bi položaji nukleotida u sekvencama bili homologni, sve dostupne COI sekvence srađene su pomoću programa MAFFT verzija 7 (Katoh, 2013). Srađene sekvence su međusobno uspoređene pomoću programa DnaSP verzija 5.10 (Librado i Rozas, 2009) kako bi se izdvojili jedinstveni haplotipovi potrebni za filogenetske rekonstrukcije. Prije pokretanja filogenetskih rekonstrukcija, određen je evolucijski model uz korištenje programa JModelTest 2 (Darriba i sur., 2012).

U programu MEGA izrađena su filogenetska stabla za COI regije rodova *Lumbricus* i *Aporrectodea* uporabom statističke metode najveće vjerojatnosti (ML). Početna stabla za heurističku pretragu su dobivena metodom sparivanja susjeda (NJ) koja je bila primijenjena na matricu uparenih udaljenosti procijenjenih pristupom „*Maximum Composite Likelihood*“. Dobivena ML filogenetsko stablo je testirano pomoću 1000 neparametrijskih replikata samoučitanja (engl. *bootstrap*) i evolucijskog modela GTR+G+1.

Koristeći program MrBayes 3.2 (Ronquist i sur., 2012), izrađeno je filogenetsko stablo pomoću Bayesove metode. Dvije nezavisne analize s četiri „*Metropolis-coupled Markov Chain Monte Carlo*“ lanca su napravljene u trajanju 50 milijuna generacija. Uzorkovanje je izvršeno svaku pet tisućitu generaciju, s temperaturnim parametrom postavljenim na 0.2 i početnih 25% generacija/uzoraka koji su uklonjeni kao „Burn-in period“. Konvergencija dviju analiza je testirana s programom AWTY (Nylander i sur. 2008) dok je efektivna veličina uzorka testirana pomoću programa TRACER 1.5 (Drummond i Rambaut 2007).

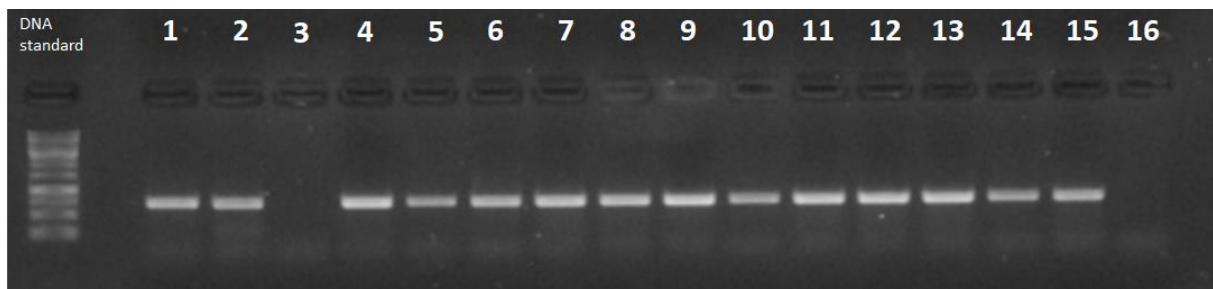
Kod filogenetskih stabala dobivenih metodom najveće vjerojatnosti, podržano grananje je sa vrijednosti samoučitanja  $P \geq 70$  i posteriorne vjerojatnosti ( $pp$ )  $\geq 0.90$  u Bayesovoj metodi.

Hijerarhijski odnosi između sekvenci unutar pojedinačnih genetičkih linija analizirani su upotrebom Median-Joining metode u programu PopART (Population Analysis with Reticulate Trees) v1.7 (Leigh i Bryant, 2015) u kojem je napravljena Median-Joining (MJ) (Bandelt i sur. 1999) filogenetska mreža.

Sve sekvence COI regije dobivene iz rodova *Aporrectodea* i *Lumbricus* korištene su kao vanjska grupa u filogenetskim konstrukcijama.

## 4. REZULTATI

Uspješnost PCR proizvoda provjerena je elektroforezom u agaroznom gelu (Slika 10). Za rod *Aporrectodea* ukupno je 11 jedinki čije se COI regije mtDNA nisu uspješno umnožile (SIG0-12, SIG0-18, SIG0-20, KAL1-6, KAL5-7, JEL3-1, BAR2-1, BAR2-2, BAR2-4, BAR3-3, BAR3-6), dok je za rod *Lumbricus* zabilježeno 16 jedinki neuspješno umnoženih COI regija mtDNA (SIG0-5, SIG0-9, SIG0-13, ZUM2-4, ZUM4-3, ZUM7-1, ZUM10-1, ZUM14-1, KAL2-4, KAL3-4, KAL6-5, KAL6-6, JEL4-4, JEL4-11, BAR2-10, BAR3-5).



**Slika 10.** Primjer gel elektroforeze izvedene s COI PCR proizvodima duljine oko 700 pb. Prva jažica predstavlja DNA standard (DNA ladder 250 pb). U ostalim jažicama nalaze se PCR proizvodi. Mjesta bez vidljivog signala označavaju neuspješnu PCR reakciju, tj. nedostatak PCR proizvoda.

### 4.1. Svrnjivanje nukleotidnih sekvenci

Ukupni broj svrnjenih i obrađenih sekvenci za gujavice roda *Aporrectodea* iz Europe iznosi 318, među kojima 33 sekvenci pripada području kontinentalne Hrvatske. Za rod *Lumbricus* ukupno je obrađeno 254 sekvenci, među kojima je 26 iz područja Hrvatske. Utvrđeno je ukupno 115 haplotipova za gen COI roda *Aporrectodea* i 93 haplotipova za gen COI roda *Lumbricus*. Iz područja Hrvatske zabilježeno je 18 haplotipova roda *Aporrectodea*, odnosno 16 haplotipova roda *Lumbricus* (Tablica 3 i 4).

**Tablica 3.** Broj utvrđenih haplotipova za gen COI roda *Aporrectodea* u kontinentalnoj Hrvatskoj.

Broj	Oznaka uzorka	Oznaka haplotipa
1	SIG0-14, SIG0-21, SIG0-22, ZUM12-1, ZUM12-2, ZUM12-3, ZUM12-4, ZUM12-5, ZUM12-8, ZUM12-9	Hap85 noc
2	SIG0-15	Hap99 cal
3	SIG0-16, SIG0-17, ZUM1-1, ZUM12-7	Hap100 cal
4	ZUM2-1	Hap101 sp.
5	ZUM2-3, ZUM12-10	Hap102 ros
6	ZUM4-4	Hap103 cal
7	ZUM10-7	Hap104 cal
8	KAL5-1	Hap105 cal
9	KAL6-9	Hap106 ros
10	KAL6-11	Hap107 ros
11	LAR4-1	Hap108 ros
12	IB-6	Hap109 ros
13	sunger-1	Hap110 sma
14	sunger-2	Hap111 ros
15	ORA0-7	Hap112 cal
16	ORA0-8, ORA0-9	Hap113 sp
17	ORA0-10	Hap114 ros
18	BAR2-3, BAR2-11	Hap115 cal



**Tablica 4.** Broj utvrđenih haplotipova za gen COI roda *Lumbricus* u kontinentalnoj Hrvatskoj.

Broj	Oznaka uzorka	Oznaka haplotipa
1	KAL1-10	Hap46 pol
2	IB-1	Hap47 rub
3	KAL2-1, KAL2-2	Hap48 rub
4	ZUM3-3	Hap61 rub
5	SIG0-6	Hap72 ter
6	SIG0-3	Hap74 ter
7	SIG0-10	Hap75 ter
8	JEL4-1, KAL3-1, SIG0-11, SIG0-19, ZUM15-1, ZUM4-1, ZUM4-2	Hap77 ter
9	JEL1-1, JEL4-3	Hap78 ter
10	JEL4-10, JEL4-5	Hap85 ter
11	JEL4-12, JEL4-2	Hap86 ter
12	SIG0-1	Hap89 ter
13	SIG0-2	Hap90 ter
14	SIG0-4	Hap91 ter
15	SIG0-7	Hap92 ter
16	SIG0-8	Hap93 ter

## 4.2. Filogenetičke analize sekvenci

Za izradu filogenetskog stabla za gen COI mtDNA korištene su eksperimentalno dobivene sekvence roda *Lumbricus* i *Aporrectodea* iz kontinentalne Hrvatske te sekvence iz područja Europe preuzete iz BOLD baze podataka (<http://www.boldsystems.org/>).

Pri rekonstrukciji filogenetskih odnosa korištene su metode NJ, ML i BA koje su pokazivale stabla slične topologije, no rezultati prikazuju filogenetsko stablo konstruirano pomoću metode najveće vjerojatnosti (ML) (Slika 11 i 12). Na granama stabla prikazane su vrijednosti samoučitanja (*bootstrap*) čija je podržanost  $\geq 70$  i posteriorne vjerojatnosti Bayesove analize  $\geq 0.9$ . Uz svaku granu navedena je oznaka haplotipa (npr. Hap87 ict L1), iza čega slijedi pristupna šifra iz Gen Bank-a (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (npr. MF121715), zatim dvotočka i oznaka države prema dvoslovnom kodu ISO 3166-1 (npr. :FR).

Učestalost pojedinih haplotipova iz cijele Europe za gen COI vrste *L. terrestris* te njihova geografska rasprostranjenost prikazana je pomoću filogenetske mreže u programu PopArt (Slika 13).

### 4.2.1. Genska raznolikost gujavica roda *Aporrectodea* u kontinentalnoj Hrvatskoj u ovom istraživanju

Topologija stabla prikazuje minimalno 14 grupa sekvenci analiziranih haplotipova za gen COI koje su naznačene različitim bojama i/ili imenom vrste. Filogenetičke analize sekvenci pokazale su da gujavice roda *Aporrectodea* iz područja kontinentalne Hrvatske ulaze u četiri grupe sekvenci: *Aporrectodea* sp. 2, *A. smaragdina*, *Aporrectodea* sp. 6 i *A. rosea*.

Filogenetsko stablo pokazuje da gujavice s oznakama haplotipova 85, 99, 100, 103 i 104 koje su morfološki određene kao *A. caliginosa* ne ulaze u grupu haplotipova *A. caliginosa*, već upadaju u grupu haplotipova *Aporrectodea* sp. 2. U ovoj skupini vidljivo je preklapanje haplotipa iz Francuske koji je određen kao *A. nocturna* i haplotipa iz Hrvatske koji je morfološki određen kao *A. caliginosa*.

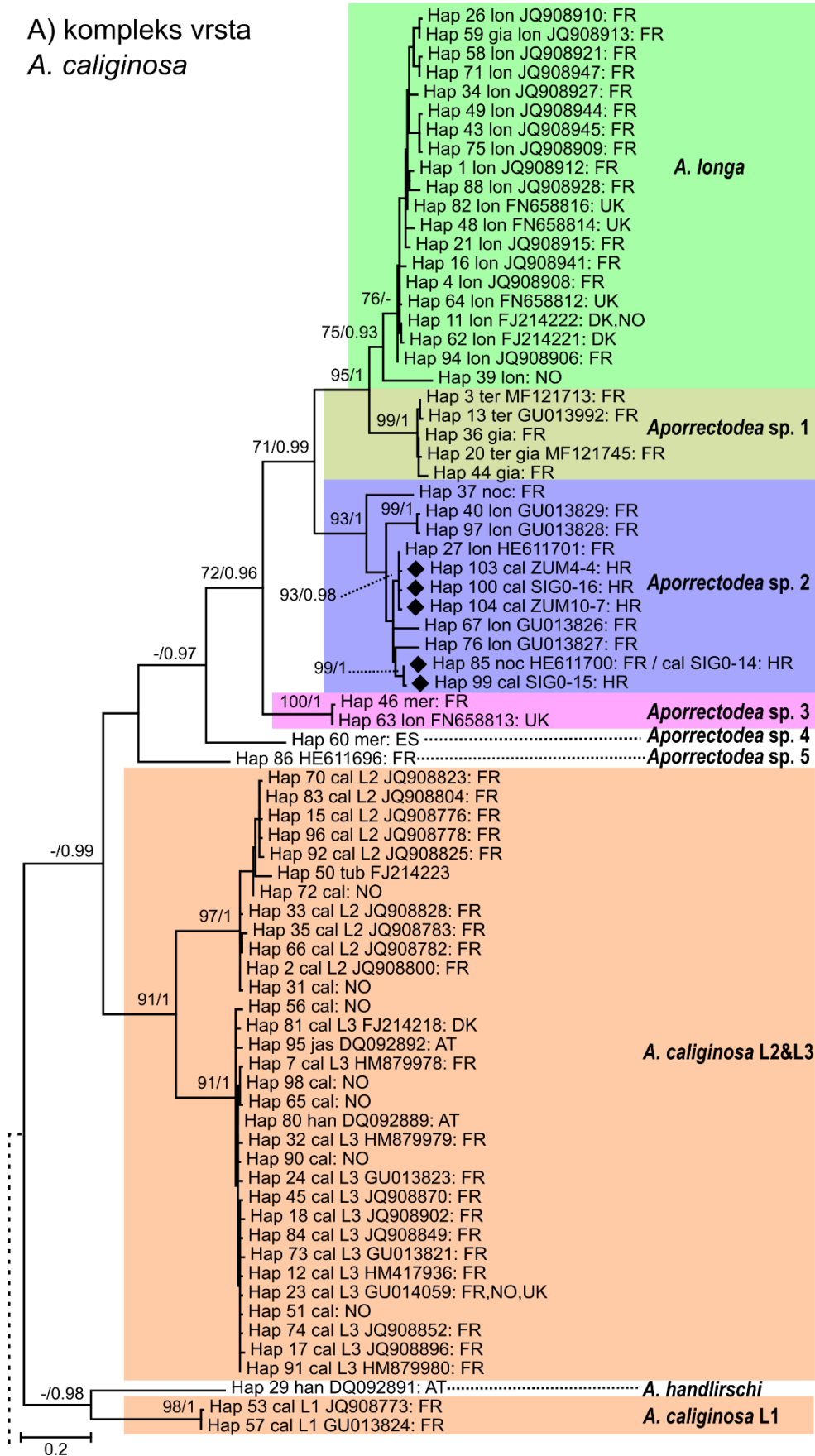
Filogenetičke analize pokazuju da jedna COI sekvenca vrste *A. smaragdina* iz Hrvatske ne pokazuje sličnost s ostalim haplotipovima, već čini zasebnu grupu.

Haplotipovi oznake 105 i 112 iz Hrvatske koji su morfološki određeni kao *A. caliginosa* upadaju u skupinu *Aporrectodea* sp. 6 unutar koje je zabilježena samo jedna COI

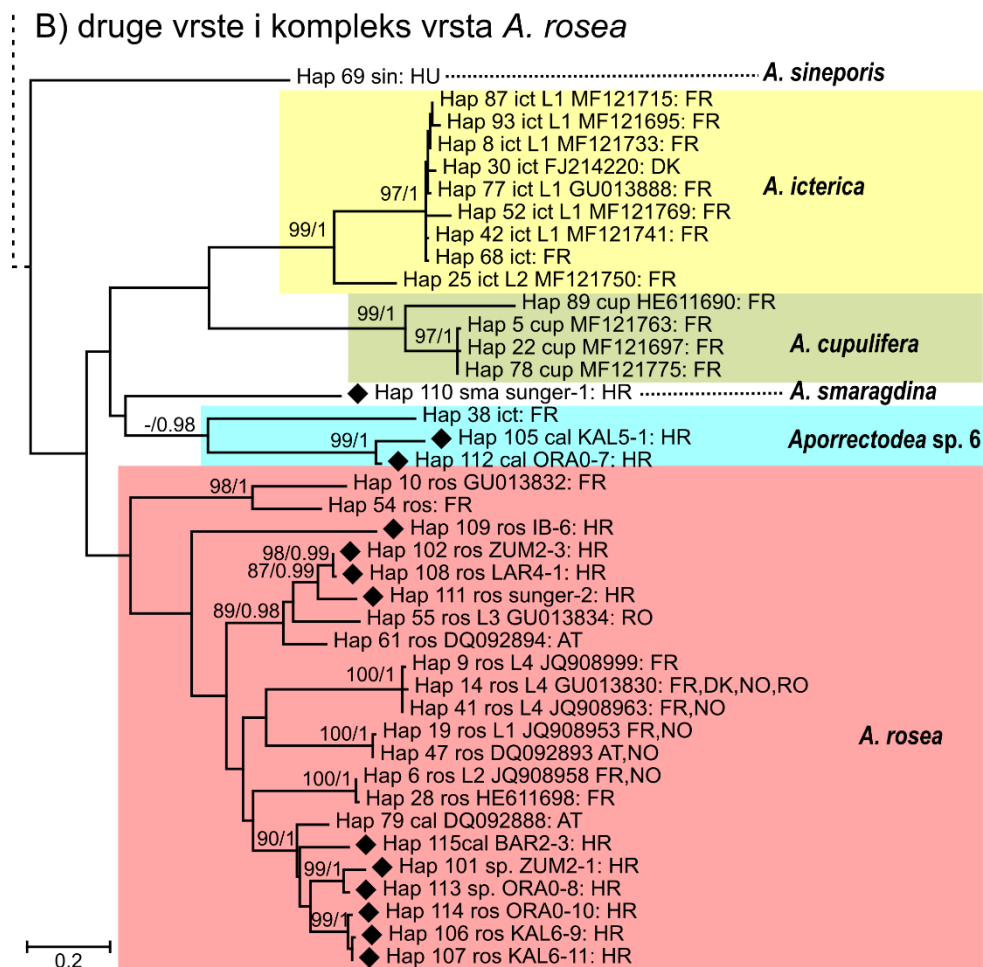
sekvenca iz Francuske određena kao *A. icterica*. Topologija stabla ukazuje jasno odvajanje navedena dva haplotipa iz Hrvatske od skupine haplotipova *A. caliginosa*.

Najveći broj haplotipova iz Hrvatske ulazi u grupu sekvenci *A. rosea*, unutar koje se nalaze jedinke koje su morfološki određene kao *A. rosea*, *Aporrectodea* sp. i *A. caliginosa*. COI sekvence jedinka iz Hrvatske koje ulaze u ovu grupu razlikuju se od sekvenci jedinki određenih kao *A. rosea* iz Francuske, Norveške, Rumunjske, Danske i Austrije.

A) kompleks vrsta  
*A. caliginosa*



Slika 11. ML filogenetsko stablo za kompleks vrsta *A. caliginosa* roda *Aporrectodea*.



**Slika 11.** Nastavak slike 11: ML filogenetsko stablo za druge vrste i kompleks vrsta *A. rosea* roda *Aporrectodea*. ML filogenetsko stablo izrađeno upotrebom programa MEGA dobiveno analizom gena COI. Na mjestu grananja naznačene su vrijednosti samoučitanja  $\geq 70$  i posteriorne vjerojatnosti Bayesove analize  $\geq 0.9$ . Duljina grana odgovara broju supstitucijskih promjena (mjerna crta u kutu s lijeve strane označava broj supstitucija po nukleotidnom položaju). Sekvence su označene s oznakom haplotipa (npr. „Hap 1“), morfološkom identifikacijom (npr. „ros“ za *A. rosea*), šifrom uzorka iz ovog istraživanja, genetičkom linijom (ako je poznata, npr. „L1“), GenBank pristupnom šifrom (ako postoji, npr. DQ092888), te dvoslovnim oznakom države prema kodu ISO 3166-1 (AT – Austrija, DK – Danska, ES – Španjolska, FR – Francuska, HR – Hrvatska, NO – Norveška, RO – Rumunjska, UK – Ujedinjeno Kraljevstvo).

#### 4.2.2. Genska raznolikost gujavica roda *Lumbricus* u kontinentalnoj Hrvatskoj u ovom istraživanju

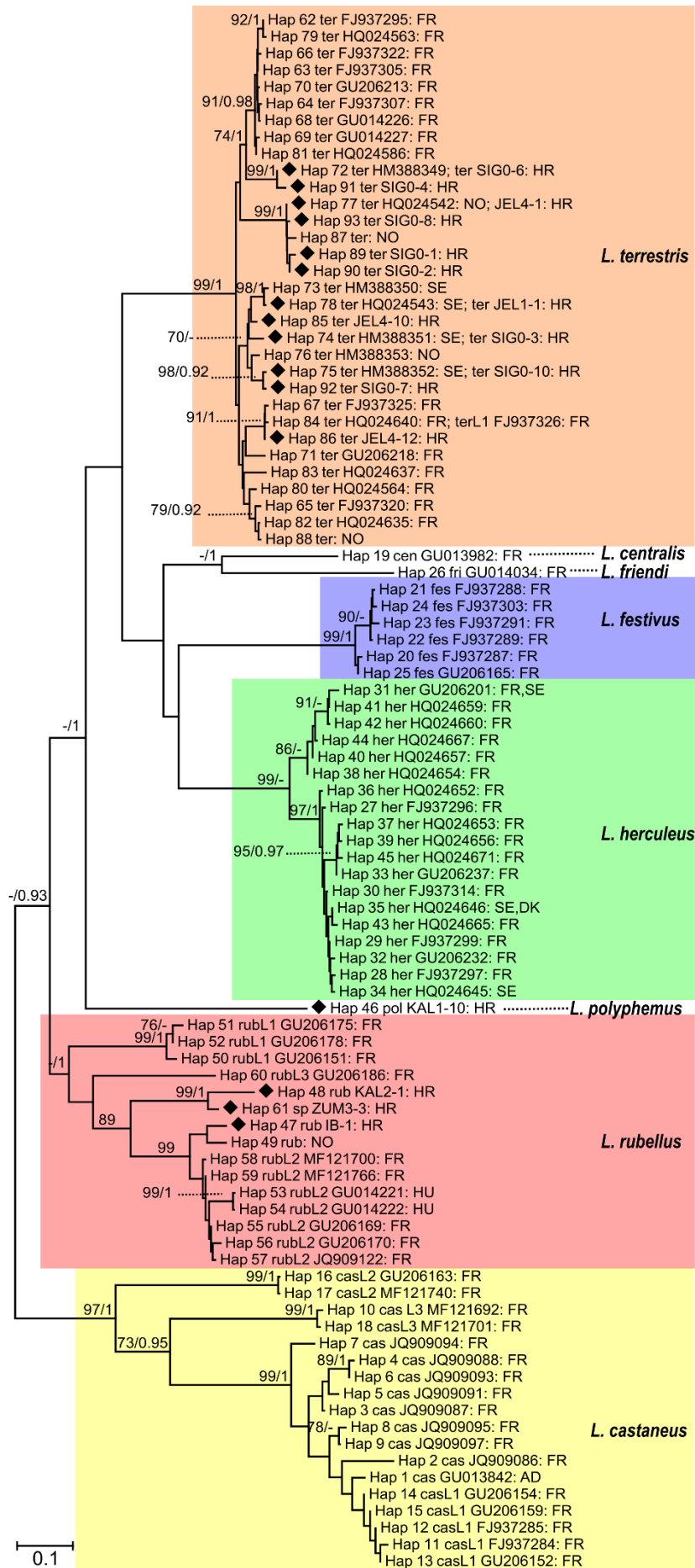
Filogenetička analiza za rod *Lumbricus* prikazuje topologiju stabla s minimalno 8 različitih haplogrupa za sve COI sekvence iz Europe uključujući i Hrvatsku (Slika 12). Haplogrupe su označene različitim bojama, odnosno imenima vrsta. Barkodirane COI sekvence roda *Lumbricus* kontinentalne Hrvatske upadaju u tri različite haplogrupe: *L. terrestris*, *L. polyphemus* i *L. rubellus*.

Sa stabla se može uočiti preklapanje haplotipova *L. terrestris* oznake 72, 74, 75 i 78 u Hrvatskoj i Švedskoj, te haplotipa 77 u Norveškoj i Hrvatskoj. Haplotipovi oznake 72, 77, 89, 90, 91 i 93 jasno su odvojeni od haplotipova oznake 74, 75, 78, 85, 86 i 92.

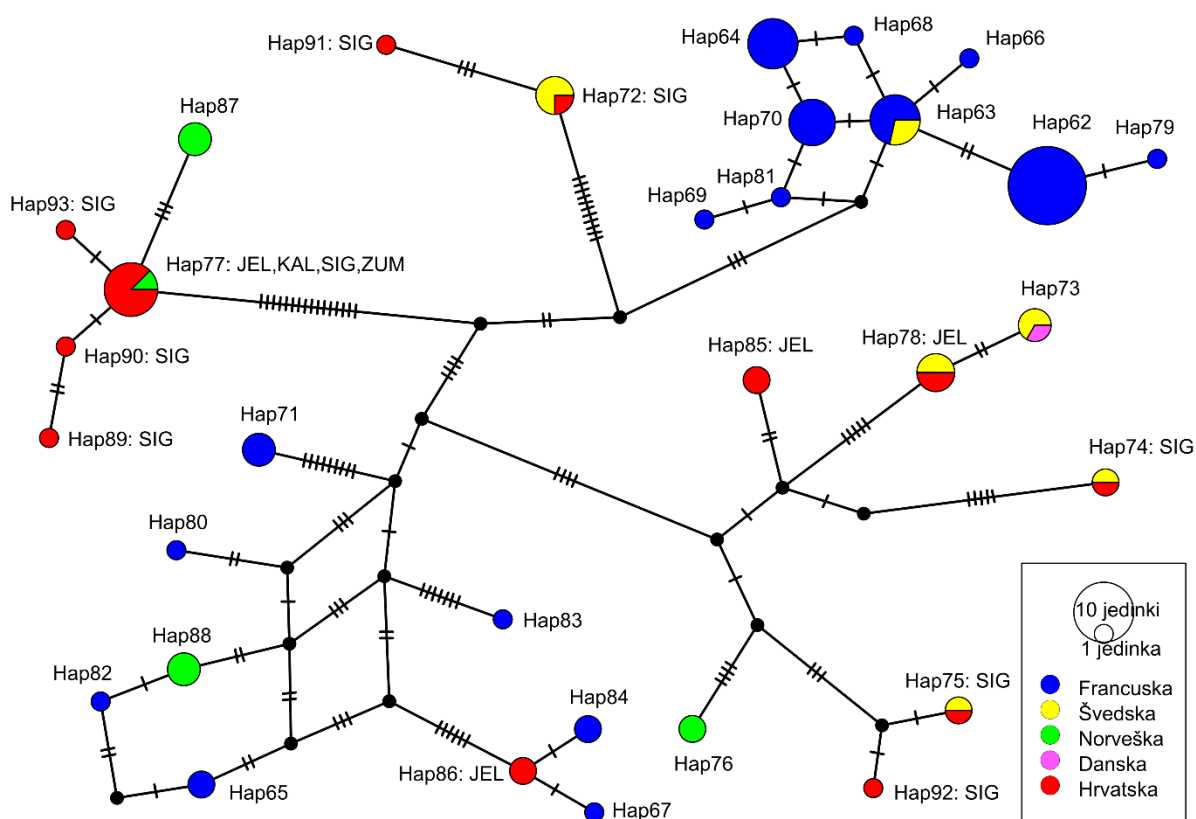
Među analiziranim sekvencama koje pripadaju jedinkama roda *Lumbricus* iz Europe do sada nije bila zabilježena sekvenca za gen COI vrste *L. polyphemus*. Jedini primjerak ove vrste kojoj je sekvencirana COI regija nađen je na Kalniku. Iako se ne može govoriti o sigurnoj podržanosti tog haplotipa, filogenetsko stablo prikazuje jasno izdvajanje ove vrste od ostalih skupina.

Juvenilna jedinka oznake haplotipa 61 koja je morfološki određena kao *Lumbricus* sp., svrstana je u haplogrupu *L. rubellus* unutar koje se nalaze još dva haplotipa oznake 47 i 48. Vrijednosti samoučitanja i posteriorne vjerojatnosti ukazuju na podržano razdvajanje linija haplotipa oznake 47 od haplotipova oznake 48 i 61 kao i međusobno odvajanje haplotipova oznake 48 i 61.

Geografski i genetski prikaz putem filogenetske mreže za vrstu *L. terrestris* upućuje na postojanje minimalno 5 zasebnih skupina haplotipova među kojima su jedinke iz Hrvatske prisutne čak u četiri skupine, dok u jednoj skupini s velikom učestalosti francuskih haplotipova i jednog haplotipa iz Švedske nije zabilježen ni jedan primjerak iz Hrvatske. Haplotipovi hrvatskih jedinki se preklapaju, odnosno ulaze u skupinu haplotipova u kojima su jedinke iz Norveške i Švedske što je vidljivo iz filogenetske mreže (Slika 13).



**Slika 12.** ML filogenetsko stablo izrađeno za rod *Lumbricus* upotrebom programa MEGA dobiveno analizom gena COI. Na mjestu grananja naznačene su samo vrijednosti samoučitanja  $\geq 70$  i posteriorne vjerojatnosti Bayesove analize  $\geq 0.9$ . Duljina grana odgovara broju supstitucijskih promjena (mjerna crta označava broj supstitucija po nukleotidnom položaju). Sekvence su označene s oznakom haplotipa (npr. „Hap 1“), morfološkom identifikacijom (npr. „ter“ za *L. terrestris*), šifrom uzorka iz ovog istraživanja, genetičkom linijom (ako je poznata, npr. „L1“), GenBank pristupnom šifrom (ako postoji, npr. HQ024563), te dvoslovnom oznakom države prema kodu ISO 3166-1 (AD – Andora, DK – Danska, FR – Francuska, HR – Hrvatska, HU – Mađarska, NO – Norveška, SE – Švedska).



**Slika 13.** Učestalost haplotipova za gen COI vrste *Lumbricus terrestris* u Europi prikazani *Median-Joining* filogenetskom mrežom. Veličina kružnica odgovara učestalosti haplotipova, crni kružići predstavljaju posljednje zajedničke potomke koji nisu prisutni u uzorcima, a kratke crtice okomite na grane prikazuju mutacijske korake (više crtica - dulje vrijeme divergencije).



## 5. RASPRAVA

U Hrvatskoj do sada nije provedena ni jedna filogenetička analiza raznolikosti gujavica što znači da je to prvo takvo istraživanje na ovom području. Metoda DNA barkodiranja danas je neizbježna u mnogim molekularnim istraživanjima gujavica jer za razliku od determinacije vrsta uz pomoć morfoloških karakteristika omogućuje točniju identifikaciju vrsta uključujući kriptičke vrste te tako daje bolji uvid u cjelokupnu raznolikost vrsta gujavica (Porco i sur., 2013). Na temelju dosadašnjih istraživanja može se zaključiti da je fauna Hrvatske vrlo bogata i raznolika vrstama gujavica (Mršić, 1991; Hackenberger Kutuzović i Hackenberger Kutuzović, 2013). Rezultati filogenetičkih analiza (Slika 11, 12 i 13) pokazali su da je raznolikost unutar istraživanih rodova *Lumbricus* i *Aporrectodea* mnogo veća nego što je to morfološki bilo moguće odrediti te se može govoriti o novim linijama unutar već postojećih vrsta što je u slaganju sa prethodnim studijama (Chahartaghi 2007; King i sur. 2008; Pérez-Losada i sur., 2009; James i sur., 2010; Porco i sur., 2013). Također, rezultati molekularnih analiza pokazali su prednost u identifikaciji juvenilnih jedinki koje je vrlo teško determinirati na temelju morfoloških karakteristika. Analizirane COI sekvence roda *Lumbricus* iz sjevernog dijela Europe pokazuju sličnosti s hrvatskim što se može povezati s događajima koji su se zbili za vrijeme Pleistocena i posljednje glacijacije. Obzirom na mekano tijelo gujavica, postoje vrlo slabi fosilni zapisi pa je teško razlučiti pretke kao i evolucijski karakter vrsta (Pearce i sur., 1990; Pérez-Losada i sur., 2009), ali se može pretpostaviti njihova povijest na temelju raznolikosti vrsta u područjima koja nisu bila prekrivena ledom, a koja uključuju i naše prostore (Hewitt, 2000). Budući da posljednje ledeno doba nije zahvatilo Balkansko područje, uključujući i Hrvatsku, pretpostavlja se da su Lumbricidae koje danas nalazimo u sjevernim područjima Europe migrirale tamo iz južne Europe nakon zadnjeg povlačenja ledenog pokrova (Hewitt, 2000). Ovu pretpostavku potvrdili su Mathieu i Davies (2014) za prostor Francuske gdje su dokazali da je na sjevernom području koji je bio zahvaćen ledenim pokrovom tijekom posljednjeg ledenog doba zabilježena manja raznolikost gujavica u smislu brojnosti vrsta, podvrsta i raznolikosti gena ( $\gamma$ -raznolikost) od južnog područja koje je bilo slobodno od leda.

## 5.1. Genska raznolikost gujavica roda *Aporrectodea* u kontinentalnoj Hrvatskoj

Unutar roda *Aporrectodea* ističe se kompleks vrsta *A. caliginosa* koji se javlja u nekoliko linija koje pokazuju visoku gensku raznolikosti (King i sur., 2008; Novo i sur., 2010, Pérez-Losada i sur., 2009; Shekhovstov i sur., 2015) te se smatraju dobrim organizmima za proučavanje genskih promjena (Shekhovstov i sur., 2015). Gotovo sve vrste gujavica iz područja Hrvatske unutar navedenog kompleksa određene su kao *A. caliginosa* što nije u suglasju sa molekularno-filogenetičkim analizama u kojima ni jedan haplotip iz Hrvatske ne ulazi u grupu haplotipova *A. caliginosa* sensu stricto. Ova vrsta tipičan je predstavnik na području Francuske (Mršić, 1999) stoga nije ni čudno što je veći broj sekvenci unutar ove haplogrupe iz područja Francuske. Poznato je da vrste ovog kompleksa pokazuju malu intraspecijsku varijabilnost u morfološkim karakteristikama što otežava identifikaciju vrsta. Prethodna istraživanja pokazala su da unutar kompleksa vrsta *A. caliginosa* postoje dvije vrlo odvojene genske linije. Jednu osnovnu liniju čine *A. tuberculata* i *A. caliginosa* koje imaju monofiletsko porijeklo te pokazuju visok stupanj divergencije od druge linije unutar koje se razlikuju *A. trapezoides*, *A. longa* i *A. nocturna*, čime je dokazano da je *A. longa* dio kompleksa vrsta *A. caliginosa* (Pérez-Losada i sur., 2009). Stablo jasno prikazuje odvajanje haplogrupa *A. caliginosa* od grupe *Aporrectodea* sp. 2 u koju ulaze sekvence iz Hrvatske. Zabilježeno je tek jedno preklapanje haplotipova iz Francuske i Hrvatske koji ulaze u skupinu *A. nocturna*. Na temelju prijašnjih istraživanja, filogenetskog stabla i podržanosti divergencije između grupa *A. longa* i *Aporrectodea* sp. 2, može se zaključiti da haplogrupa *Aporrectodea* sp. 2 zapravo predstavlja vrstu *A. nocturna* što bi potvrdilo njeno postojanje u Hrvatskoj. Na temelju navedenog, otvara se pitanje o postojanju prave vrste, odnosno linije *A. caliginosa* u kontinentalnoj Hrvatskoj. Sigurno je da se na temelju relativno malog broja obrađenih sekvenci još uvijek ne može dobiti odgovor na to pitanje, već je potrebno obraditi puno veći set podataka na području kontinentalne Hrvatske pa i šire kako bi se dobila potpunija slika o navedenom kompleksu vrsta.

Na filogenetskom stablu prikazana je samo jedna COI sekvenca jedinke morfološki određene kao *A. smaragdina* (iz Sungera) koja ne ulazi ni u jednu haplogrupu pa se može govoriti o njenoj prisutnosti u Hrvatskoj. No s obzirom na nedovoljan broj podataka, ne može se na temelju topologije stabla zaključiti dovoljno o samoj genskoj raznolikosti ove vrste.

Zanimljivo je da dva haplotipa („Hap 105 cal“ i „Hap 112 cal“) iz Hrvatske za koje je određeno da pripadaju vrsti *A. caliginosa* (grupa *Aporrectodea* sp. 6) ne upadaju u haplogrupu

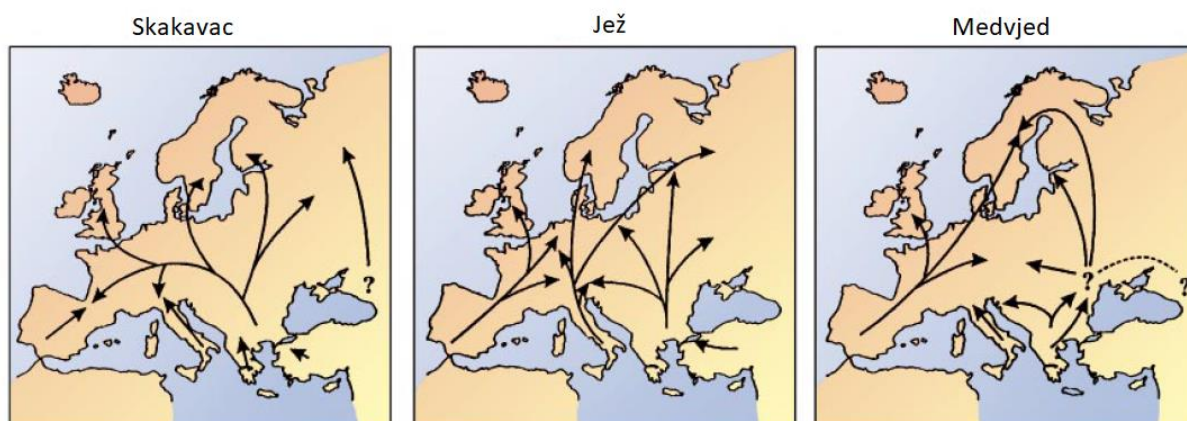
*A. caliginosa*, već su u bliskom odnosu s haplotipom oznake „Hap 38“ iz Francuske koji je određen kao *A. icterica*. S obzirom da COI sekvence ova dva haplotipa iz Hrvatske pripadaju juvenilnim jedinkama, vjerojatno je došlo do pogreške prilikom morfološke identifikacije. Na temelju vrijednosti samoučitanja i posteriorne vjerojatnosti između ova dva haplotipa iz Hrvatske, može se zaključiti da čine dvije vrlo odvojene linije. Jedinka oznake „Hap 112“ iz Orahovice i „Hap 105“ iz Kalnika mogle bi pripadati vrsti *Aporrectodea pannoniella* (Mršić, 1987) ili *Aporrectodea papukiana* (Mršić, 1987) što se može pretpostaviti na temelju Mršićeve monografije gujavica (1999) koji je prvi opisao ove vrste na području Papuka, odnosno Psunja. S obzirom da je prikupljen samo po jedan uzorak unutar svakog haplotipa, potrebno je provesti analize na većem broju uzoraka kako bi se mogla potvrditi navedena teza.

Haplogrupa *A. rosea* prikazuje izrazitu gensku raznolikost. Sekvence oznake „Hap 101 sp“ i „Hap 113 sp“ koje su zbog izrazito otežane identifikacije juvenilnih jedinki određene kao *Aporrectodea* sp., jasnu upadaju u haplogrupu *A. rosea*. Osim toga, unutar navedene haplogrupe upada i sekvenca jedinke koja je morfološki određena kao *A. caliginosa*. S obzirom da je ova jedinka opisana kao poluodrasla nije ni čudno što je došlo do pogreške u identifikaciji na temelju morfoloških karakteristika čime je ponovno potvrđena prednost DNA barkodiranja u odnosu na morfologiju. Topologija stabla također govori o velikom broju mogućih linija unutar navedene grupe nastale zbog djelomičnog nedostatka reproduktivnih barijera što su potvrdila i prethodna istraživanja (Porco i sur., 2013; Porco i sur., 2018) pa se na temelju ovih analiza može isključiti status vrste unutar ove haplogrupe.

Ovim istraživanjem potvrdila se heterogenost unutar roda *Aporrectodea* kao i izrazita kompleksnost u taksonomiji i identifikaciji na temelju morfoloških karakteristika i filogenetičkih analiza. Također, na temelju istraživanja može se potvrditi postojanje kompleksa vrsta i novih linija unutar navedenog roda u kontinentalnoj Hrvatskoj.

## 5.2. Genska raznolikost gujavica roda *Lumbricus* u kontinentalnoj Hrvatskoj

Molekularno-filogenetičke analize za gen COI gujavica roda *Lumbricus* iz kontinentalne Hrvatske pokazale su visoku raznolikost što upućuje na prisutnost novih linija, odnosno podvrsta unutar opisanih vrsta pa se može govoriti o kriptičkim vrstama koje je nemoguće razlikovati na temelju morfoloških karakteristika. Vrsta *L. terrestris* pokazuje visok stupanj divergencije što je zorno prikazano filogenetskom mrežom. Zanimljivo je da jedinke iz Hrvatske determinirane kao *L. terrestris* dijele haplotipove s ostatkom Europe, točnije skandinavskim područjem (Norveška i Švedska) te pokazuje sličnosti s vrstama iz Francuske i Danske. To se može objasniti ekološkim i klimatskim promjenama koje su se zbile tijekom i nakon kvartarnog ledenog doba (Hewitt, 2000). Naime, ciklus posljednjeg ledenog doba obilježile su velike klimatske oscilacije koje su dovele do velikih promjena u distribuciji vrsta. Velik broj vrsta je nestao sa područja koja su bila prekrivena ledom, dok su se mnoge raširile na nove lokalitete s odgovarajućim klimatskim uvjetima (Hewitt, 2000). Tijekom posljednjeg ledenog doba veliki ledeni sloj pokrivaio je mnoge prostore na sjevernom dijelu Europe kao što je Skandinavija, Velika Britanija, sjeverna Njemačka i Poljska. Uz niske temperature, u Europi je prevladavala i suha klima (Richter, 2010). Populacije koje su bile rasprostranjene na sjevernim područjima, vjerojatno su se povukle prema južnim dijelovima Europe pridruživši se vrstama koje su već nastanjivale te predjele. Mjesta u kojima su sve te vrste preživjele zadnju glacijaciju nazivaju se refugijskim prostorima: Iberijski poluotok, Italija, Kavkaz te Balkansko područje (Sechi, 2013) uključujući i teritorij Hrvatske. Pretpostavlja se da je *L. terrestris* izdržao posljednje ledeno doba u refugijalnim područjima Balkana (Bouché 1969, 1972; Richter, 2010) uključujući i teritorij Hrvatske. Prilikom naseljavanja novih teritorija, populacije su prolazile kroz mnoge prilagodbe što je rezultiralo velikim genskim varijacijama, tj. razlikama u strukturi genoma. Hewitt (2000) smatra da je topografija južnih dijelova Europe omogućila prikladna staništa kroz nekoliko glacijalnih ciklusa što je pak rezultiralo divergencijom vrsta u nove linije, odnosno podvrste. Nakon povlačenja leda dogodila se brza ekspanzija populacija u sjever Europe. Budući da su se nakon zadnje oledbe vrste s refugijskog prostora, uključujući i Balkansko područje mogle nesmetano širiti u pravcu sjevera (Slika 14) (Mathieu i Davies, 2014) kao i jugozapadne dijelove Europe (Richter, 2010) nije iznenađujuće preklapanje haplotipova *L. terrestris* iz Hrvatske sa onima iz Skandinavije (Švedske i Norveške).



**Slika 14.** Glavna područja refugija – Iberija, Italija, Balkansko područje (uključujući teritorij Republike Hrvatske) i Kavkaz i tri modela postglacijalne kolonizacije iz južne Europe na temelju razlike u DNA sekvencama skakavaca (*Chorthippus parallelus*), ježa (*Erinaceus europeus / concolor*) i medvjeda (*Ursus arctos*). Ovi migracijski putovi ne odgovaraju gujavicama porodice Lumbricidae, već prikazuju moguće smjerove njihovih migracija. Izvor: Hewitt (2000).

Filogenetska mreža (Slika 13) najbolje prikazuje prostornu i genetsku varijabilnost *L. terrestris* u Hrvatskoj u odnosu na ostale dijelove Europe. Vidljivo je da u jednu haplogrupu s jedinkama iz Francuske ne ulaze haplotipovi iz Hrvatske što je vjerojatno razlog različitih migracijskih putova tijekom zadnje oledbe (Slika 14). S druge strane, haplotip iz Hrvatske oznake 86 može se na temelju filogenetske mreže tumačiti kao ishodišni iz kojeg su nastala druga dva haplotipova iz Francuske. Poznato je da se anecične vrste vrlo sporo kreću, osobito *L. terrestris* koji se širi brzinom od 10 m po godini (Edwards i Bohlen, 1996; Richter, 2010). Ako bi se pretpostavila dvostruka brzina širenja populacija od 20 m godišnje, ova vrsta je mogla propotovati samo 200 km u zadnjih približno 10 000 godina nakon posljednjeg ledenog doba, što je samo jedna desetina udaljenosti između najjužnijih i najsjevernijih područja Europe (Richter, 2010). To dovodi do upitnog aktivnog širenja navedene vrste te prijedloga da njeno širenje snažno ovisi o drugim načinima raspršivanja kao što je, primjerice ljudskom aktivnošću, odnosno ljudskim migracijama (Richter, 2010).

Filogenetsko stablo ukazuje na moguće postojanje novih linija iz Hrvatske unutar vrste *L. rubellus*, odnosno postojanje dviju divergentne monofiletske skupine. Na području kontinentalne Hrvatske prikupljeno je tek nekoliko jedinki vrste *L. rubellus* čije sekvence gena COI i filogenetska topologija ukazuje na visoku gensku raznolikost unutar ove haplogrupe. Genski dokazi upućuju na to da je *L. rubellus* zapravo kriptični kompleks vrsta

čije su se klade međusobno razdvojile prije 15 milijuna godina (Sechi, 2013). Jedinke determinirane kao vrsta *L. rubellus* iz Kalnika i Samoborskog gorja pokazuju međusobnu podržanu gensku divergenciju kao i divergenciju u odnosu na jedinke iz Osijeka. S obzirom na mali broj uzorkovanja i uzorkovanih jedinki potrebno je provesti istraživanje na većem broju jedinki kako bi se dobio bolji uvid u raznolikost linija. Na mnoge epigejne vrste gujavica koje ovise o vlažnim staništima i koje su prisutne na površini tla, kao što je *L. rubellus*, utjecali su klimatski procesi vezani uz veću količinu oborina (Sechi, 2013). Klimatske promjene, za razliku od uvjeta tla, imale su snažan utjecaj na promjene ekosustava tla te su bile najvažniji limitirajući čimbenik u distribuciji epigejne vrste *L. rubellus* što govori o općoj preferenciji peregrinih vrsta gujavica za hladnijim i vlažnijim klimama (Rundgren, 1974; Edwards, 1996; Tiunov i sur. 2006; Sechi, 2013). Događaji iz kvartarnog ledenog doba imali su značajan utjecaj na distribuciju vrsta europske flore i faune, kao i na formiranje i uspostavljanje velikog broja linija unutar vrsta (Hewitt 2000) čime se može objasniti uzrok velike genske raznolikosti unutar kompleksa *L. rubellus* u Hrvatskoj.

Na području kontinentalne Hrvatske (Kalnik) pronađena je jedna jedinka koja je morfološki određena kao *L. polyphemus*. Mjesto nalaza ove vrste, odnosno *locus typicus* je Beč, Austrija (Mršić, 1999) pa se na temelju glacijalnih događaja također može zaključiti o njenoj distribuciji prema južnim dijelovima Europe. U BOLD bazi podataka nije zabilježena ni jedna COI sekvenca koja pripada navedenoj vrsti što znači da je ovo prva zabilježena *L. polyphemus* sekvenca za gen COI. Filogenetičke analize i topologija stabla prikazuju jasno i duboko razdvajanje ove vrste u odnosu na druge vrste roda *Lumbricus*. Iako je potrebno provesti istraživanje na većem broju uzorka, za sada se na temelju dobivenih rezultata filogenetičke analize može govoriti o morfološki i molekularno podržanoj vrsti.

Razumijevanje bioraznolikosti gujavica u kontekstu klimatskih promjena važno je zato što one imaju važnu ulogu u funkcioniranju tla i održavanju biološke raznolikosti tih ekosustava (Bouché, 1977; Lavelle, 1988; Mathieu i Davies, 2014). S obzirom na ključnu ulogu gujavica u ekosustavu tla, potrebno je bolje razumijevanje kriptične raznolikosti kako bi se istražio značaj divergentnih linija unutar svojih ekosustava (Sechi, 2013). Prema tome, na prostoru Republike Hrvatske potrebno je provesti istraživanja na daleko većem broju uzoraka u svrhu dobivanje šire slike raznolikosti faune gujavica.

## 6. ZAKLJUČAK

- Molekularno-filogenetičke analize u ovom istraživanju pokazale su visoku gensku raznolikost i postojanje novih linija gujavica rodova *Aporrectodea* i *Lumbricus* iz kontinentalne Hrvatske
- Potvrđena je visoka genska divergencija unutar kompleksa vrsta *A. caliginosa* i *A. rosea*.
- Filogenetsko stablo za rod *Aporrectodea* pokazalo je da u ovom istraživanju nije uzorkovana ni jedna jedinka vrste *A. caliginosa*. Unutar navedenog kompleksa *A. caliginosa* iz područja Hrvatske primijenjenim molekularno-filogenetičkim metodama utvrđena je samo *A. nocturna*.
- Molekularne analize potvrdile su *A. smaragdina* kao zasebnu vrstu.
- Dva haplotipa dobivena iz juvenilnih jedinki koje su morfološki određene kao *A. caliginosa* ipak su na filogenetskom stablu izdvojeni u zasebnu novu skupinu koja vjerojatno odgovara vrsti *A. pannoniella* ili *A. papukiana*.
- Zabilježen je veliki broj jedinki koje su morfološki određene kao *Aporrectodea* sp. što je još jedan dokaz kompleksne identifikacije unutar roda *Aporrectodea*.
- Rezultati filogenetskog stabla i filogenetske mreže pokazali su izrazitu divergenciju i velik broj linija unutar kriptičkog kompleksa vrsta *Lumbricus terrestris* koje bi mogle predstavljati nove podvrste.
- Postglacijalne migracije iz refugijskih prostora Hrvatske prema sjeveru Europe najvjerojatniji su razlog preklapanja pojedinih haplotipova iz Skandinavije i Hrvatske.
- Potvrđen je status vrste *L. polyphemus* čija je sekvenca za gen COI prva i jedina zabilježena u Hrvatskoj i Europi.
- Utvrđene su najmanje dvije nove linije vrste *L. rubellus* iz kontinentalne Hrvatske koje bi mogle predstavljati nove podvrste unutar ovog kriptičkog kompleksa vrsta.
- Molekularno-filogenetičke analize pokazale su prednost u identifikaciji vrsta u odnosu na morfologiju. Da bi se dobio bolji uvid u raznolikost vrsta u Hrvatskoj i šire te potvrdili dosadašnji rezultati, potrebno je provesti istraživanje na većem broju uzoraka.

## 7. LITERATURA

Atiyeh R. M., Domínguez J., Subler S., Edwards C. A. (2000): Changes in biochemical properties of cow manure during processing by earthworms (*Eisenia andrei*, Bouché) and the effects on seedling growth. *Pedobiologia* **44**: 709-724.

Avice J. C. (2000): *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press.

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

Baxevanis A. D., Oullette B. F. F. (2001): *Bioinformatics: a practical guide to the analysis of genes and proteins*. Second edition. Wiley-Interscience.

Bensasson D., Zhang D., Hartl D. L., Hewitt H. G. (2001): Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends in Ecology & Evolution* **16**: 314-321.

Bienert F., Danieli S., Miquel C., Coissac E., Poillot C., Brun J. J., Taberlet P. (2012): Tracking earthworm communities from soil DNA. *Molecular Ecology* **21**: 2017-2030.

Birmingham E., Moritz C. (1998): Comparative phylogeography. *Molecular Ecology* **7**: 367-369.

Blakemore R. J. (2009): Cosmopolitan earthworms - a global and historical perspective. *Annelids in Modern Biology*: 257-283.

Bromham L. (2009): Why do species vary in their rate of molecular evolution. *Biology Letters* **5**: 401-404.

Bundy J. G., Sidhu J. K., Rana F., Spurgeon D. J., Svendsen C., Wren J. R., Strüzenbaum S. R., Morgan A. J., Killa P. (2008): 'Systems toxicology' approach identifies coordinated metabolic responses to copper in a terrestrial non-model invertebrate, the earthworm *Lumbricus rubellus*. *BMC biology* **6(1)**: 25.

Casquet J., Thebaud C., Gillespie R. G. (2012): Chelex without boiling, a rapid and easy technique to obtain stable amplifiable DNA from small amounts of ethanol-stored spiders. *Molecular Ecology Resources* **12(1)**: 136-141.

Chang C. H., Rougerie R., Chen J. H. (2009): Identifying earthworms through DNA barcodes: Pitfalls and promise. *Pedobiologia* **52(3)**: 171-180.



- Csuzdi C., Chang C.-H., Pavlacek T., Szederjesi T., Esopi D., Szlavecz K. (2016): Molecular phylogeny and systematics of native North American lumbricid earthworms (Clitellata: Megadrili). *PLoS ONE* **12(8)**: e0181504.
- Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. (2012): JModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* **9(8)**: 772.
- Domínguez J., Aira M., Porto P. G., Díaz Cosín D. J., Pérez-Losada M. (2018): Multigene phylogeny reveals two isolated and relic earthworm genera (Oligochaeta: Lumbricidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* **18**: 258-274.
- Drummond A. J., Rambaut A. (2007): BEAST: bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* **7(1)**: 214.
- Dupont L., Torres-Leguizamon M., René-Corail P., Mathieu J. (2017): Landscape features impact connectivity between soil populations: a comparative study of gene flow in earthworms. *Molecular Ecology* **26(12)**: 3128-3140.
- Edwards C. A., Bohlen P. J. (1996): *Biology and ecology of earthworms* (3th Ed.). Chapman & Hall, London.
- Emerson B. C., Hewitt G. M. (2005): Phylogeography. *Current Biology* **15**: 367-371.
- Felsenstein J. (1973): Maximum likelihood and minimum-steps methods for estimating evolutionary trees from data on discrete characters. *Systematic Biology* **22**: 240-249.
- Felsenstein J. (1981): Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* **17**: 368-376.
- Fernández R., Almadóvar A., Novo M., Simancas B., Cosín D. J. D. (2012): Adding complexity to the complex; new insights into the phylogeny, diversification and origin of parthenogenesis in the *Aporrectodea caliginosa* species complex (Oligochaeta, Lumbricidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **64(2)**: 368-379.
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. (1994): DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **3(5)**: 294-299.
- Giska I., Sechi P., Babik W. (2015): Deeply divergent sympatric mitochondrial lineages of the earthworm *Lumbricus rubellus* are not reproductively isolated. *BMC Evolutionary Biology* **15(1)**: 217.

- Habdija I., Primc Habdija B., Radanović I., Špoljar M., Matoničkin Kepčija R., Vujčić Karlo S., Miliša M., Ostojić A., Sertić Perić M. (2011): Protista-Protozoa, Metazoa-Imnvertebrata; Strukture i funkcije. Alfa, Zagreb.
- Hackenberger Kutuzović D. (2012): Struktura i prostorno-vremenska raspodjela populacija gujavica (Oligochaeta: Lumbricidae) duž visinskoga transekta Ogulin-Novi Vinodolski. Doktorska disertacija, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.
- Hackenberger Kutuzović D., Hackenberger Kutuzović B. (2013): Checklist of the earthworm fauna of Croatia (Oligochaeta: Lumbricidae). *Zootaxa* **3710**: 1-30.
- Hackenberger Kutuzović D., Hackenberger Kutuzović B., Hackenberger Kutuzović D. (2015): Ključ za određivanje gujavica Hrvatske (ErIK). Osijek: Bioquant (software).
- Halavuk T. (2013): Zoogeografska analiza rasprostranjenosti gujavica (Lumbricidae) na području Hrvatske. Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek.
- Hall B. G. (2007): Phylogenetic Trees Made Easy: A How-To Manual, Third Edition. Sinauer Associates Inc, Sunderland, str.173.
- Hebert P. D. N., Ratnasingham S., deWaard J. R. (2003): Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B* **270**: 96-99.
- Hewitt G. (2000): The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* **405(6789)**: 907-913.
- Hwang U. W., Kim W. (1999): General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *The Korean Journal of Parasitology* **37**: 215-228.
- James S. W., Porco D., Decaëns T., Richard B., Rougerie R., Erséus C. (2010): DNA barcoding reveals cryptic diversity in *Lumbricus terrestris* L., 1758 (Clitellata): resurrection of *L. herculeus* (Savigny, 1826). *PloS ONE*. 5, e15629.
- Kalafatić M. (1998): Osnove biološke evolucije. Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Katoh S. (2013): MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* **30**: 772-780.
- King R. A., Tibble A. L., Symondson W. O. (2008): Opening a can of worms: unprecedented sympatric cryptic diversity within British lumbricid earthworms. *Molecular Ecology* **17**: 4684-4698.

- King R. A., Vaughan I. P., Bell J. R., Bohan D. A., Symondson W. O. (2010): Prey choice by carabid beetles feeding on an earthworm community analysed using species-and-lineage-specific PCR primers. *Molecular Ecology* **19(8)**: 1721-1732.
- Klarica J., Kloss-Brandstätter A., Traugott M., Juen A. (2011): Comparing four mitochondrial genes in earthworms - Implications for identification, phylogenetics, and discovery of cryptic species. *Soil Biology & Biochemistry* **45**: 23-30.
- Leigh J. W., Bryant D. (2015): PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution* **6(9)**: 1110-1116.
- Li W. H. (1997): *Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, str. 475.
- Librado P., Rozas J. (2009): DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**: 1451-1452.
- Martinsson S., Rhodén C., Erséus C. (2017) Barcoding gap, but no support for cryptic speciation in the earthworm *Aporrectodea longa* (Clitellata: Lumbricidae). *Mitochondrial DNA Part A* **28(2)**: 147-155.
- Martinsson S., Erséus C. (2017): Cryptic speciation and limited hybridization within *Lumbricus* earthworms (Clitellata: Lumbricidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **106**: 18-27.
- Mathieu J., Jonathan Davies T. (2014): Glaciation as an historical filter of below-ground biodiversity. *Journal of Biogeography* **41(6)**: 1204-1214.
- Matoničkin I., Klobučar G., Kučinić M. (2010): *Opća zoologija*. Školska knjiga, Zagreb.
- Mau B., Newton M., Larget B. (1999): Bayesian phylogenetic inference via Markov chain Monte Carlo methods. *Biometrics* **55**: 1-12.
- Mortiz C., Faith D. P. (1998): Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. *Molecular Ecology* **7**: 419-429.
- Mršić N. (1991): *Monograph on Earthworms (Lumbricidae) of the Balkans*. Slovenian Academy of Sciences and Arts, Ljubljana.
- Nei M., Kumar S. (2000): *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.

- Novo M., Almodóvar A., Fernández R., Trigo D., Díaz Cosín D. J. (2010): Cryptic speciation of hormogastrid earthworms revealed by mitochondrial and nuclear data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **56**: 507-512.
- Nylander J. A., Olsson U., Alström P., Sanmartín I. (2008): Accounting for phylogenetic uncertainty in biogeography: a Bayesian approach to dispersal-vicariance analysis of the thrushes (Aves: Turds). *Systematic Biology* **57(2)**: 257-268.
- Paoletti M. G. (1999): The role of earthworms for assessment of sustainability and as bioindicators. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **74(1-3)**: 137-155.
- Pérez-Losada M., Bloch R., Breinholt J.W., Pfenninger M., Domínguez J. (2011): Taxonomic assessment of Lumbricidae (Oligochaeta) earthworm genera using DNA barcodes. *European Journal of Soil Biology* **48**: 41-47.
- Pérez-Losada M., Ricoy M., Marshall J. C., Domínguez J. (2009): Phylogenetic assessment of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* species complex (Oligochaeta: Lumbricidae) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **52**: 293-302.
- Pearce T. G., Oates K., Carruthers W. J. (1990): A fossil earthworm embryo (Oligochaeta) from beneath a Late Bronze Age midden at Potterne, Wiltshire, UK. *Journal of Zoology* **220(4)**: 537-542.
- Pop A. A., Cech G., Wink M., Csuzdi C., Pop V. V. (2007): Application of 16S, 18S rDNA and COI sequences in the molecular systematics of the earthworm family Lumbricidae (Annelida, Oligochaeta). *European Journal of Soil Biology* **43**: 43-52.
- Porco D., Decaëns T., Deharveng L., James S. W., Skarzynski D., Erséus C., Butt K. R., Richard B., Hebert P. D. N. (2013): Biological invasions in soil: DNA barcoding as a monitoring tool in a multiple taxa survey targeting European earthworms and springtails in North America. *Biological Invasions* **15(4)**: 899-910.
- Porco D., Chang C. H., Dupont L., James S., Richard B., Decaëns T. (2018): A reference library of DNA barcodes for the earthworms from Upper Normandy: Biodiversity assessment, new records, potential cases of cryptic diversity and ongoing speciation. *Applied Soil Ecology* **124**: 362-371.
- Posada D., Crandall K. A. (2001): Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology & Evolution* **16**: 37-45.

- Richter K. (2010): Genetic structure in European populations of the earthworm *Lumbricus terrestris*. Kassel university press GmbH, Kassel.
- Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P., Ayres D.L., Darling A., Höhna S., Larget B., Liu L., Suchard M.A., Huelsenbeck J.P. (2012): MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* **61**(3): 539-542.
- Saitou N., Nei M. (1987): The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 406-425.
- Schmidt B. (2018): Molekularno-filogenetičke i morfološke značajke zelenih žaba (rod *Pelophylax*) u Hrvatskoj. Diplomski rad, Biološki odsjek, Prirodoslovno–matematički fakultet, Zagreb.
- Schulman A. H., Flavell A. J., Ellis T. H. N. (2004): The application of LTR retrotransposons as molecular markers in plants. *Methods in Molecular Biology* **260**: 145-173.
- Sechi P. (2013): An evolutionary history of the peregrine epigeic earthworm *Lumbricus rubellus*. Doctoral dissertation, Cardiff University.
- Shekhovtsov S. V., Golovanova E. V., Peltek S. E. (2015): Different dispersal histories of lineages of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* (Lumbricidae, Annelida) in the Palearctic. *Biological Invasions* **18**(3): 751-761.
- Spurgeon D. J., Stürzenbaum S. R., Svendsen C., Hankard P. K., Morgan A. J., Weeks J. M., Kille P. (2004): Toxicological, cellular and gene expression responses in earthworms exposed to copper and cadmium. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **138**(1): 12-21.
- Stojanović M., Milutinović T., Karaman S. (2008): Earthworm (Lumbricidae) diversity in the Central Balkans: An evaluation of their conservation status. *European Journal of Soil Biology* **44**: 57-64.
- Swoford D. L. (2001): PAUP\*: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Version 4.0. beta10. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. (2013): MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**: 2725-2729.

Torres-Leguizamon M., Mathieu J., Decaëns T., Dupont L. (2014): Genetic structure of earthworm populations on a regional scale: inferences from mitochondrial and microsatellite molecular markers in *Aporrectodea icterica* (Savigny 1826). *PloS ONE* **9**(7): e101597.

Tzagoloff A., Myers A. M. (1986): Genetics of mitochondrial biogenesis. *The Annual Review of Biochemistry* **55**: 249-285.

Wilke T., Schultheiß R., Albrecht, C. (2009): As Time Goes by: A Simple Fool's Guide to Molecular Clock Approaches in Invertebrates. *American Malacological Bulletin* **27**: 25-45.

Xiong J. (2006): *Essential Bioinformatics*. Cambridge University Press, Published in the United States of America by Cambridge University Press, New York. The Edinburgh Building, Cambridge, UK, str.: 127-169.

Zuckerandl E., Pauling L. (1965): Molecules as Documents of Evolutionary History. *The Journal of Theoretical Biology* **8**: 357-366.

Internetski izvori:

<https://www.sciencelearn.org.nz/resources/7-niches-within-earthworms-habitat>

<http://www.boldsystems.org/>

[http://taxo.drilobase.org/index.php?title=List\\_of\\_taxa/Lumbricidae](http://taxo.drilobase.org/index.php?title=List_of_taxa/Lumbricidae)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

## 8. ŽIVOTOPIS

### Lucija Hodak

- Zelengaj 28, 40329 Kotoriba (Hrvatska)
- 0994023204
- lucijahodak16@gmail.com

### Datum i mjesto rođenja:

- 2.11.1994., Čakovec

### Radno iskustvo:

- 09.4.2018. – 26.4.2018.: OŠ Kajzerica, Zagreb (Hrvatska) – zamjena kao nastavnik biologije i kemije

### Obrazovanje:

- 2013.- danas: Prirodoslovno-matematički fakultet Zagreb; biologija i kemija; smjer: nastavnički
- Srednja škola Prelog; smjer: Opća gimnazija

### Vannastavni program:

- Sudjelovanje u popularno-znanstvenoj manifestaciji „Noć biologije“ (2015., 2016., 2017.) i „Otvoreni dani kemije“ (2018.)
- Volontiranje u pripremama za državnu maturu iz kemije putem Udruge mladih “Efekt“ Grada Preloga
- Sudjelovanje na 11. Hrvatskom biološkom kongresu (Šibenik, 2012.)

### Priznanja i nagrade:

- Osvojeno 3. mjesto na državnom natjecanju iz biologije u kategoriji istraživačkih radova (Vrsar, 2012.)

# PRILOG

## Prilog 1. Rezultati morfoloških karakteristika za rod *Aporrectodea*.

Broj uzoraka	Datum uzorkovanja	Lokalitet	Vrsta	Geografske koordinate	Oznaka uzorka	pojas	prostomij	dužina (mm)	širina (mm)	pubertetska izbočina	oblik pub. izbočine	četine	m.s.o.	atrij	boja	Opaska
1	11.5.2016	Zagreb, kvart Sigečica	<i>A. caliginosa</i>	45.799529°N, 16.002603°E	SIG0-12	26-33	Epiloban 1/3	86	4	31-33	razdvojena	usko sparene	15	+	nepigmentirana	
2	11.5.2016	Zagreb, kvart Sigečica	<i>A. caliginosa</i>	45.799529°N, 16.002603°E	SIG0-14	26-33	Epiloban 1/3	106	4	31-33	razdvojena	usko sparene	15	+	nepigmentirana	
3	11.5.2016	Zagreb, kvart Sigečica	<i>A. caliginosa</i>	45.799529°N, 16.002603°E	SIG0-15	26-33	Epiloban 1/3	95	3,5	31-33	razdvojena	usko sparene	15	+	nepigmentirana	
4	11.5.2016	Zagreb, kvart Sigečica	<i>A. caliginosa</i>	45.799529°N, 16.002603°E	SIG0-16	-	Epiloban 1/3	97	3	-	-	usko sparene			nepigmentirana	juvenilna
5	11.5.2016	Zagreb, kvart Sigečica	<i>A. caliginosa</i>	45.799529°N, 16.002603°E	SIG0-17	26-33	Epiloban 1/3	85	4	31-33	razdvojena	usko sparene	15	+	nepigmentirana	
6	11.5.2016	Zagreb, kvart Sigečica	<i>A. caliginosa</i>	45.799529°N, 16.002603°E	SIG0-18	26-33	Epiloban 1/3	97	3	31-33	razdvojena	usko sparene	15	+	nepigmentirana	
7	11.5.2016	Zagreb, kvart Sigečica	<i>A. caliginosa</i>	45.799529°N, 16.002603°E	SIG0-20	-	Epiloban 1/3			-	-	usko sparene			nepigmentirana	poluodrasla
8	11.5.2016	Zagreb, kvart Sigečica	<i>A. caliginosa</i>	45.799529°N, 16.002603°E	SIG0-21	-	Epiloban 1/3			-	-	usko sparene			nepigmentirana	juvenilna
9	11.5.2016	Zagreb, kvart Sigečica	<i>A. caliginosa</i>	45.799529°N, 16.002603°E	SIG0-22	-	Epiloban 1/3			-	-	usko sparene			nepigmentirana	juvenilna
10	12.5.2016	Žumberak-Samoborsko gorje, Grdanci	<i>A. caliginosa</i>	45.824965°N, 15.647939°E	ZUM11-1	28-33	Epiloban 1/3	107	3	31-33	razdvojena	usko sparene	15	+	smečkasta dorzalno	
11	12.5.2016	Žumberak-Samoborsko gorje, Grdanci	<i>Aporrectodea</i> sp.	45.824461°N, 15.635895°E	ZUM2-1	26-33	Epiloban 1/3	40	2	28-31	trakasta	usko sparene	15	+	nepigmentirana	
12	12.5.2016	Žumberak-Samoborsko gorje, Grdanci	<i>A. rosea</i>	45.824461°N, 15.635895°E	ZUM2-3	-	Epiloban 1/3			-	-	usko sparene			nepigmentirana	juvenilna
13	12.5.2016	Žumberak-Samoborsko gorje, "Divlje vode"	<i>A. caliginosa</i>	45.836542°N, 15.608731°E	ZUM4-4	28-35	epiloban 1/3 zatvoren			31-33	trakasta	usko sparene	15	+	smečkasta	
14	12.5.2016	Žumberak-Samoborsko gorje, "Divlje vode"	<i>A. caliginosa</i>	45.836542°N, 15.608731°E	ZUM10-7		epiloban					usko sparene			nepigmentirana	juvenilna
15	12.5.2016	Žumberak-Samoborsko gorje	<i>A. caliginosa</i>	45.810392°N, 15.508617°E	ZUM12-1	28-35	1/3 epiloban zatvoren	127	5	31-33	razdvojene	usko sparene	15	+	dorzalno smečkasta	



Broj uzoraka	Datum uzorkovanja	Lokalitet	Vrsta	Geografske koordinate	Oznaka uzorka	pojas	prostomij	duljina (mm)	širina (mm)	pubertetska izbočina	oblik pub.izbočine	četine	m.s.o.	atrij	boja	Opaska
16	12.5.2016	Žumberak-Samoborsko gorje	<i>A. caliginosa</i>	45.810392°N, 15.508617°E	ZUM12-2	28-35	1/3 epiloban zatvoren	143	5	31-33	razdvojene	usko sparene	15	+	dorzalno smečkasta	
17	12.5.2016	Žumberak-Samoborsko gorje	<i>A. caliginosa</i>	45.810392°N, 15.508617°E	ZUM12-3	28-35	1/3 epiloban zatvoren	120	4,5	31-33	razdvojene	usko sparene	15	+	dorzalno smečkasta	
18	12.5.2016	Žumberak-Samoborsko gorje	<i>A. caliginosa</i>	45.810392°N, 15.508617°E	ZUM12-4	28-35	1/3 epiloban zatvoren	124	4	31-33	razdvojene	usko sparene	15	+	dorzalno smečkasta	
19	12.5.2016	Žumberak-Samoborsko gorje	<i>A. caliginosa</i>	45.810392°N, 15.508617°E	ZUM12-5	28-35	1/3 epiloban zatvoren	115	4	31-33	razdvojene	usko sparene	15	+	dorzalno smečkasta	
20	12.5.2016	Žumberak-Samoborsko gorje	<i>A. caliginosa</i>	45.810392°N, 15.508617°E	ZUM12-7	28-35	1/3 epiloban zatvoren	107	4	31-33	razdvojene	usko sparene	15	+	dorzalno smečkasta	
21	12.5.2016	Žumberak-Samoborsko gorje	<i>A. caliginosa</i>	45.810392°N, 15.508617°E	ZUM12-8	28-35	1/3 epiloban zatvoren	117	4	31-33	razdvojene	usko sparene	15	+	dorzalno smečkasta	
22	12.5.2016	Žumberak-Samoborsko gorje	<i>A. caliginosa</i>	45.810392°N, 15.508617°E	ZUM12-9	-	Epiloban 1/3			-	-	usko sparene				juvenilna
23	12.5.2016	Žumberak-Samoborsko gorje	<i>A. rosea</i>	45.810392°N, 15.508617°E	ZUM12-10	23-31	Epiloban 1/3	56	3	28-30	trakasta	usko sparene	15	++	nepigmentirana	
24	14.5.2016	Kalnik	<i>A. caliginosa</i>	46.133372°N, 16.444165°E	KAL1-6		Epiloban 1/3				polurazdvojene	usko sparene	15	+	nepigmentirana	
25	14.5.2016	Kalnik	<i>A. caliginosa</i>	46.165297°N, 16.515861°E	KAL5-1		Epiloban 1/3	66	5	29-33	polurazdvojene	usko sparene	15	+	nepigmentirana	poluodrasla
26	14.5.2016	Kalnik	<i>A. rosea</i>	46.165297°N, 16.515861°E	KAL5-7	25-32	1/3 epiloban zatvoren	42	3	29-31	trakasta	usko sparene	15	+	nepigmentirana	
27	14.5.2016	Kalnik	<i>A. rosea</i>	46.161115°N, 16.556371°E	KAL6-9	25-33	1/3 epiloban otvoren	41	2,5	29-32	trakasta	usko sparene	15	+	nepigmentirana	
28	14.5.2016	Kalnik	<i>A. rosea</i>	46.161115°N, 16.556371°E	KAL6-11	24-32	Epiloban 1/3	24	2	29-31	trakasta	usko sparene	15	+	nepigmentirana	
29	14.5.2016	južna strana Ivančice, Jelenščak	<i>A. caliginosa</i>	46.163625°N, 16.289423°E	JEL3-1	25-33	1/3 epiloban zatvoren			31-33	trakasta	usko sparene	15	+	nepigmentirana	
30		Lipik	<i>A. rosea</i>	45.421424N, 17.144960E	LAR4-1	26-32	Epiloban 1/3			29-31	trakasta	usko sparene	15	+	nepigmentirana	

Broj uzoraka	Datum uzorkovanja	Lokalitet	Vrsta	Geografske koordinate	Oznaka uzorka	pojas	prostomij	dujina (mm)	širina (mm)	pubertetska izbočina	oblik pub.izbočine	četine	m.s.o.	atrij	boja	Opaska
31	14.5.2016	Iza benta, Osijek	<i>A. rosea</i>		IB-6	(24)25-32	Epiloban 1/3			28-30(31)	trakasta	usko sparene	15	+(+)	nepigmentirana	
32	16.06.2016.	Sunger	<i>A. smaragdina</i>		sunger-1	25-33	1/2 epiloban zatvoren			29-33	trakasta	usko sparene	15	++	smaragdno zelena	
33	16.06.2016.	Sunger	<i>A. rosea</i>		sunger-2	25-32	1/2 epiloban zatvoren			29-31	trakasta	usko sparene	15	+	nepigmentirana	
34	2.8.2016	Orahovica (travnjak)	<i>A. caliginosa</i>	45.519733°N 17.862142°E	ORA0-7	-	Epiloban 1/3			-	-	usko sparene	-	-	nepigmentirana	juvenilna
35	2.8.2016	Orahovica (travnjak)	<i>Aporrectodea</i> sp.	45.519733°N 17.862142°E	ORA0-8	26-33	1/2 epiloban zatvoren			28-32	trakasta	usko sparene	15	-	nepigmentirana	
36	2.8.2016	Orahovica (travnjak)	<i>Aporrectodea</i> sp.	45.519733°N 17.862142°E	ORA0-9	26-33	1/2 epiloban zatvoren			28-32	trakasta	usko sparene	15	-	nepigmentirana	
37	2.8.2016	Orahovica (travnjak)	<i>A. rosea</i>	45.519733°N 17.862142°E	ORA0-10	26-33	1/2 epiloban zatvoren			28-32	trakasta	usko sparene	15	++	nepigmentirana	
38	30.4.2017	šuma kod Halaševa	<i>A. georgii</i>	45.592436N, 18.639561E	BAR2-1	29-35	1/3 eoiloban zatvoren	48	3,5	31,33	razdvojene poput prijanjalke	usko sparene	15	-	nepigmentirana	
39	30.4.2017	šuma kod Halaševa	<i>A. georgii</i>	45.592436N, 18.639561E	BAR2-2	29-35	1/3 epiloban zatvoren	38	3	31,33	razdvojene poput prijanjalke	usko sparene	15	-	nepigmentirana	
40	30.4.2017	šuma kod Halaševa	<i>A. caliginosa</i>	45.592436N, 18.639561E	BAR2-3		Epiloban 1/3	30	3	29-31	trakasta	usko sparene	15	++	nepigmentirana	
41	30.4.2017	šuma kod Halaševa	<i>A. rosea</i>	45.592436N, 18.639561E	BAR2-4	25-33	Epiloban 1/3	35	3	29-31	trakasta	usko sparene	15	-	nepigmentirana	
42	30.4.2017	šuma kod Halaševa	<i>A. caliginosa</i>	45.592436N, 18.639561E	BAR2-11	26-32	epiloban	53	2	29-31	trakasta	usko sparene	15	+	nepigmentirana	
43	1.5.2017	travnjak kod benta	<i>A. rosea</i>	45.592436N, 18.639561E	BAR3-3	25-32	epiloban	55	3	29-31	trakasta	usko sparene	15	++	nepigmentirana	
44	1.5.2017	travnjak kod benta	<i>A. rosea</i>	45.592436N, 18.639561E	BAR3-6	24-32	epiloban	58	2,5	29-31	trakasta	usko sparene	15	++	nepigmentirana	

Prilog 2. Rezultati morfoloških karakteristika za rod *Lumbricus*.

Broj uzoraka	Datum uzorkovanja	Lokalitet	Vrsta	Geografske koordinate	Oznaka uzorka	klitelum	prostomij	dujina (mm)	širina (mm)	pubertetska izbočina	oblik pub.izbočine	četine	m.s.o.	atrij	boja	Opaska
1	11.5.2016	Zagreb, kvart Sigečica	<i>L. terrestris</i>	45.799529°N, 16.002603°E	<b>SIG0-1</b>	32-37	tamiloban	146	8	33-36	trakasta	usko sparene	15	++	dorzalno ljubičasta	
2	11.5.2016	Zagreb, kvart Sigečica	<i>L. terrestris</i>	45.799529°N, 16.002603°E	<b>SIG0-2</b>	32-37	tamiloban	146	7	33-36	trakasta	usko sparene	15	++	dorzalno ljubičasta	
3	11.5.2016	Zagreb, kvart Sigečica	<i>L. terrestris</i>	45.799529°N, 16.002603°E	<b>SIG0-3</b>	32-37	tamiloban	136	7	33-36	trakasta	usko sparene	15	++	dorzalno ljubičasta	
4	11.5.2016	Zagreb, kvart Sigečica	<i>L. terrestris</i>	45.799529°N, 16.002603°E	<b>SIG0-4</b>	32-37	tamiloban	142	7	33-36	trakasta	usko sparene	15	++	dorzalno ljubičasta	
5	11.5.2016	Zagreb, kvart Sigečica	<i>L. terrestris</i>	45.799529°N, 16.002603°E	<b>SIG0-5</b>	32-37	tamiloban	145	7	33-36	trakasta	usko sparene	15	++	dorzalno ljubičasta	
6	11.5.2016	Zagreb, kvart Sigečica	<i>L. terrestris</i>	45.799529°N, 16.002603°E	<b>SIG0-6</b>		tamiloban					usko sparene			dorzalno ljubičasta	juvenilna
7	11.5.2016	Zagreb, kvart Sigečica	<i>L. terrestris</i>	45.799529°N, 16.002603°E	<b>SIG0-7</b>	32-37	tamiloban	127	7	33-36	trakasta	usko sparene	15	++	dorzalno ljubičasta	
8	11.5.2016	Zagreb, kvart Sigečica	<i>L. terrestris</i>	45.799529°N, 16.002603°E	<b>SIG0-8</b>		tamiloban					usko sparene			dorzalno ljubičasta	juvenilna
9	11.5.2016	Zagreb, kvart Sigečica	<i>L. terrestris</i>	45.799529°N, 16.002603°E	<b>SIG0-9</b>		tamiloban					usko sparene			dorzalno ljubičasta	juvenilna
10	11.5.2016	Zagreb, kvart Sigečica	<i>L. terrestris</i>	45.799529°N, 16.002603°E	<b>SIG0-10</b>		tamiloban					usko sparene			dorzalno ljubičasta	juvenilna
11	11.5.2016	Zagreb, kvart Sigečica	<i>L. terrestris</i>	45.799529°N, 16.002603°E	<b>SIG0-11</b>		tamiloban					usko sparene			dorzalno ljubičasta	juvenilna
12	11.5.2016	Zagreb, kvart Sigečica	<i>L. terrestris</i>	45.799529°N, 16.002603°E	<b>SIG0-13</b>		tamiloban					usko sparene			dorzalno ljubičasta	juvenilna
13	11.5.2016	Zagreb, kvart Sigečica	<i>L. terrestris</i>	45.799529°N, 16.002603°E	<b>SIG0-19</b>		tamiloban					usko sparene			dorzalno ljubičasta	juvenilna
14	12.5.2016	Žumberak-Samoborsko gorje, Grdanci	<i>L. terrestris</i>	45.824461°N, 15.635895°E	<b>ZUM2-4</b>	26-31	tamilobni			27-30	trakasta	usko sparene	15		dorzalno tamno ljubičasta	
15	12.5.2016	Žumberak-Samoborsko gorje, Grdanci	<i>L. rubellus</i>	45.830527°N, 15.632532°E	<b>ZUM3-3</b>	27-32	tamiloban			28-31	trakasta	usko sparene			dviljubičasto-crvena	

Broj uzoraka	Datum uzorkovanja	Lokalitet	Vrsta	Geografske koordinate	Oznaka uzorka	klitelum	prostomij	duljina (mm)	širina (mm)	pubertetska izbočina	oblik pub.izbočine	četine	m.s.o.	atrij	boja	Opaska
16	12.5.2016	Žumberak-Samoborsko gorje, "Divlje vode"	<i>L. terrestris</i>	45.836542°N, 15.608731°E	ZUM4-1	32-37	taniloban			33-36	trakasta	usko sparene	15	++	dorzalno ljubičasta	
17	12.5.2016	Žumberak-Samoborsko gorje, "Divlje vode"	<i>L. terrestris</i>	45.836542°N, 15.608731°E	ZUM4-2	32-37	taniloban			33-36	trakasta	usko sparene	15	++	dorzalno ljubičasta	
18	12.5.2016	Žumberak-Samoborsko gorje, "Divlje vode"	<i>L. terrestris</i>	45.836542°N, 15.608731°E	ZUM4-3	31-36	taniloban			32-35	trakasta	usko sparene	15	++	dv. ap ljubičasto-crvena	
19	12.5.2016	Žumberak-Samoborsko gorje, Stojdraga	<i>L. terrestris</i>	45.838410°N, 15.571891°E	ZUM7-1	32-37	taniloban	95	7	1/2 33-36	trakasta	usko sparene	15	+	dorzalno smeđa	
20	12.5.2016	Žumberak-Samoborsko gorje, Poklek	<i>L. terrestris</i>	45.818890°N, 15.530837°E	ZUM10-1	32-37	taniloban	136	9	33-36	trakasta	usko sparene	15	++	dv ljubičasto-crvena	
21	12.5.2016	Žumberak-Samoborsko gorje	<i>L. terrestris</i>	45.775255°N, 15.469115°E	ZUM14-1	32-37	taniloban	132	7	33-36	trakasta	usko sparene	15	++	dorzalno crveno-ljubičasta	
22	12.5.2016	Žumberak-Samoborsko gorje, Poklek	<i>L. terrestris</i>	45.762675°N, 15.428750°E	ZUM15-1	31-37	taniloban	125	6	33-36	trakasta	usko sparene	15	++	dorzalno ljubičasta	
23	14.5.2016	Kalnik	<i>Lumbricus</i> sp	46.133372°N, 16.444165°E	KAL1-10		taniloban					usko sparene				
24	14.5.2016	Kalnik	<i>L. rubellus</i>	46.128405°N, 16.438962°E	KAL2-1	27-32	taniloban			28-31	trakasta	usko sparene	15	-	dorzalno ljubičasto-crvena	
25	14.5.2016	Kalnik	<i>L. rubellus</i>	46.128405°N, 16.438962°E	KAL2-2	27-32	taniloban			28-31	trakasta	usko sparene	15	-	tamno crvena	
26	14.5.2016	Kalnik	<i>L. rubellus</i>	46.128405°N, 16.438962°E	KAL2-4	27-32	taniloban			28-31	trakasta	usko sparene	15	-	tamno crvena	
27	14.5.2016	Kalnik	<i>L. terrestris</i>	46.125931°N, 16.436554°E	KAL3-1	32-37	taniloban	135	7	1/2 33-1/2 36	trakast	usko sparene	15	++	dorzalno smeđa	
28	14.5.2016	Kalnik	<i>L. terrestris</i>	46.125931°N, 16.436554°E	KAL3-4	32-37	taniloban	160	7	33-36	trakast	usko sparene	15	++	dorzalno ljubičasta	
29	14.5.2016	Kalnik	<i>L. rubellus</i>	46.161115°N, 16.556371°E	KAL6-5	27-32	taniloban	55	3,5	28-31	trakasta	usko sparene	15		dorzalno ljubičasto-crvena	
30	14.5.2016	Kalnik	<i>L. rubellus</i>	46.161115°N, 16.556371°E	KAL6-6	27-32	taniloban	50	3,5	28-31	trakasta	usko sparene	15		dorzalno ljubičasto-crvena	

Broj uzoraka	Datum uzorkovanja	Lokalitet	Vrsta	Geografske koordinate	Oznaka uzorka	klitelum	prostorij	duljina (mm)	širina (mm)	pubertetska izbočina	oblik pub.izbočine	četine	m.s.o.	atrij	boja	Opaska
31	14.5.2016	južna strana Ivančice, Jelenščak	<i>L. terrestris</i>	46.129475°N, 16.289337°E	JEL1-1	32-37	tanilobni	120	7	33-36	trakasta	usko sparene	15	++	dorzalno ljubičasta	
32	14.5.2016	južna strana Ivančice, Jelenščak	<i>L. terrestris</i>	46.148649°N, 16.279886°E	JEL4-1	32-37	tanilobni	112	7,5	33-36	trakasta	usko sparene	15	++	dorzalno ljubičasta	
33	14.5.2016	južna strana Ivančice, Jelenščak	<i>L. terrestris</i>	46.148649°N, 16.279886°E	JEL4-2	31-37	tanilobni	94	7	(33-1/2 37)	trakasta	usko sparene	15	++	dorzalno ljubičasta	
34	14.5.2016	južna strana Ivančice, Jelenščak	<i>L. terrestris</i>	46.148649°N, 16.279886°E	JEL4-3	31-36	tanilobni	110	7,5	33-36	trakasta	usko sparene	15	++	dorzalno ljubičasta	
35	14.5.2016	južna strana Ivančice, Jelenščak	<i>L. terrestris</i>	46.148649°N, 16.279886°E	JEL4-4	32-37	tanilobni	97	8	33-36	trakasta	usko sparene	15	++	dorzalno ljubičasta	
36	14.5.2016	južna strana Ivančice, Jelenščak	<i>L. terrestris</i>	46.148649°N, 16.279886°E	JEL4-5		taniloban					usko sparene			dorzalno ljubičasta	juvenilna
37	14.5.2016	južna strana Ivančice, Jelenščak	<i>L. terrestris</i>	46.148649°N, 16.279886°E	JEL4-10		tanilobni					usko sparene			dorzalno ljubičasta	juvenilna
38	14.5.2016	južna strana Ivančice, Jelenščak	<i>L. terrestris</i>	46.148649°N, 16.279886°E	JEL4-11		tanilobni					usko sparene			dorzalno ljubičasta	juvenilna
39	14.5.2016	južna strana Ivančice, Jelenščak	<i>L. terrestris</i>	46.148649°N, 16.279886°E	JEL4-12	27-32	taniloban	60	3	30-1/2 32	trakasta	usko sparene	15	++	dorzalno smečkasta	
40	14.5.2016	Iza benta, Osijek	<i>L. rubellus</i>	45.567833°N, 18.687528°E	IB-1	27-32	taniloban			28-30	trakasta	usko sparene	15	+	crven dv gradijent	
41	30.4.2017	šuma kod Halaševa	<i>L. rubellus</i>	45.592436°N, 18.639561°E	BAR2-10	27-32	taniloban	45	3	27-31	trakasta	usko sparene	15	-	tamnocrvena dorzalno	
42	1.5.2017	travnjak kod benta	<i>L. rubellus</i>	45.592436°N, 18.639561°E	BAR3-5	27-32	taniloban	100	4	27-31	trakasta	usko sparene	15	-	tamnocrvena dorzalno	