

Morfološka i genska raznolikost vrsta roda *Apodemus* na području Parka prirode Medvednica

Čuljak, Dora

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:217:437353>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-10**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Dora Čuljak

Morfološka i genska raznolikost vrsta roda
***Apodemus* na području Parka prirode**
Medvednica
Diplomski rad

Zagreb, veljača 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Dora Čuljak

**Morphological and genetic diversity of
Apodemus species in the Nature Park
Medvednica**

Master thesis

Zagreb, February 2022

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za kralježnjake na Zoologijskom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod voditeljstvom izv. prof. dr. sc. Ivane Buj. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije (mag. biol. exp.), modul zoologija.

ZAHVALE

Najprije se zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Ivani Buj na mentorstvu te ukazanom povjerenju i slobodi kako prilikom izrade ovog diplomskog rada, tako i u dosadašnjim suradnjama na fakultetu. Hvala i na svim prilikama koje mi je do sada pružila zbog kojih sam naučila sve što znam o radu s malim sisavcima.

Nadalje, hvala stručnim suradnicama Luciji Ivić i Luciji Onorato te kolegici Sari Pleše na pomoći, strpljenju, utrošenom vremenu te ugodnoj atmosferi prilikom rada. Učinile ste ovo iskustvo manje strašnim nego se na početku činilo.

Posebno se želim zahvaliti kolegici i prijateljici Tei Hutten koja je jednostavno najbolja terenska partnerica te uz koju se sav posao čini puno lakši nego što je. Također hvala za svu pomoć zadnjih 6 godina studija. Sigurna sam da ne bih sve ovo pregrmila bez tebe.

Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima na podršci, povjerenju i bodrenju sve ove godine. Hvala prijateljicama Mariji, Ani i Mii na društvu prilikom izlazaka na neke od terena te prijatelju Draganu na mentalnoj podršci u zadnjim danima izrade.

Na koncu, hvala mojoj majci Jesenki (nikako ne „Jasenki“) koja mi je uvijek u svemu bila najčvršći oslonac i koja me podupirala u svim životnim odlukama, kakve god bile. Neka ovaj rad bude potvrda da je sve dosad dobro činila ♥

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Morfološka i genska raznolikost vrsta roda *Apodemus* na području Parka prirode Medvednica

Dora Čuljak

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Rod šumskih miševa, *Apodemus* Kaup, 1829 u Hrvatskoj broji 5 vrsta, od kojih su najčešće *Apodemus flavicollis* (Melchior, 1834) i *Apodemus sylvaticus* (Linnaeus, 1758). Ove dvije vrste su morfološki ekološki te ponašanjem vrlo slične. Često žive simpatrijski, te zauzimaju gotovo iste areale. Obje su prisutne na području Parka prirode Medvednica, a uz njih tu nalazimo i lako prepoznatljivu vrstu *Apodemus agrarius* (Pallas, 1771). Cilj ovog istraživanja bio je uz pomoć gena za citokrom *b* dobiti uvid u srodstvene odnose i gensku raznolikost ovih vrsta. Također, cilj je bio usporediti njihove morfometrijske značajke pri čemu sam probala pronaći metodu za raspoznavanje i determinaciju vrsta *A. flavicollis* i *A. sylvaticus* na temelju vanjskih mjera tijela. Filogenetska rekonstrukcija metodama najveće parsimonije i najveće vjerojatnosti te broj dijagnostičkih mjesta ukazali su na prisutnost kriptičke raznolikosti i jasnu odvojenost istraživanih jedinki u dvije vrste: *A. flavicollis* te *Apodemus* sp. Niti jedna analizirana jedinka ne pripada vrsti *A. sylvaticus*. Visoka genska raznolikost istraživanih skupina upućuje na stabilnost i dugo postojanje ovih populacija na području Medvednice, što ide u prilog hipotezi o postojanju glacijalnog refugija na području jugoistočne Europe. Za pouzdaniju determinaciju vrsta putem njihove morfometrije potrebno je ponoviti test na većem uzorku. Također je potrebna taksonomska revizija roda *Apodemus* u Hrvatskoj.

(46 stranica, 12 slika, 10 tablica, 45 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: morfometrija, filogenetika, citokrom *b*, *A. flavicollis*, *A. sylvaticus*, *A. agrarius*

Voditelj: izv. prof. dr. sc. Ivana Buj

Ocjenitelji:

Izv. prof. dr. sc. Ivana Buj

Izv. prof. dr. sc. Duje Lisičić

Prof. dr. sc. Antun Alegro

Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

Morphological and genetic diversity of *Apodemus* species in the Nature Park Medvednica

Dora Čuljak

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

So far 5 species of field mice in the genus *Apodemus* Kaup, 1829 have been recorded in Croatia. The most common ones are *Apodemus flavicollis* (Melchior, 1834) and *Apodemus sylvaticus* (Linnaeus, 1758). These two species are morphologically, ecologically, and behaviorally very similar, often having sympatric distribution. Both are present in the area of Nature Park Medvednica, along with easily discernible species *Apodemus agrarius* (Pallas, 1771). Aim of this research was to gain insight into their phylogeny and genetic diversity through cytochrome *b* genes. Their morphometrics were compared as well to find a method for discrimination of species *A. flavicollis* and *A. sylvaticus* based on body measurements. Phylogenetic reconstruction using maximum parsimony and maximum likelihood, as well as the number of sites of fixed differences in DNA have shown a clear separation of tested individuals into two groups: *A. flavicollis* and *Apodemus* sp., while no individual was identified as *A. sylvaticus*. High genetic diversity of studied taxa signifies stability and long presence of these population on Medvednica mountain, which is in accordance with the hypothesis of glacial refugia in the southeastern Europe. To get a reliable discriminating morphometrical characteristic, research should be repeated on a bigger sample. A taxonomic revision of genus *Apodemus* in Croatia is needed.

(46 pages, 12 figures, 10 tables, 45 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: morphometrics, phylogenetics, cytochrome *b*, *A. flavicollis*, *A. sylvaticus*, *A. agrarius*

Supervisor: Dr. Sc. Ivana Buj, Assoc. Prof.

Reviewers:

Dr. Sc. Ivana Buj, Assoc. Prof.

Dr. Sc. Duje Lisičić, Assoc. Prof.

Dr. Sc. Antun Alegro, Prof.

Thesis accepted:

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. Uvod..... | 1 |
| 1.1 O istraživanju malih sisavaca u Hrvatskoj..... | 1 |
| 1.2 Vrste unutar roda <i>Apodemus</i> te njihovi srodstveni odnosi..... | 1 |
| 1.3 Sličnosti i razlike vrsta <i>A. flavicollis</i> i <i>A. sylvaticus</i> | 5 |
| 1.4 Metode i problemi prilikom determinacije <i>A. sylvaticus</i> i <i>A. flavicollis</i> | 9 |
| 1.5 Molekularna filogenija i upotreba genskih markera..... | 13 |
| 1.6 <i>Apodemus agrarius</i> kao treći stanovnik Parka prirode Medvednica..... | 14 |
| 2. Cilj istraživanja..... | 16 |
| 3. Materijali i metode..... | 17 |
| 3.1 Područje istraživanja..... | 17 |
| 3.2 Prikupljanje podataka..... | 18 |
| 3.3 Materijali i njihova obrada..... | 21 |
| 3.4 Filogenetska rekonstrukcija..... | 24 |
| 3.5 Genska raznolikost i molekularna dijagnostika..... | 25 |
| 3.6 Statistička analiza morfometrijskih podataka..... | 25 |
| 4. Rezultati..... | 26 |
| 4.1 Filogenetska rekonstrukcija..... | 26 |
| 4.2 Genska raznolikost i molekularna dijagnostika..... | 30 |
| 4.3 Statistička analiza morfometrijskih podataka..... | 32 |
| 5. Rasprava..... | 35 |
| 6. Zaključak..... | 38 |
| 7. Literatura..... | 39 |
| 8. Prilozi..... | 44 |
| 9. Životopis..... | 46 |

1. UVOD

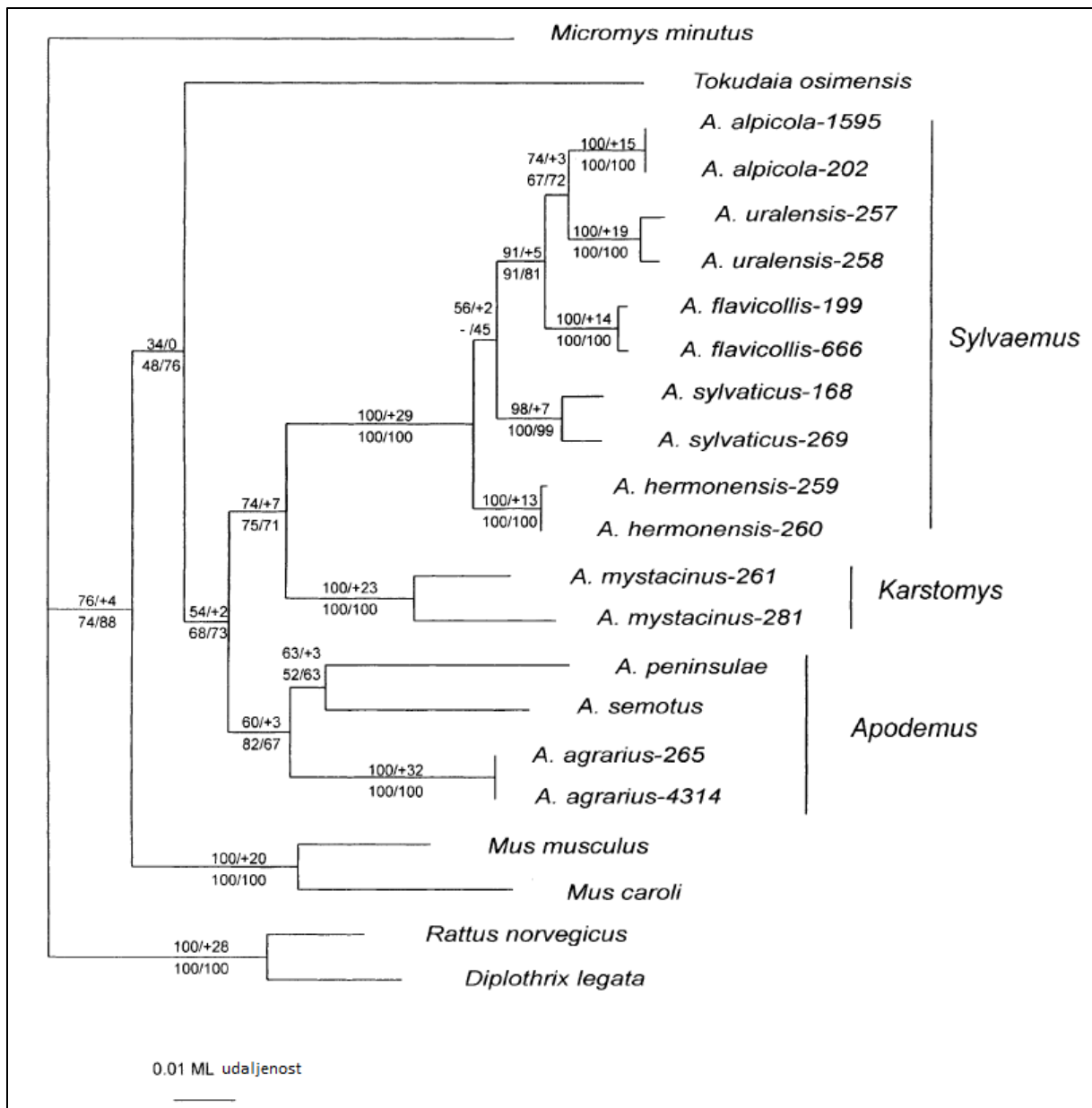
1.1 O istraživanju malih sisavaca u Hrvatskoj

Znanje o malim sisavcima na području Hrvatske temelji se uglavnom na istraživanjima iz prošlog stoljeća, dok se u novije vrijeme njima bavi u sklopu istraživanja zoonoza ili njihovog utjecaja na gospodarene šume. Od razdoblja kada su mali sisavci zadnje detaljnije istraživani, dogodile su se mnoge taksonomske promjene i razjasnili su se srodstveni odnosi na području Europe, no u Hrvatskoj istraživanja nisu usklađena s njima stoga je usporedba podataka gotovo nemoguća. Zbog toga su status i rasprostranjenost nekih vrsta nepoznati, a i sama crvena knjiga nije revidirana od 2006. godine (Antolović i sur., 2006). Ovaj jaz još je veći kada govorimo o korištenju molekularnih metoda pri istraživanju malih sisavaca u Hrvatskoj. Situacija je osobito problematična i zbog toga što se jugoistočna Europa smatra vrućom točkom raznolikosti (eng. *hot spot*) malih sisavaca (Antolović i sur., 2006; Temple i Terry, 2007). Nova istraživanja malih sisavaca na području Hrvatske mogla bi dati vrlo zanimljive i važne podatke za sagledavanje njihove taksonomije i ekologije, ali i pomoći pri određivanju stupnja njihove ugroženosti te pridavanju odgovarajuće zaštite.

1.2 Vrste unutar roda *Apodemus* te njihovi srodstveni odnosi

Miševi roda *Apodemus* Kaup, 1829, neki su od najčešćih i najraširenijih vrsta malih sisavaca palearktika (Suzuki i sur., 2008). Na području Europe nalazimo 9 vrsta: žutogrli šumski miš - *Apodemus flavicollis* (Melchior, 1834), šumski miš - *Apodemus sylvaticus* (Linnaeus, 1758), prugasti poljski miš - *Apodemus agrarius* (Pallas, 1771), stepski miš - *Apodemus uralensis* (Pallas, 1811), krški miš - *Apodemus epimelas* (Nehring, 1902), *Apodemus mystacinus* (Danford & Alston, 1877), *Apodemus alpicola* Heinrich, 1952, *Apodemus witherbyi* (Thomas, 1902) te *Apodemus ponticus* Sviridenko, 1936. Od njih 9, u Hrvatskoj obitava prvih pet (Petrov, 1992; Macdonald i Barrett, 1993; www.iucnredlist.org). Možemo ih podijeliti u dva, odnosno tri podroda: *Apodemus*, *Sylvaemus* (Ognev, 1924) te *Karstomys* Martino, 1939 (Slika 1); ovaj zadnji neki autori podržavaju dok neki ne smatraju da je validan (Michaux i sur., 2002). Podrod *Apodemus* uglavnom se odnosi na istočno-azijske vrste (s time da se i ovdje vode polemike oko dodatnih podrodova poput *Alsomys*, *Gurkha*, *Argenteus* i slično) te europsko-azijsku vrstu, *A. agrarius*, disjunktog areala. Ova vrsta nastala je na području Azije, ali se smatra da se za vrijeme kvartarnih ledenih doba proširila u Europu. Zauzima istočni dio Europe

i područje Alpa te ju se vrlo lako raspoznaje od ostalih europskih vrsta. U filogenetskim istraživanjima europskih vrsta roda *Apodemus*, *A. agrarius* čini bazalnu liniju te pokazuje najveću udaljenost od ostalih vrsta (Macdonald i Barrett, 1993; Michaux i sur., 2002; Suzuki i sur., 2008; Bugarski-Stanojević i sur., 2011). U podrod *Karstomys* bi spadale nedavno odvojene vrste *A. mystacinus* i *A. epimelas*. Obje se također morfološki razlikuju od ostalih jer se radi o najvećim vrstama unutar roda *Apodemus*. Karakterizira ih i nešto svjetlije, sivkasto krzno te dugačke vibrise (eng. *vibrissae*) i velike uši (Macdonald i Barrett, 1993). *Apodemus epimelas* nastanjuje područje zapadnog i južnog Balkana, dok *A. mystacinus* možemo pronaći na području Anatolije, sjeverno do Kavkaza te na primorskom dijelu Levanta (www.iucnredlist.org). Podrod *Karstomys*, odnosno vrste *A. mystacinus* i *A. epimelas* na filogenetskim stablima jasno pokazuju svoju blisku srodnost, ali i status kao dvije odvojene vrste (Michaux i sur., 2005b). Evolucijski su bliže podrodu *Sylvaemus* nego podrodu *Apodemus* (Filippucci i sur., 2002; Michaux i sur., 2002; Bugarski-Stanojević i sur., 2011). Podrod *Sylvaemus* uključuje ostale europske vrste. Radi se o dobro podržanoj monofiletičkoj grupi koju karakterizira niska morfološka raznolikost vrsta. Smatra se da je razlog tome brza grmolika (eng. *bush-like*) evolucija iz azijskog pretka, kojom je nastao velik broj vrsta u kratkom roku (Michaux i sur., 2002; Suzuki i sur., 2008; Jojić i sur., 2014; Bartolommei i sur., 2016).



Slika 1. Prikaz filogenetskih odnosa nekih vrsta roda *Apodemus* podjeljenih u podrodove te ostalih članova potporodice Murinae. Stablo je dobiveno metodom najviše vjerojatnosti uz pomoć dva mitohondrijska gena (preuzeto iz: Michaux i sur., 2002).

Specijacija između vrsta *A. sylvaticus* i *A. flavicollis* najvjerojatnije je bila alopatrijska. Dogodila se prije otprilike 4 milijuna godina te su ove dvije vrste većinu tog vremena evoluirale pod sličnim ekološkim pritiscima. Preci šumskog miša bili su izolirani na području Španjolske te u južnom dijelu Francuske, dok su preci žutogrlog šumskog miša zauzimali središnji i jugoistočni dio Europe (Michaux i sur., 2002; Michaux i sur. 2005a; Jojić i sur., 2014). Iako

blisko srodne, a ekologijom i ponašanjem jako slične, ove vrste različito su reagirale na zadnja, kvartarna ledena doba. *Apodemus flavicollis* je refugij pronašao na području Italije i jugoistočne Europe, od kuda se kasnije proširio ostatkom Europe. Rekolonizacija je krenula prije otprilike 10 000 godina. Jedinke ove vrste nisu preživjele do posljednjeg ledenog doba na području zapadne, istočne te sjeverne Europe, a Pirinejski poluotok nisu koristile za refugij (poput njihova srodnika). Pretpostavlja se da je tome razlog fragmentacija šuma za vrijeme zadnjeg ledenog doba na tom području, ali također i oštriji klimatski uvjeti koje *A. flavicollis* teže podnosi. Michaux i sur. (2005a) su potvrdili postojanje tri filogenetske linije ove vrste, odvojene niskim stupnjem nukleotidne divergencije te s geografskim poklapanjima dviju linija (na području jugoistočne Europe). Vrijeme divergencije između tih linija bilo je prije otprilike 0,5 - 0,6 milijuna godina i smatra se da se u tom periodu razvila intraspecifična struktura ove vrste. Filogenetska linija s područja zapadnog palearktika se proširila brzo i eksplozivno, te je rekolonizirala većinu Europe. Što se vrste *A. sylvaticus* tiče, ona je imala čak tri refugija za vrijeme kvartarnih ledenih doba. Glavni refugij ovoj vrsti činilo je područje jugozapadne Europe (Pirinejski poluotok i južna Francuska - područje gdje je i nastala ova vrsta). Odavde se krajem zadnjeg ledenog doba *A. sylvaticus* proširio po većini zapadnog palearktika i pri tome im planinski lanac Pirineja nije činio barijeru. Drugi refugij činilo je područje Italije i jugoistočne Europe, međutim tu je ova grupa za vrijeme zadnjeg ledenog doba doživjela efekt uskog grla (eng. *bottleneck effect*). Jedno od ponuđenih objašnjenja je da je ovo područje kao refugij koristio i *A. flavicollis* koji je dominantniji od *A. sylvaticus*. Zbog tako velikog smanjenja populacije, ova grupa nije bila sposobna proširiti se po Europi na vrijeme (da bi jedinke neke vrste krenule zauzimati prostor moraju prvo imati stabilnu populaciju). Kada su napokon krenuli u rekolonizaciju, naišli su na dva problema: Alpe, koje su ih dodatno usporile te grupu šumskih miševa koja se na zapadni dio Europe proširila s Pirinejskog poluotoka. Poznato je da glodavci znaju bit agresivni prema pridošlicama (pa makar i iste vrste) kada jednom zauzmu neki teritorij. Treći refugij ove vrste je Sicilija. Populacije vrste *A. sylvaticus* podjeljene su u dvije filogenetske linije i to visokim stupnjem nukleotidne divergencije. U ove vrste nema geografskih preklapanja linija. Prva linija zauzima područje od južne Španjolske do Švedske na sjeveru te Ukrajine na istoku, a odnedavno i područje sjeverne Afrike. Kolonizacija Afrike djelomice se odvila preko Gibraltara, a djelomice antropogenim utjecajem. Druga je linija ograničena na područje Italije i jugoistočne Europe. Ovakva „čista“ podjela objašnjava se izolacijom u različite refugije za vrijeme prvog kvartarnog ledenog doba. Ono što je pripomoglo ne miješanju su i već spomenute Alpe koje čine biogeografsku barijeru šumskom mišu. Razdvajanje ovih linija odvijalo se prije otprilike 1,5 - 1,6 milijuna godina. Na području Italije i

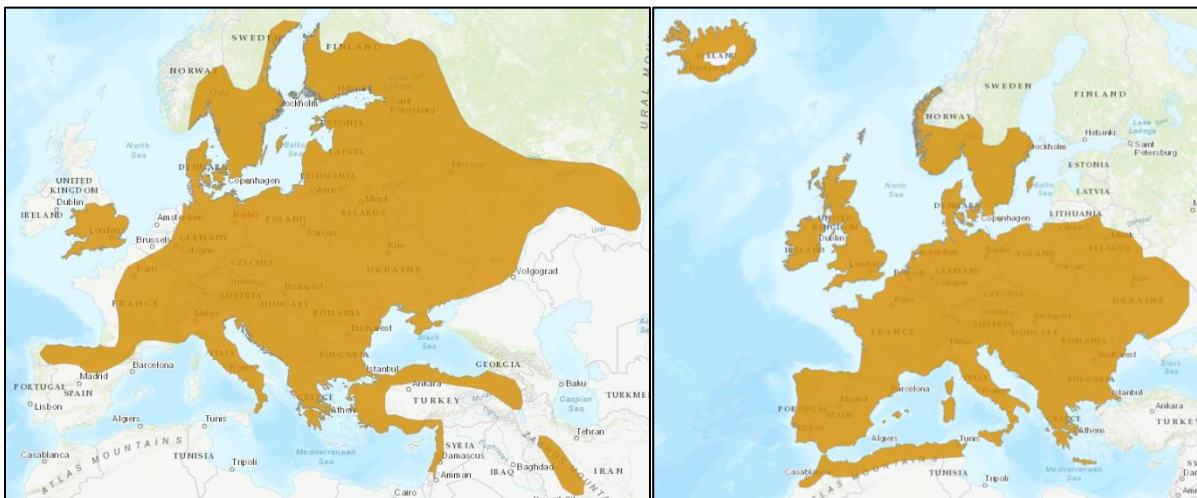
jugoistočne Europe dolazi do miješanja linija pošto je razina Jadranskog mora za vrijeme ledenih doba često puta opadala i time dopuštala prelazak jedinki iz jednog područja u drugo. Prije otprilike 0,8 - 0,9 milijuna godina došlo je do odvajanja grupe miševa sa Sicilije od grupe s područja Italije i jugoistočne Europe. Šira distribucija te veći broj refugija za vrijeme kvartarnih ledenih doba vrste *A. sylvaticus* objašnjava se njegovom većom ekološkom plastičnošću (Michaux i sur., 2005a; Kryštufek i sur., 2012).

Na području Parka prirode Medvednica od morfološki problematičnih vrsta dolaze *A. sylvaticus* i *A. flavicollis* te uz njih i lako prepoznatljiv *A. agrarius* (Petrov, 1992; Macdonald i Barrett, 1993).

1.3 Sličnosti i razlike vrsta *A. flavicollis* i *A. sylvaticus*

Žutogrlji šumski miš i šumski miš osim što zauzimaju najveći dio Europe, zauzimaju gotovo identične areale (Slika 2) (www.iucnredlist.org), s malo širom rasprostranjenošću šumskog miša zahvaljujući njegovoj ekološkoj plastičnosti (Marsh i Harris, 2000; Michaux i sur., 2005a; Jojić i sur., 2014). Obje vrste nalazimo u šumama i šikarama, s time da žutogrlji šumski miš zauzima starije, očuvanije (ali ne i gospodarene) dijelove takvih staništa. Pozitivan utjecaj na njegovu brojnost imaju šume s većom pokrivenošću krošnjama, više drvnih ostataka (otpale grane, srušena debla i slično koji služe kao zaklon, ali i kao potencijalna mjesta za gnijezda) te većim udjelom listopadnih vrsta (Mujezinović i sur., 2013). Same po sebi, starije šume daju bolju pokrivenost krošnjama, a i više plodova, što se pokazalo da odgovara žutogrljom šumskom mišu (Marsh i Harris, 2000). Šumski miš s druge strane ne bira, već zauzima sve vrste šuma i šikara. Osim njih zalazi i u razne tipove obradivih površina, livade, travnjake, vrtove te ga se čak nalazi i na dinamama (Macdonald i Barrett, 1993). Za zaklon koristi nisko raslinje na tlu, te veća pokrivenost staništa takvim zaklonima povećava njegovu brojnost (Marsh i Harris, 2000). Obje vrste su omnivori; njihova prehrana se sastoji od sjemenki, klijanaca, orašastih plodova, pupova i sličnog te u manjoj mjeri od beskralježnjaka i njihovih ličinki. U ovoj situaciji *A. sylvaticus* ponovno pokazuje plastičnost; dok *A. flavicollis* u većoj mjeri preferira herbivorski način prehrane, *A. sylvaticus* se ponaša oportunistički te se hrani onim što mu je na raspolaganju. Tako se primjerice jedinkama koje žive u blizini oranica prehrana sastoji od pšenice, divlje zobi, kukuruza i sličnih, zasađenih vrsta (Macdonald i Barrett, 1993). Sezona parenja obje vrste počinje u kasnom ožujku te traje sve do polovice listopada. U usporedbi s primjerice riđom voluharicom, *Myodes glareolus* (Schreber, 1780),

kojoj sezona parenja počinje u travnju, a završava u rujnu, imaju duži period razmnožavanja. Bergstedt (1965) je dobio rezultat da za vrijeme vrhunca sezone parenja (lipanj, srpanj, kolovoz) obje vrste odlaze u polja hraniti se. U jednoj godini imaju tri do četiri legla s po dva do devet mladunaca po leglu (Macdonald i Barrett, 1993). Sezona parenja *A. flavicollis* ipak počinje nešto ranije (četiri do šest tjedana) nego njegovog srodnika (Montgomery, 1980a). U obje vrste jedinke okoćene početkom sezone parenja postaju spolno zrele te spremne za parenje već tu istu sezonu. U povoljnim uvjetima vrste roda *Apodemus* nastavljaju s hranjenjem i rastom tokom zime (Bergstedt, 1965), s time da *A. sylvaticus* bolje preživljava zimu od *A. flavicollis* (Marsh i Harris, 2000). Izvan sezone parenja *A. sylvaticus* formira jednospolne grupe; slično ponašanje primijećeno i kod *A. flavicollis*, ali manje ekstremno. Za vrijeme parenja i mužjaci i ženke vrste *A. flavicollis* se nalaze na istim teritorijima, dok kod *A. sylvaticus* ženke štite teritorije za razmnožavanje, a mužjaci održavaju vlastite. Smatra se da čak dolazi i do hijerarhijske podjele u populacijama šumskog miša (Montgomery, 1980b; Macdonald i Barrett, 1993).



Slika 2. Karta rasprostranjenosti vrsta *A. flavicollis* (lijevo) i *A. sylvaticus* (desno) (preuzeto s: iucnredlist.org).

Žutogrli šumski miš i šumski miš žive simpatrijski, odnosno, u isto se vrijeme nalaze na istom mjestu (Montgomery, 1980b; Jojić i sur., 2014). Smatra se da ipak postoji prostorna te vremenska segregacija ovih vrsta kako bi takav simpatrijski način života mogao opstati. Žutogrli šumski miš osim što preferira starije šume (Marsh i Harris, 2000; Mujezinović i sur.,

2013), općenito se više nalazi u šumskim staništima što govori da ima užu nišu od šumskog miša. Iako je manje brojan te nije ekološki plastičan kao njegov srodnik, dominantniji je (Montgomery, 1978). Zahvaljujući tome, kada se on i šumski miš nađu na istom lokalitetu, šumskog miša tjera iz arborealnijih mikrostaništa. Dominacija nikad nije u obliku potpunog isključivanja te obje vrste i dalje nalazimo na istom staništu, samo ne unutar tog staništa na istom mikrolokacijama (primjerice, ako se *A. flavicollis* nalazi na nekom području u krošnjama, *A. sylvaticus* će se zadržavati samo po tlu). Ovo je također i primjer prostorne segregacije koja omogućava njihovu koegzistenciju. Primjer vremenske segregacije vidimo u većoj aktivnosti vrste *A. flavicollis*. U nekoliko istraživanja (Bergstedt, 1965; Hoffmeyer, 1973; Montgomery, 1980b) dobiven je rezultat da *A. sylvaticus* izbjegava *A. flavicollis*, te se više skriva dok je drugi aktivan. Tu naravno treba uzeti u obzir utjecaj laboratorijskih uvjeta koji inicijalno povećavaju opreznost testiranih jedinki. Macdonald i Barrett (1993) navode da je *A. flavicollis* isključivo aktivan po noći, dok je *A. sylvaticus* uz noćnu aktivnost aktivan i par sati prije sumraka te par sati poslije zore, odnosno u vrijeme kada je aktivnost njegova srodnika manja. Do vremenske segregacije dolazi i u vrijeme razmnožavanja pošto se *A. flavicollis* kreće razmnožavati ranije od *A. sylvaticus*. Jedno se vrijeme smatralo da se *A. sylvaticus* odlazi razmnožavati na travnjačka staništa ili na obradive površine. Kada uvjeti dopuštaju on to i radi, međutim, takvo ponašanje nije nužno za njihov suživot. U velikim brojevima se preklapaju samo tokom jeseni, kada hrane ima najviše, kada se agresivnost smanjuje te kada stupnjevito kreće razmnožavanje, što je također vrlo bitan čimbenik simpatrijskog načina života. Iako postoji puno sličnosti i preklapanja među ovim vrstama, one nisu dovoljne da dođe do kompeticije koja bi završila isključivanjem jedne od njih, već je njihov suživot omogućen zahvaljujući manjim interspecijskim razlikama (koje se poklapaju s istraživanjima alopatrijskih populacija ovih vrsta) (Montgomery, 1980a; Montgomery, 1980b).

Morfološki ove dvije vrste vrlo su slične, čime je otežana njihova determinacija (Slika 3). Radi se o malim glodavcima, dužine tijela između 90 i 120 mm. Rep je u vrste *A. sylvaticus* dug između 70 i 115 mm, a kod *A. flavicollis* 70 do 85 mm. Imaju velike gole uši. Na prednjim udovima imaju četiri, a na stražnjim po pet prstiju. Krzno im je s gornje strane žućkasto do tamnosmeđe, a s donje sivo-bijelo. U *A. sylvaticus* bi trebalo biti tamnije, prijelaz prema trbuhu manje oštar te krzno trbuha sivo-bijelo. Krzno u *A. flavicollis* trebalo bi biti jarkijih boja te s oštrijim prijelazom na krzno trbuha koje je često više bijelo nego sivo. To međutim nije uvijek tako jer je moguće pronaći obrnute situacije (primjerice, *A. sylvaticus* jarko obojanog krzna s oštrim prijelazom između leđa i trbuha). Dakle boja krzna pokazuje varijabilnost te se smatra

da ovisi o geografskom položaju. U obje vrste se pojavljuje žuta mrlja/ogrlica na području prsa i ramena. U *A. flavicollis* je ona veća i često puta se spaja s leđnim, smeđim dijelom krzna, dok je kod *A. sylvaticus* manja ili je uopće nema, a kad je ima ide u dužinu umjesto u širinu (Slika 5). Međutim, i veličina te ogrlice varira pa tako na sjevernom dijelu Europe postoji jasna razlika između vrsta, dok kako se spuštamo južnije ta ogrlica u obje vrste postaje manja i sve je teže raspoznati radi li se o *A. sylvaticus* koji ima mrlju veličine koje bi trebala biti ili pak *A. flavicollis*, koji ima manju mrlju nego jedinke iste vrste sa sjevera. Isto se događa s nekoliko eksternih mjera; na sjeveru su jedinke vrste *A. flavicollis* veće (teže i duže) te imaju duži rep, međutim na jugu dolazi do obrnute situacije (Tvrtković, 1979; Macdonald i Barrett, 1993; Popov, 1993; Jojić i sur., 2014).



Slika 3. S obzirom da su vanjskom morfologijom vrlo slične, ne možemo odrediti radi li se o šumskom ili žutogrlom šumskom mišu. Ipak, slika prikazuje njihov karakterističan izgled: velike gole uši te žučkasto do tamnosmeđe leđno krzno koje prelazi u trbušno sivo-bijelo (preuzeto s: eunis.eea.europa.eu).

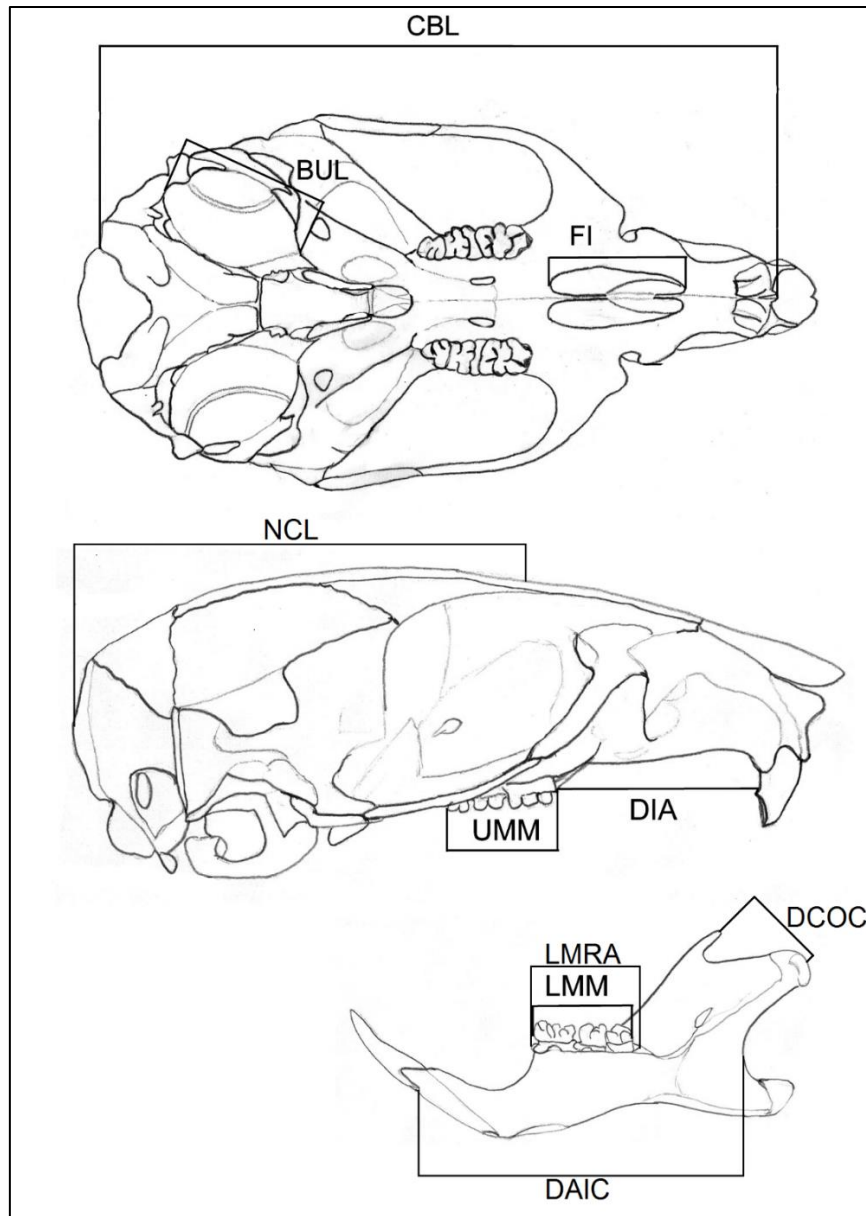
Zbog svih sličnosti koje ove vrste pokazuju, njihov status kao odvojene vrste često je bio propitkivan. Ipak, brojnim se neuspješnim križanjima (eng. *interbreeding*) pokazalo da se radi o odvojenim vrstama (Hirning i sur., 1989). I kariotipski su ove vrste jako slične: obje

imaju po 48 akrocentričnih kromosoma te kod G-pruganja (eng. *G-banding*) pokazuju slične obrasce. Međutim, prilikom postupka C-pruganja (eng. *C-banding*) mogu se primijetiti neke razlike u distribuciji heterokromatina. I u *A. sylvaticus* i u *A. flavicollis*, na svim kromosomima nalazimo centromerne pruge, ali kod vrste *A. sylvaticus* na nekoliko pari autosomalnih kromosoma postoje dodatna pruganja u blizini telomera. Ona pokazuju sličnosti s centromernim pruganjima te se smatra da su nastala transpozicijom i amplifikacijom centromernih dijelova nakon što su se ove dvije vrste odvojile (Hirning i sur., 1989; Jojić i sur., 2014).

1.4 Metode i problemi prilikom determinacije *A. sylvaticus* i *A. flavicollis*

Još su 1984. Demeter i Lázár otkrili skup mjera dovoljnih za razlikovanje (s 95 %-tnom točnošću) vrsta *A. flavicollis*, *A. sylvaticus* i *A. uralensis* (tada *A. microps*) (s područja Mađarske). Radi se o tri mjere donje čeljusti: udaljenost između alveole sjekutića i kondilarnog nastavka (DAIC), dužina donjeg reda kutnjaka na alveolama (LMRA) te udaljenost između koronoidnog i kondilarnog nastavka (DCOC) (Slika 4). Reutter i sur. (1999) linearnom kombinacijom šest mjera lubanje: kondilobazalna dužina (CBL), dužina *bulla tympanica* (BUL), dužina dijasteme (DIA), dužina *foramina incisiva* (FI), dužina neurokranija (eng. *neurocranium, braincase*) (NCL) i dužina gornjeg reda kutnjaka (UMM) (Slika 4), su pokazali mogućnost razlikovanja između vrsta *A. flavicollis*, *A. sylvaticus* i *A. alpicola* (jedinke s područja Švicarske, Austrije, Italije, Francuske i Njemačke). Barčiová i Macholán (2009) su napravili dihotomski ključ (98.3 % točnosti) za raspoznavanje vrsta *A. flavicollis* i *A. sylvaticus* (s područja Češke) na temelju tri mjere lubanje: dužina donjeg reda zubi, odnosno kutnjaka (LMM), kondilobazalna dužina (CBL) i dužina *bulla tympanica* (BUL) (Slika 4). Bartolommei i sur. (2016) su koristili dužinu stražnjeg stopala te težinu jedinki po sezonama za razlikovanje vrsta *A. flavicollis* i *A. sylvaticus* (na području Italije). Radili su sa živim i budnim jedinkama te dobili uspješnost od 80 % za identifikaciju *A. flavicollis* te 78 % za *A. sylvaticus*. Što se tiče područja Hrvatske, morfometrijska istraživanja ovih malih sisavaca su rijetka i uglavnom rađena u prošlom stoljeću. Tvrtković (1979) je na jedinkama s područja tadašnje Jugoslavije (ali i s ostalih područja u Europi) uspio razlikovati vrste *A. sylvaticus*, *A. flavicollis* te *A. uralensis* (*A. microps*) u 90 % slučajeva koristeći se relativnom dužinom *foramina incisiva* (FI) (Slika 4), a testirao ju je i na juvenilnim i na adultnim jedinkama. Također je pokazao klinalnu varijabilnost morfoloških značajki vrsta roda *Apodemus*; u ovom slučaju relativne dužine

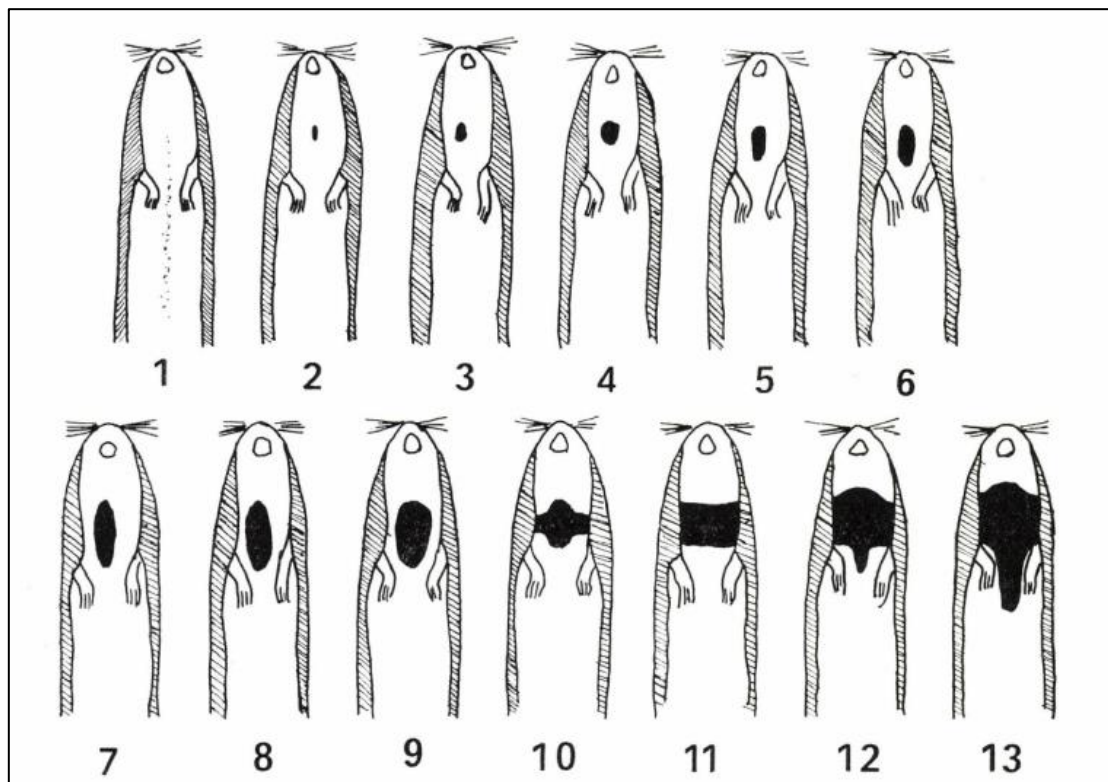
foramina incisiva, koja je u sjeverozapadnih vrsta manja te s iznimkom vrsta koje žive na visokim planinama, raste prema jugoistoku.



Slika 4. Najčešće korištene mjere prilikom morfometrijskih istraživanja vrsta roda *Apodemus*.

BUL – dužina *bulla tympanica*-e, CBL – kondilobazalna dužina, DAIC – udaljenost između alveole sjekutića i kondilarnog nastavka, DCOC – udaljenost između koronoidnog i kondilarnog nastavka, DIA – dužina dijasteme, FI – dužina *foramina incisiva*, LMM – dužina donjeg reda zubi (odnosno kutnjaka), LMRA – dužina donjeg reda kutnjaka na alveolama, NCL – dužina neurokranija, UMM – dužina gornjeg reda kutnjaka (preuzeto i doručeno iz: Barčiova i Macholán, 2009)

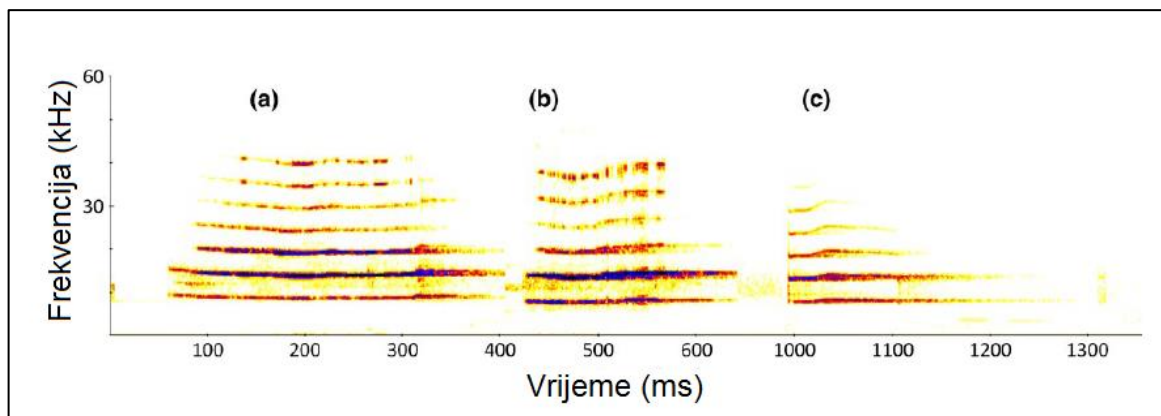
Nekoliko autora navodi da je determinacija moguća uz pomoć vanjskog izgleda ovih miševa (boja krzna, oznake na tijelu, mjere tijela). Međutim zbog postojanja klinalne varijabilnosti, mnogo takvih fenotipskih značajki varira od mjesta do mjesta, u ovom slučaju od sjevera prema jugu. Pa je tako na sjeveru moguće razlikovati jedinke ovih dviju vrsta po tome što su jedinke vrste *A. flavicollis* teže i duže, imaju duži rep, a također im je i ogrlica veća te se često puta spaja s leđnim, smeđim dijelom krzna (Slika 5). Sjevernije se razlikuju i po boji krzna te oštini prijelaza između leđa i trbuha. Kako se ide prema jugu te razlike postaju suptilnije s obzirom da počinju varirati unutar samih vrsta i iako i dalje postoje jedinke koje su očito *A. flavicollis* (primjerice zbog potpune ogrlice) one su rjeđe te je puno više jedinki u neodređenom području preklapanja vanjskih značajki (Tvrtković, 1979; Macdonald i Barrett, 1993; Popov, 1993; Jojić i sur., 2014). Također, samo po sebi razlikovanje na temelju boje krzna ili veličine ogrlice je vrlo subjektivna metoda i kao takva nije uvijek pouzdana.



Slika 5. Varijabilnost žute ogrlice/mrlje koja se pojavljuje kod jedinki vrsta *A. sylvaticus* i *A. flavicollis*. Po literaturi, jedina sigurna determinacija vrsta po ogrlici bi bila svrstati skice 10 - 13 kao *A. flavicollis* zbog prisutnosti potpune ogrlice, odnosno ogrlice koja se spaja s leđnim krznom (preuzeto iz: Demeter i Lázár, 1984).

Od molekularno genskih metoda razlikovanja, uspješnima se pokazao velik broj njih: elektroforeza alozimskih markera (laktat dehidrogenaza 1, izocitrat dehidrogenaza 1, superoksid dismutaza 1, nukleozidna fosforilaza) (Barčiová i Macholán, 2009), elektroforeza esteraza (eng. *esterase enzyme systems*) (Çolak i sur., 2005), ISSR-PCR metoda (Bugarski-Stanojević i sur., 2011; Jojić i sur., 2014), sekvenciranje određenih dijelova DNA (mitohondrijski citokrom *b* gen, D-petlja ili nuklearni IRBP gen) dobivenih lančanom reakcijom polimerazom uz pomoć početnica specifičnih za određene vrste (eng. *species-specific primers*) (Serizawa i sur., 2000; Michaux i sur., 2001, 2005b), te mnoge druge. Osim za determinaciju kriptičnih vrsta, ove metode omogućuju dobivanje podataka o srodstvenim odnosima vrsta te njihovoj genskoj raznolikosti i evolucijskoj povijesti, što je vrlo korisno i prilikom osmišljavanja modernih konzervacijskih planova.

Kariotipski se miševi mogu raspoznati uz pomoć postupka Q/C-pruganja (eng. *Q/C-banding*) (Hirning i sur., 1989; Jojić i sur., 2014), a zanimljiva i slabo proučena metoda je metoda razlikovanja uz pomoć „poziva u pomoć“ (eng. *distress calls*). S obzirom da se miševi glasaju prilikom rukovanja njima radi se o neinvazivnoj metodi (Slika 6). Ancillotto i sur. (2016) su na taj način probali razlikovati vrste *A. flavicollis*, *A. sylvaticus* i *A. alpicola* (na području Italije). Dobili su dobru razliku između *A. flavicollis* i *A. sylvaticus* (98 %), a za sve tri vrste uspješnost prepoznavanja iznosi 86 %.



Slika 6. Spektrogrami „poziva u pomoć“ vrsta *A. sylvaticus* (a), *A. flavicollis* (b) i *A. alpicola* (c) (preuzeto i doručeno iz: Ancillotto i sur., 2016).

Sve navedene pouzdane metode često zahtijevaju i puno vremena i puno opreme koju ne možemo imati sa sobom na terenu, pa stoga ni samu determinaciju ne možemo provesti na terenu. U slučaju preliminarnih istraživanja u kojima se primjerice odabire područje za glavno istraživanje, determinacija u laboratoriju je ponekad gubljenje vremena. Iz tog razloga morfometrija nudi jednostavnu i lako izvedivu metodu. Potrebno je samo imati pomičnu mjerku te ključ za raspoznavanje. S obzirom da jedinke roda *Apodemus* podliježu klinalnoj varijabilnosti te njihove vanjske mjere tijela variraju od mjesta do mjesta, korisno je morfometrijski opisati vrste na više različitih područja u nadi pronalaska pouzdanih razlika između vrsta.

1.5 Molekularna filogenija i upotreba genskih markera

Molekularna filogenija ili filogenetika grana je biologije koja daje uvid u evolucijsku povijest organizama. Uz pomoć struktura molekula, kao što su DNA ili proteini, rekonstruira i opisuje srodstvene odnose vrsta i viših taksonomskih razina. Ovisno o kojoj taksonomskoj razini se radi, ne koriste se isti dijelovi DNA za filogenetiku. Dijelovi koji sporije nakupljaju mutacije bit će pogodni za filogenetiku viših taksonomskih razina, dok će dijelovi koji brže nakupljaju mutacije biti pogodni za niže taksonomske razine. Mitohondrijska DNA je primjer molekule koja brzo nakuplja mutacije, a uz to je u stanici ima u velikom broju primjeraka pa se geni na njoj (primjerice gen za citokrom *b* ili *COI*) često koriste za filogenetiku životinja, posebice na nižim taksonomskim razinama. Kao rezultat filogenetike dobivamo filogenetska stabla – grafičke prikaze srodstvenih odnosa taksona koje istražujemo. Određeni tipovi stabala mogu pokazivati i relativnu evolucijsku udaljenost taksona jednih od drugih; takva stabla nazivaju se filogrami. Neke od najčešćih metoda izrade filogenetskih stabala su metoda susjednog sparivanja, najveće parsimonije, najveće vjerojatnosti te Bayesova metoda. Svaka od njih na drugačiji način tretira dani set podataka i tako dolazi do najboljeg stabla. Pouzdanost stabala (pojedinih grananja u stablima) dodatno se potvrđuje metodom samopodržanja, odnosno *bootstrap* metodom (Stearns i Hoekstra, 2005; Cox i sur., 2016).

Molekularne metode uvelike su unaprijedile istraživanja srodstvenih odnosa svih živih bića, jer su omogućile usporedbu puno većeg broja svojstava (svaka pozicija u DNA se smatra jednim svojstvom) te su tu usporedbu učinile pouzdanijom. Bacile su novo svjetlo na evolucijsko stablo cijelokupnog živog svijeta i promijenile velik broj taksonomskih položaja, a

i ukazale na to da morfološka svojstva nisu uvijek točan pokazatelj srodnosti ili pripadnosti nekoj višoj taksonomskoj skupini.

1.6 *Apodemus agrarius* kao treći stanovnik Parka prirode Medvednica

Treća vrsta roda *Apodemus* koju možemo pronaći na području Parka prirode Medvednica je prugasti poljski miš (Petrov, 1992). Uglavnom je vezan uz vlažna i livadna staništa te riječne doline. Također nastanjuje šume i šikare, a prisutan je i u urbaniziranim područjima. Pogoduje mu nisko raslinje koje koristi kao zaklon. Po prehrani je omnivor; hrani se raznim sjemenkama, orašastim plodovima i voćem te korijenjem i pupovima, ali i kukcima te njihovim ličinkama. Kao i *A. sylvaticus*, *A. agrarius* je oportunist te je vrlo ekološki plastičan, na što nam ukazuje njegova pristunost u ruralnim i urbanim staništima, ali i činjenica da kad se tamo nađe mijenja prehranu iz primarno granivorne (hranjenje sjemenkama) u primarno insektivornu (Andrzejewski i sur., 1978; Macdonald i Barrett, 1993; iucnredlist.org). Period razmnožavanja u mužjaka ove vrste počinje ranije nego u ženki. Kreću se razmnožavati u kasnoj veljači ili ranom ožujku i razmnožavaju se sve do listopada, s vrhuncem sezone u kolovozu i rujnu. U ženki razmnožavanje traje od sredine ožujka do kasnog listopada (Yoon i sur., 1997). Imaju oko pet mladunaca po leglu. Za razliku od ostalih vrsta roda *Apodemus*, *A. agrarius* je manje građe, ima manje uši, kraći rep te relativno kratke vibrise. Dužina tijela mu varira od 73 do 123 mm, a repa od 70 do 85 mm (rep je kraći od dužine tijela). Krzno mu je s dorzalne strane žuto-smeđe boje, a s ventralne sivkasto-bijelo. Lako ga se prepoznaje zahvaljujući tamnoj pruzi koja mu se pruža sredinom leđa, od potiljka do repa (Slika 7) (Macdonald i Barrett, 1993).



Slika 7. Lako prepoznatljiv prugasti poljski miš; ulovljen klopkom preklapačom, ali ne i usmrćen (fotografirala: Tea Hutten).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je morfološki te genski opisati vrste roda *Apodemus* (točnije *A. flavicollis*, *A. sylvaticus* i *A. agrarius*) s područja Parka prirode Medvednica. Plan je dobiti uvid u srodstvene odnose vrsta te njihovu gensku, ali i morfološku raznolikost. Tim podacima ćemo svakako proširiti saznanja o hrvatskim populacijama malih sisavaca – što je područje koje je slabo istraživano kod nas.

Također, cilj je usporediti morfometrijske značajke vrsta roda *Apodemus* koje obitavaju na Medvednici, odnosno pokušati pronaći metodu za raspoznavanje i determinaciju vrsta *A. flavicollis* i *A. sylvaticus* na temelju vanjskih mjera tijela. Ako ispadne uspješno, ovo istraživanje bi dalo opciju neinvazivnog načina determinacije na samom terenu (ako ništa drugo, barem za područje Hrvatske).

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Područje istraživanja

Svoj status Parka prirode, Medvednica je dobila 1981. godine, prvenstveno radi njenih šuma, ali također i zbog njezine velike važnosti za Zagreb kako s ekološkog, tako i s turističkog stajališta. Još se 1963. godine najljepšim i najočuvanijim šumama (njih čak 8) dodijelio status prirodnog rezervata šumske vegetacije te se njima više nije smjelo gospodariti. Uz to, proglašena su dva značajna krajobraza, četiri spomenika prirode te dva spomenika parkovne arhitekture. Samo područje Medvednice je osim na nacionalnoj, zaštićeno i na razini Europske unije, kao dio Natura 2000 ekološke mreže (bioportal.hr/gis).

Medvednica je planinski masiv u širem prostoru savske nizine. Njen najviši vrh je Sljeme, na 1035 metara nadmorske visine. Prisutne su dvije krajobrazne cjeline: šumski kompleks (s malim udjelom livadnih površina) te pristupno područje s naseljima i okolnim otvorenijim prostorima. Geološki je Medvednica vrlo kompleksno građena. Prisutna su sva tri tipa stijena (magnetske, metamorfne i sedimentne), a raspon starosti obuhvaća stijene od paleozoika pa sve do kvartara. Također je poznata i prisutnost ruda. Na Medvednici se nalazi 75 potoka te preko 230 izvora. Na vapnenačkim i dolomitnim stijenama dolazi do oblikovanja specifičnih krških oblika zbog propusnosti vode (kao što je na primjer šire područje Ponikvi). Prevladava takozvana „klima bukve“ (umjereno topla vlažna klima s toplim ljetima), za koju su karakteristična izražena godišnja doba pa tako šume Medvednice svako doba izgledaju drugačije. Klimatološki se ponaša kao „otok“ te broji više oborina, niže temperature, dulje trajanje i količinu snježnog pokrivača, ali također i oko 100 sunčanih sati više u usporedbi s okolnim nizinama. Kaže se da „čuva leđa“ glavnom gradu jer se na njoj lome hladni snažni vjetrovi sa sjevera (Farkaš-Topolnik i sur., 2015; www.pp-medvednica.hr).

Na području Parka prirode identificirano je 27 stanišnih tipova na III. razini Nacionalne klasifikacije staništa (od čega je 9 ugroženo). Najrasprostranjenije su šume bukve s velikom mrtvom koprivom (36 % površine parka), šume hrasta kitnjaka i običnog graba (28 %) te panonska bukovo – jelova šuma (16 %). Posebnu kategoriju čine podzemna staništa kao važna staništa za šišmiše, ali i mnoge beskralježnjake. Travnjaci su još jedna kategorija bitnih staništa rijetkih i ugroženih vrsta, ali su i kao samo stanište ugroženi. Već ovako zauzimaju malen dio Parka prirode, a radi napuštanja tradicionalnog načina iskorištavanja prostora (košnja i ispaša) prijeto im dodatno gubitak površine zbog sukcesije. Zbog toga se najveće livade, koje imaju

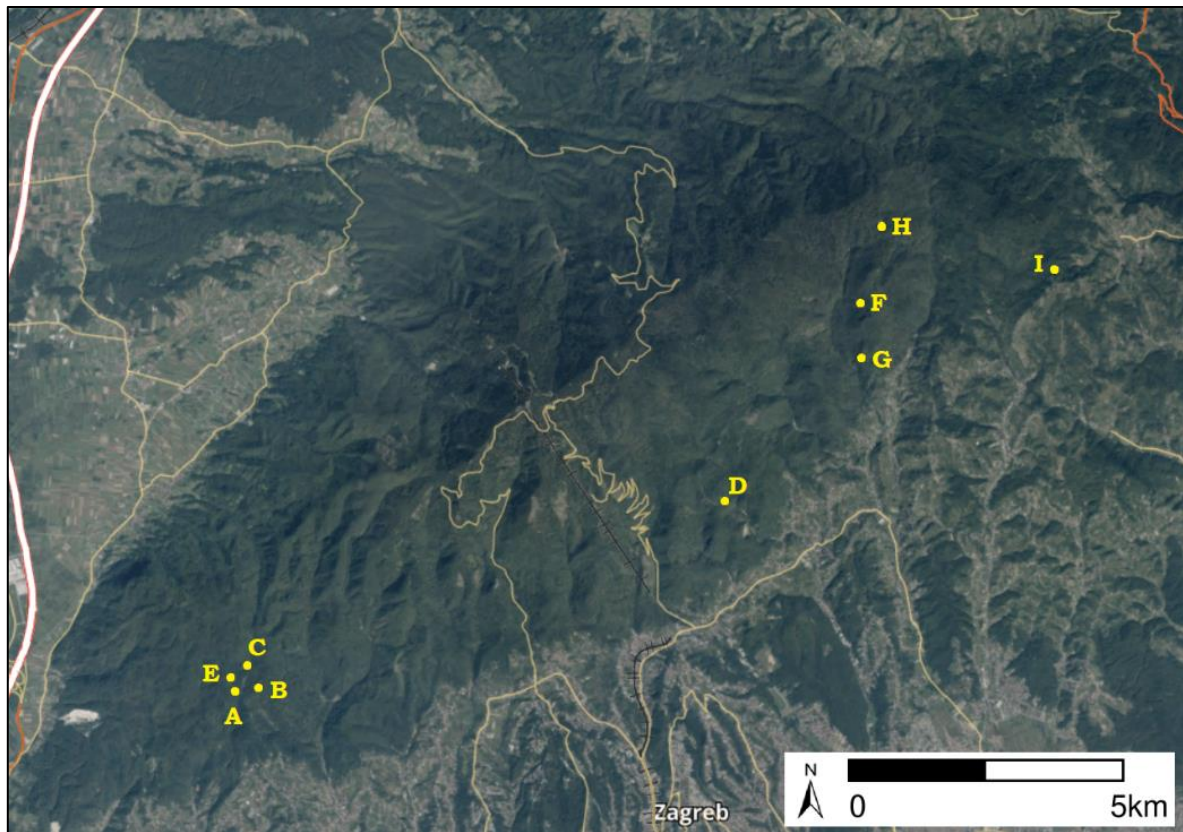
visoku vrijednost bioraznolikosti i služe u istraživačke svrhe, i dalje održavaju ispašom te su ograđene od ljudi i ne gnoje se (Farkaš-Topolnik i sur., 2015; www.pp-medvednica.hr). Park prirode Medvednica odabrala sam za provedbu svog istraživanja radi blizine s gradom Zagrebom te radi slabe istraženosti malih sisavaca na tom području.

3.2 Prikupljanje podataka

Terenski dio istraživanja sam provela uz pomoć kolegice Tee Hutten. Na zagrebačkoj strani Medvednice, unutar granica samog Parka prirode, odredile smo četiri šire lokacije za postavljanje transekata; jednu na zapadnoj strani (Ponikve) te tri na istočnoj (Mrzljak, put prema planinarskom domu Gorščica te put prema planinarskom domu Lipa) (Slika 8). Ono što nam je bilo bitno prilikom odabira lokacija jest njihova pristupačnost autom. Te smo lokacije zatim podijelile na još 9 mikrolokacija (tri livade, dvije listopadne šume, tri listopadne šume uz potoke te jednu šumu zasađene crnogorice). Popis odabranih lokacija i kratak opis mikrolokacija nalazi se u Tablici 1, a neke od njih su prikazane i na Slici 9. Radi loših rezultata (lokacije B i D) te velike prisutnosti domaćih mačaka (lokacija H) neke smo lokacije posjetile samo jednom ili dva puta te ih više nismo posjećivale. Ukupno smo obavile 32 terenska izlaska u razdoblju od srpnja 2020. do srpnja 2021. godine.

Tablica 1. Popis odabranih lokacija i kratak opis mikrolokacija.

| KOD LOKACIJE | LOKACIJA | OPIS LOKACIJE | BROJ TRENSKIH IZLAZAKA |
|--------------|--------------------------|--|------------------------|
| A | Ponikve | šuma uz potok Jezeranec | 5 |
| B | | bukova šuma istočno uz livadu | 2 |
| C | | šuma bukve i johe uz povremene potočiće | 5 |
| D | Mrzljak | kameni put uz potok | 1 |
| E | Ponikve | manja livada zapadno od glavne livade Ponikve; povremeno poplavljena; rub šume | 5 |
| F | Pečovje | nasadi crnogorice, tamna šuma | 4 |
| G | | bjelogorična bukova šuma | 4 |
| H | Planinarski dom Gorščica | košena livada ispred planinarskog doma; rub šume | 1 |
| I | Livada Hukmani | livada košanica na sjecištu nekoliko planinarskih staza; rub šume | 5 |



Slika 8. Prikaz lokacija na kojima su postavljani transekti. Točke A, B, C i E predstavljaju mikrolokacije na Ponikvama, točka D Mrzljak, točke F i G su šume na uzvisini Pečovje, točka H livada ispred planinarskog doma Gorščica, a točka I predstavlja livadu Hukmani (preuzeto i doručeno s: geoportal.dgu.hr).



Slika 9. Tipovi staništa na kojima smo postavljale transekte: listopadna šuma kroz koju prolaze potoci (gore lijevo), livada koja graniči sa šumom (gore desno), listopadna šuma s nasadima crnogorice (dolje lijevo) i listopadna šuma (dolje desno) (fotografirala: Dora Čuljak).

Materijal smo prikupljale klopama preklapačama, tzv. mrtvolovkama. Za mamac smo koristile mješavinu konzervirane ribe, maslaca od kikirikija te zobnih pahuljica. S obzirom na veliku posjećenost Ponikvi, transekti na tim mikrolokacijama su bili kraći i sastojali su se od samo 50 zamki po transektu, dok smo na ostalim lokacijama postavljale 100 zamki. Teren je na lokaciji D (Mrzljak) bio nepristupačan pa smo probno postavile samo 50 zamki. Na lokacijama koje uključuju livade (E, H i I) transekt je pratio rub livade sa šumom i u sva tri slučaja je zakretao, dok su transekti u šumama bili linijski koliko je reljef dopuštao. Svaki transekt je počinjao i završavao s po tri klopke na udaljenosti otprilike 0,5 metara jedne od druge, postavljene u trokut, dok su sve postaje između imale po dvije klopke postavljene na udaljenosti otprilike 0,5 metra, svaka s jedne strane linije kretanja. Tako je transekt od 50 zamki imao ukupno 24 postaje, a transekt od 100 zamki 49 postaja. Udaljenost između postaja bila je jednaka dužini 5 većih koraka, koje je uvijek brojala ista osoba prilikom jednog transekta.

Transekt smo postavljale navečer pred zalazak sunca, te smo isti skupljale iduće jutro nakon zore. Uz same klopke, postavljale smo i lovne posude gdje je to bilo moguće. Kao lovne posude smo koristile plastične čaše volumena 0,5 litara, a punile smo ih razrijeđenom rashladnom tekućinom za aute, do njihove trećine. S obzirom da smo lovnih posuda postavljale manje nego li je postaja u transektu, postavljane su na otprilike svaku drugu (u transektu s 50 zamki), odnosno svaku četvrtu (u transektu sa 100 zamki) postaju. U Tablici 2 je naveden broj postavljenih zamki te lovnih posuda, kao i ukupni lovni napor (zbroj postavljenih zamki i lovnih posuda) svake lokacije.

Tablica 2. Ukupan broj postavljenih mrtvolovki i lovnih posuda po lokacijama te sveukupan broj postavljenih zamki i lovnih posuda.

| LOKACIJA | MIKROLOKACIJA | POSTAVLJENO MRTVOLOVKI | POSTAVLJENO LOVNIH POSUDA | LOVNI NAPOR |
|--------------------------|---------------|------------------------|---------------------------|-------------|
| Ponikve | A | 300 | 41 | 341 |
| | B | 100 | 11 | 111 |
| | C | 250 | 22 | 272 |
| Mrzljak | D | 50 | 0 | 50 |
| Ponikve | E | 250 | 42 | 292 |
| Pečovje | F | 400 | 44 | 444 |
| | G | 400 | 32 | 432 |
| Planinarski dom Gorščica | H | 100 | 11 | 111 |
| Livada Hukmani | I | 392 | 35 | 427 |
| UKUPNO | | 2192 | 238 | 2430 |

3.3 Materijali i njihova obrada

Prikupljeno je ukupno 59 jedinki roda *Apodemus* (koje nismo mogle determinirati na osnovu morfologije), od čega su tri bile žive te su puštene bez uzetog uzorka i mjera. Također, dvije jedinke vrste *A. agrarius* (od čega jedna živa), 29 jedinki vrste *M. glareolus* (od čega živih jedna), dvije jedinke vrste *Crocidura leucodon* (Hermann, 1780), jedna jedinka vrste *Sorex araneus* Linnaeus, 1758 i jedna jedinka vrste *Crocidura suaveolens* (Pallas, 1811).

Prikupljenom (neživom) materijalu smo uzele vanjske mjere tijela (Tablica 3) i uzorak uške te smo ih konzervirale u 96 %-tnom etilnom alkoholu. Uzorci uški su također konzervirani

u 96 %-tnom etilnom alkoholu. Jedinkama kojima su nedostajali dijelovi tijela izmjereni su samo mjerljivi parametri. Sav prikupljen materijal smo determinirale uz pomoć Macdonald i Barrett, 1993 te smo im odredile spol i dodale etiketu s kodom koji ih veže uz lokaciju na kojoj su ulovljeni. Tablica svih ulovljenih jedinki roda *Apodemus* kojima je uzet uzorak, s odgovarajućim kodovima i mjerama, nalazi se u poglavlju Prilozi (Prilog 1). Mjerama smo dale engleske kratice koje su ustaljene u morfometrijskim radovima radi jednostavnosti usporedbe naših podataka s tuđima. Sve sakupljene jedinke čuvaju se u Zbirci Zoologijskog zavoda Biološkog odsjeka u Zagrebu.

Tablica 3. Popis uzimanih mjera i njihov opis.

| KRATICA MJERE | OPIS MJERE |
|---------------|---|
| BL | <i>body length</i> - dužina tijela |
| TL | <i>tail length</i> - dužina repa |
| HL | <i>head length</i> - dužina glave |
| EL | <i>ear length</i> - dužina uške |
| EW | <i>ear width</i> - širina uške |
| HFL | <i>hind foot length</i> - dužina stražnjeg stopala |
| VL | <i>vibrissae length</i> - dužina najduže vibrise (osjetilnih dlaka) |

Laboratorijski dio istraživanja i sve analize koje su uslijedile sam odradila sama. Izolaciju DNA iz uzoraka uški napravila sam uz pomoć kompleta kemikalija *Dneasy Blood & Tissue* tvrtke QIAGEN po protokolu dobivenom u kompletu. Uzorke sam izrezala na komadiće veličine otprilike 0,5 cm te sam ih stavila u nove Eppendorf epruvete koje sam označila odgovarajućim kodovima. Prilikom rukovanja s uzorcima pazila sam da ne dođe do međusobne kontaminacije tako što sam sav pribor između različitih uzoraka sterilizirala 96 %-tnim etilnim alkoholom. U svaku Eppendorf epruvetu sam dodala 180 μ L pufera ATL za razaranje staničnih membrana te 20 μ L proteinaze K za razaranje staničnih proteina. Zatim sam ih dobro promiješala uz pomoć vrtložne mješalice otprilike 10 sekundi i ostavila preko noći u vodenoj kupelji na 56°C. Nakon 24 sata uzorke sam ponovno promiješala uz pomoć vrtložne mješalice 10-tak sekundi. U Eppendorf epruvete sam dodala 200 μ L pufera AL te 200 μ L etanola, a nakon

svakog dodavanja sam uzorke miješala po 10 sekundi na vrtložnoj mješalici. Zatim sam ispipetirala oko 650 μL izolata u nove Eppendorf epruvete s membranom (koje sam označila odgovarajućim brojevima koji su bili na prijašnjim epruvetama) pazeći da ne pokupim komadiće tkiva koji su zaostali na dnu. Uzorke sam dalje centrifugirala jednu minutu na 8000 rpm (okretaja po minuti). Zatim sam isprala DNA izolat od preostalih onečišćenja uz pomoć pufera AW1 i AW2 (500 μL svakog). Nakon svakog dodavanja pufera uzorke sam stavila na centrifugu, prvi put na jednu minutu i 8000 rpm, a drugi put na 3 minute i 14 000 rpm. Nakon svake centrifuge donji dio epruvete sam bacila i stavila nove zaobljene epruvete (DNA se zadržavala na membrani). Prije zadnjeg koraka sam umjesto zaobljene epruvete, membrane stavljala u normalne Eppendorf epruvete (koje sam označila odgovarajućim kodovima). U uzorke sam dodala 150 μL pufera AE koji eluira DNA s membrane, ali i omogućuje skladištenje izolata do daljnjeg korištenja. Uzorke sam još jednom stavila jednu minutu na 8000 rpm i ovaj put bacila membranu, a Eppendorf epruvete s uzorcima sam stavila u zamrzivač na -20°C .

Dobivene izolate DNA sam pripremila za umnažanje lančanom reakcijom polimerazom (eng. *polymerase chain reaction*, PCR) na sljedeći način: u manje epruvetice za PCR uređaj sam ispipetirala 12,5 μL mješavine tvari koja se dobije od proizvođača (eng. *master mix*), 8,5 μL mješavine dviju početnica (čini ju 2 μL svake početnice te 4,5 μL vode) i 4 μL izolata DNA. S obzirom da mi je cilj umnožiti dio DNA koji kodira za citokrom *b* koristila sam se početnicama specifičnim za to; početnice naziva L14724a (5'-CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG-3') i H15915a (5'-AACTGCAGTCATCTCCGGTTTACAAGAC-3') naručene od tvrtke MacroGen Europe. Na koncu je u svakoj epruvetici za PCR bilo 25 μL volumena. Uzorke sam nakon toga stavila u uređaj za PCR na sljedeći program: radi aktivacije polimeraze uzorci su prvo išli na 95°C dvije minute, zatim su uslijedila 33 ciklusa ponavljanja (20 sekundi na 94°C , 30 sekundi na 50°C , jedna minuta i 30 sekundi na 68°C) te završna ekstenzija na 68°C u trajanju od 10 minuta. Uspješnost PCR-a sam provjerila elektroforezom na agaroznom gelu obojanom *SYBR Safe* bojom te slikanom uz pomoć uređaja za slikanje s UV svjetlom. U svaku jažicu gela sam stavila po 4 μL uzorka te u zadnju jažicu 4 μL genskog biljega (eng. *gene ruler*). Gel sam zatim stavila u kadnicu za elektroforezu na 120 V, 400 mA i 30 minuta. Od početnih 57 uzoraka njih je 24 ispalo uspješno te sam ih poslala na sekvenciranje u MacroGen Europe.

3.4 Filogenetska rekonstrukcija

Dobivene sekvence sam sravnila uz pomoć programa BioEdit 7.2. Kako ne bi došlo do pogrešnih rezultata (kako bi bili što pouzdaniji), sve su sekvence skraćene na dužinu od 543 baze, odnosno na odsječak u kojem su se pozicije unutar DNA mogle očitati bez greške. Od početnih 57 jedinki kojima sam uzela uzorak, samo je njih 20 rezultiralo uspješnim umnažanjem gena za citokrom *b* te sekvenciranjem i sravnjivanjem istih. Te su sekvence dalje korištene u molekularno genskim analizama. Filogenetsku rekonstrukciju sam provela metodama najveće parsimonije (eng. *maximum parsimony*, MP) i najveće vjerojatnosti (eng. *maximum likelihood*, ML), korištenjem programa PAUP* 4.0a169. Za usporedbu sam koristila sekvence iz banke gena (ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) s područja Europe, a ukoliko je bilo potrebno pri sravnjivanju sam početke tih sekvenci popunila oznakama N, što je oznaka za nepoznate baze. Kao vanjsku grupu (eng. *outgroup*) koristila sam se sekvencom vrste *Mus musculus* Linnaeus, 1758. Sve sekvence iz Banke gena koje sam koristila navedene su u Tablici 4.

Tablica 4. Popis korištenih sekvenci iz Banke gena. Imena sekvenci koja su navedena u tablici su kao takva prikazana i u filogenetskim stablima.

| IME SEKVENCE | VRSTA | PRISTUPNI BROJ (ENG. ACCESSION) | REFERENCA | LOKALITET / DRŽAVA |
|--------------|-----------------------------|---------------------------------|----------------------|--------------------|
| ASita1 | <i>Apodemus sylvaticus</i> | AJ311148 | Michaux i sur., 2002 | Lacij/Italija |
| ASita2 | <i>Apodemus sylvaticus</i> | AJ511937 | Michaux i sur., 2003 | Aspromonte/Italija |
| ASspa1 | <i>Apodemus sylvaticus</i> | AJ511914 | Michaux i sur., 2003 | Eugi/Španjolska |
| AScze1 | <i>Apodemus sylvaticus</i> | AJ511907 | Michaux i sur., 2003 | Češka |
| ASita3 | <i>Apodemus sylvaticus</i> | AJ511973 | Michaux i sur., 2003 | Sicilija/Italija |
| ASita4 | <i>Apodemus sylvaticus</i> | AJ511958 | Michaux i sur., 2003 | Kalabrija/Italija |
| ASser1 | <i>Apodemus sylvaticus</i> | AJ511946 | Michaux i sur., 2003 | Vojvodina/Srbija |
| ASser2 | <i>Apodemus sylvaticus</i> | AJ511945 | Michaux i sur., 2003 | Vojvodina/Srbija |
| ASser3 | <i>Apodemus sylvaticus</i> | AJ511941 | Michaux i sur., 2003 | Vojvodina/Srbija |
| ASslo1 | <i>Apodemus sylvaticus</i> | AJ511932 | Michaux i sur., 2003 | Slovenija |
| ASslo2 | <i>Apodemus sylvaticus</i> | AJ511931 | Michaux i sur., 2003 | Slovenija |
| AScze2 | <i>Apodemus sylvaticus</i> | AJ511908 | Michaux i sur., 2003 | Češka |
| ASspa2 | <i>Apodemus sylvaticus</i> | AJ511913 | Michaux i sur., 2003 | Murcia/Španjolska |
| AFfra1 | <i>Apodemus flavicollis</i> | AJ311151 | Michaux i sur., 2002 | Allier/Francuska |
| AFita1 | <i>Apodemus flavicollis</i> | AJ311150 | Michaux i sur., 2002 | Abruzo/Italija |
| AFita2 | <i>Apodemus flavicollis</i> | AJ605637 | Michaux i sur., 2004 | Aspromonte/Italija |
| AFswe1 | <i>Apodemus flavicollis</i> | AJ631970 | Michaux i sur., 2005 | Švedska |
| AFspa1 | <i>Apodemus flavicollis</i> | AJ631969 | Michaux i sur., 2005 | Navarra/Španjolska |
| AFser1 | <i>Apodemus flavicollis</i> | AJ605692 | Michaux i sur., 2004 | Šušara/Srbija |

| | | | | |
|------------|-----------------------------|----------|----------------------|----------------------|
| AFser2 | <i>Apodemus flavicollis</i> | AJ605691 | Michaux i sur., 2004 | Šušara/Srbija |
| AFswe2 | <i>Apodemus flavicollis</i> | AJ605664 | Michaux i sur., 2004 | Švedska |
| AFspa2 | <i>Apodemus flavicollis</i> | AJ605661 | Michaux i sur., 2004 | Navarra/Španjolska |
| AFslo1 | <i>Apodemus flavicollis</i> | AJ605657 | Michaux i sur., 2004 | Asan Česma/Slovenija |
| AFslo1 | <i>Apodemus flavicollis</i> | AJ605656 | Michaux i sur., 2004 | Skofja/Slovenija |
| AFmac1 | <i>Apodemus flavicollis</i> | AJ605644 | Michaux i sur., 2004 | Bistra/Makedonija |
| M musculus | <i>Mus musculus</i> | AB033699 | Suzuki i sur., 2000 | Japan |

3.5 Genska raznolikost i molekularna dijagnostika

Uz pomoć računarnog programa DnaSP v6 utvrdila sam osnovne mjere genskog polimorfizma za obje vrste kako bi dobila uvid u njihovu gensku raznolikost. Mjere koje sam odredila uključuju: broj polimorfnih mjesta odnosno broj pozicija na kojima dolazi do mutacija/promjena nukleotida (S), ukupan broj mutacija odnosno ukupan broj primijećenih promjena nukleotida u slijedovima (η), broj haplotipova (H), raznolikost haplotipova (Hd), nukleotidnu raznolikost odnosno prosječan broj nukleotidnih razlika po poziciji između dvije sekvence (π) i prosječan broj razlika nukleotida (k). Kako bih utvrdila nukleotidne pozicije koje predstavljaju fiksne razlike (mjesta u slijedu DNA koja odvajaju istraživane vrste), koristila sam računarni program SITES.

3.6 Statistička analiza morfometrijskih podataka

Usporedbu morfometrijskih značajki provela sam u programu TIBCO Statistica™ 14.0 koristeći se analizom glavnih komponenata (eng. *principal component analysis*, PCA) te analizom varijance (jednosmjerna ANOVA), koje omogućuju usporedbu setova podataka s više varijabli (Fowler i sur., 1998). Analizom glavnih komponenata nastojala sam utvrditi postoji li grupiranje jedinki ovisno o uzetim morfološkim mjerama te hoće li se te grupe poklapati s grupama dobivenim filogenetskom rekonstrukcijom. Ovom metodom identificirala sam i varijable koje najviše utječu na varijabilnost u danom setu podataka. Analizu varijance koristila sam za utvrđivanje postojanja značajne razlike između skupina, dok sam razlike između pojedinih skupina provjeravala *post-hoc* Fisherovim testom. Jedinke su za obje analize bile podijeljene na osnovu vrste i spola, a varijable po kojima su se uspoređivale su bile vanjske morfološke mjere, navedene u Tablici 3. Ukoliko je negdje nedostajalo podataka (mjera nije mogla biti uzeta zbog oštećenja) program je uzimao srednju vrijednost (eng. *mean substitution*).

4. REZULTATI

4.1 Filogenetska rekonstrukcija

Uz pomoć programa DnaSP utvrdila sam postojanje 15 haplotipova (Tablica 5) na temelju kojih sam dalje provela metode filogenetske rekonstrukcije. Od 543 parova baza u sekvencama korištenim za izradu filogenetskih stabala, konstantnih mjesta je bilo 409 (75,32 %), a varijabilnih 134 (24,68 %). Od tih 134, 88 je parsimonijski informativnih (65,67 %), dok preostalih 46 nije (34,33 %). Filogenetsko stablo dobiveno metodom najveće parsimonije opisano je u Tablici 6 te prikazano na Slici 10. Filogenetsko stablo dobiveno metodom najveće vjerojatnosti prikazano je na Slici 11.

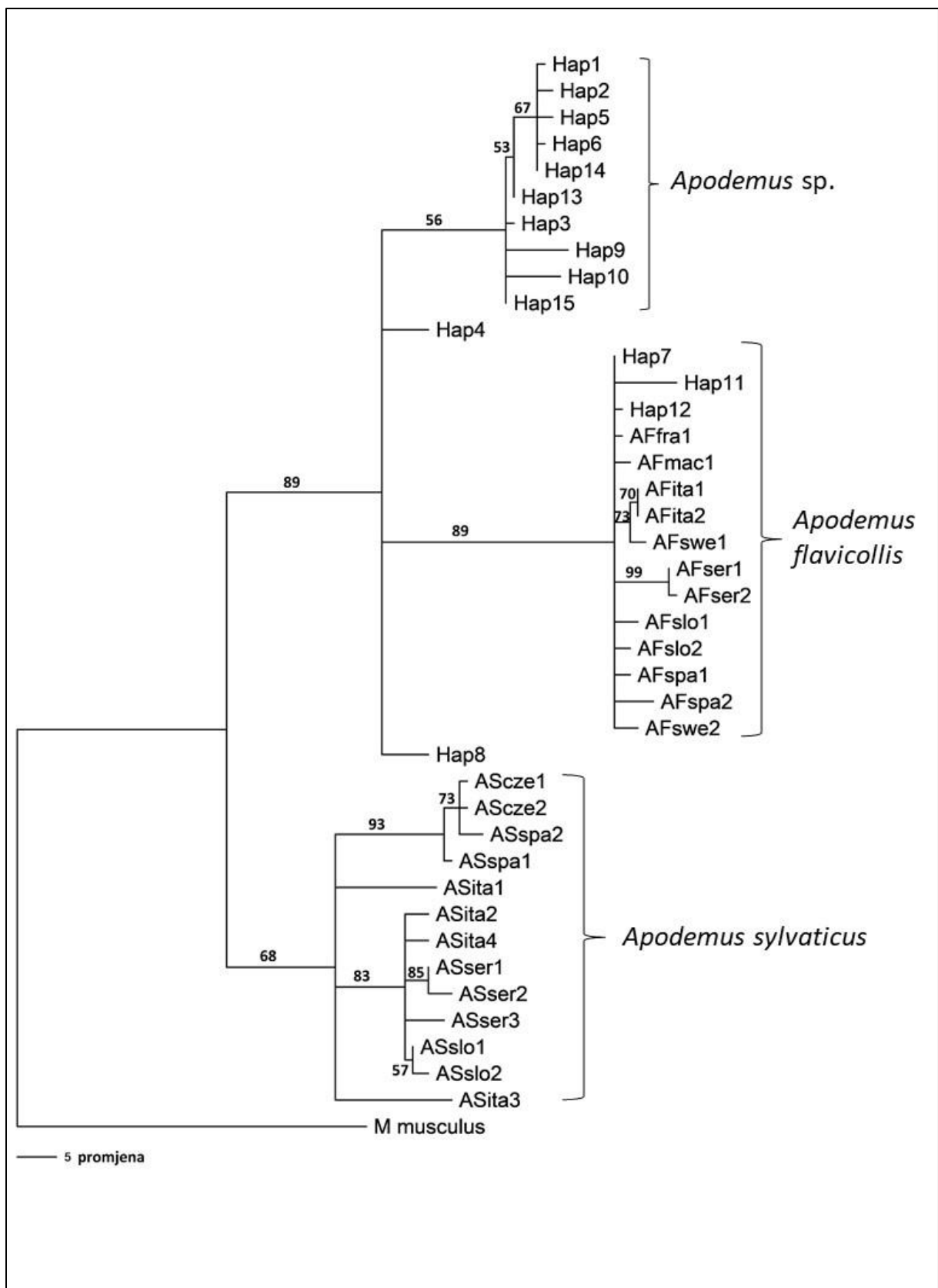
Tablica 5. Popis jedinki s pripadajućim haplotipovima. Imena haplotipova koja su navedena u tablici su kao takva prikazana i u filogenetskim stablima.

| HAPLOTIP | KOD JEDINKE |
|----------|------------------------------------|
| Hap1 | C003 |
| Hap2 | A009 |
| Hap3 | A011 |
| Hap4 | F001 |
| Hap5 | F004 |
| Hap6 | G005 |
| Hap7 | G006 |
| Hap8 | G007 |
| Hap9 | G009 |
| Hap10 | G013 |
| Hap11 | G014 |
| Hap12 | G015 |
| Hap13 | I002, I004, I005, I007, I009, I012 |
| Hap14 | I008 |
| Hap15 | I010 |

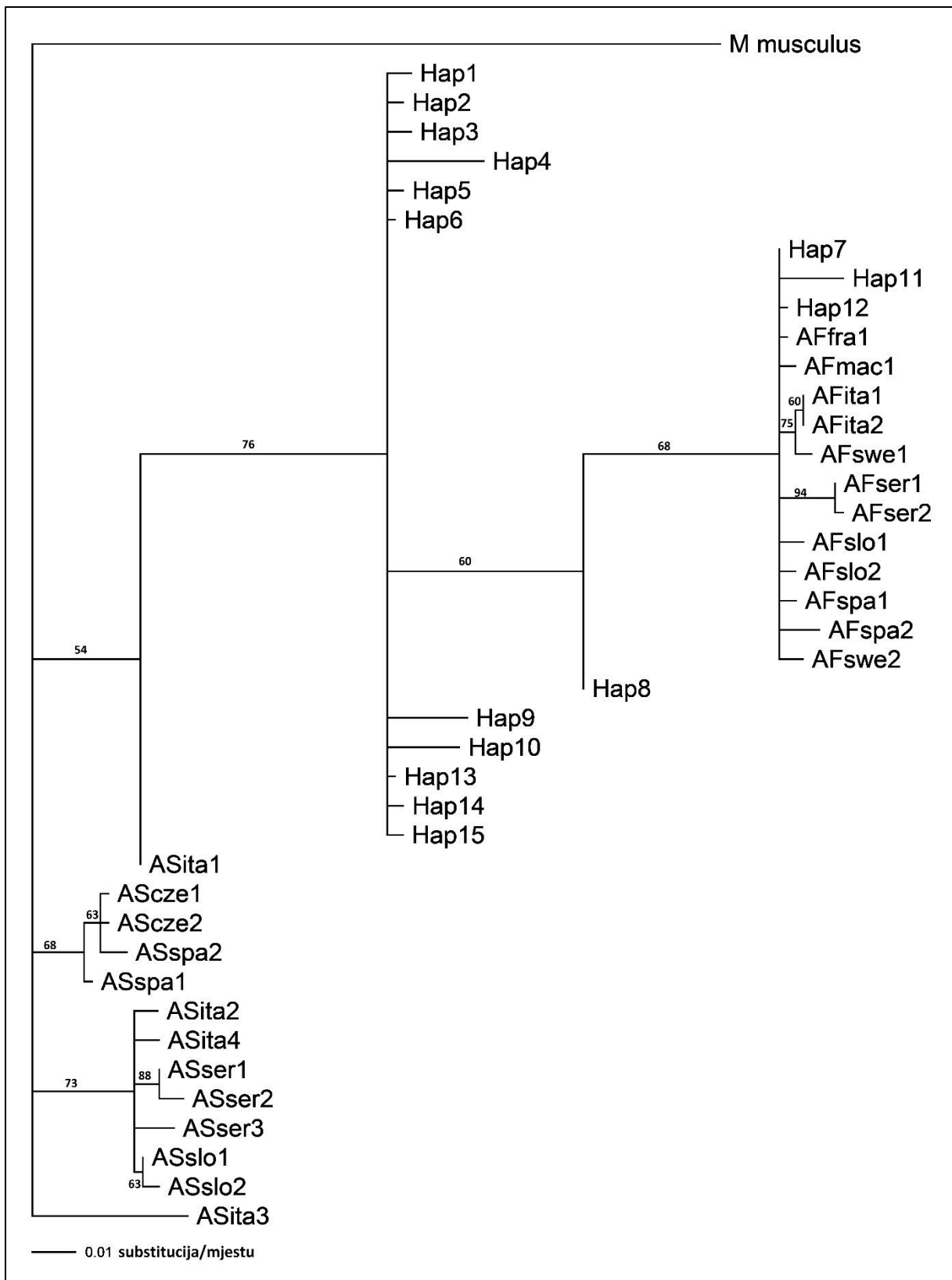
Tablica 6. Opis stabla dobivenog metodom najveće parsimonije.

| | |
|--|--------|
| DULJINA STABLA | 268 |
| INDEKS KONZISTENCIJE (CI) | 0,5821 |
| INDEKS HOMOPLAZIJE (HI) | 0,4179 |
| INDEKS KONZISTENCIJE BEZ NEINFORMATIVNIH MJESTA | 0,4909 |
| INDEKS HOMOPLAZIJE BEZ NEINFORMATIVNIH MJESTA | 0,5091 |
| INDEKS RETENCIJE (RI) | 0,8828 |
| INDEKS RESKALIRANE KONZISTENCIJE (RC) | 0,5139 |

Na stablu dobivenom metodom najveće parsimonije (Slika 10) vidi se jasno odvajanje analiziranih sekvenci u tri skupine, odnosno vrste. Prvu skupinu nazvanu „*Apodemus sylvaticus*“ čine sekvence jedinki te vrste preuzete iz Banke gena te niti jedan uzorak s područja Medvednice, dok drugu skupinu nazvanu „*Apodemus flavicollis*“ čine sekvence jedinki te vrste preuzete iz Banke gena te sekvence triju jedinki s područja Medvednice (G006, G014 i G015). Kao treća skupina („*Apodemus* sp.“) izdvojile su se isključivo jedinke s područja Medvednice (C003, A009, F004, G005, I008, I002, I004, I005, I007, I009, I012, A011, G009, G013 i I010). Jedinke s područja Medvednice kodova F001 i G007, nisu se svrstale niti u jednu skupinu, međutim sa sigurnošću ne pripadaju vrsti *Apodemus sylvaticus*. Na stablu dobivenom metodom najveće vjerojatnosti (Slika 11) ponovno vidimo odvajanja analiziranih sekvenci u skupine, samo su ovdje te skupine malo manje jasne. Skoro sve sekvence vrste *A. sylvaticus* ponovno su odvojene u svoju, bazalnu grupu, uz jednu sekvencu (ASita1) koja se od njih odvojila. Grupiranje jedinki G006, G014 i G015 skupa sa sekvencama vrste *A. flavicollis* poklapa se s rezultatima stabla dobivenim metodom najveće parsimonije što potvrđuje rezultat da su te jedinke stvarno pripadnici te vrste. Međutim, preostale sekvence (one s područja Medvednice) pokazuju politomiju. Vrijednosti podržanosti vanjskih grananja relativno su niske, niže nego u MP stablu. Smatram da je zbog navedenih razloga stablo dobiveno metodom najveće parsimonije pouzdanije te sam se na njega više oslanjala u objašnjenju rezultata.



Slika 10. Filogenetsko stablo dobiveno metodom najveće parsimonije s navedenim vrijednostima podržanosti (eng. *bootstrap*).



Slika 11. Filogenetsko stablo dobiveno metodom najveće vjerojatnosti s navedenim s navedenim vrijednostima podržanosti (eng. *bootstrap*).

4.2 Genska raznolikost i molekularna dijagnostika

U Tablici 7 prikazane su osnovne mjere genskog polimorfizma. Sekvence sam za ovu analizu podijelila ovisno o njihovom grupiranju na filogenetskom stablu dobivenom metodom najveće parsimonije (Slika 10), pa su tako u grupu „*Apodemus* sp.“ stavljene jedinke kodova C003, A009, F004, G005, I008, I002, I004, I005, I007, I009, I012, A011, G009, G013 i I010, a u grupu „*Apodemus flavicollis*“ jedinke kodova G006, G014 i G015. Jedinke F001 i G007 nisam uključivala niti u jednu grupu zbog njihovog neodređenog mjesta na stablima, ali sam ih koristila za izračun ukupnog polimorfizma. Visoka vrijednost nukleotidne raznolikosti (π) i visok prosječan broj razlika nukleotida (k) te velik broj haplotipova (H) za sve tri grupe ukazuje na visoku gensku raznolikost odgovarajućih grupa.

Tablica 7. Mjere genskog polimorfizma proučavanih grupa. Kratice korištene u tablici: N – broj sekvenci, S - broj polimorfni mjesta, η - ukupan broj mutacija, H - broj haplotipova, Hd - raznolikost haplotipova, π - nukleotidnu raznolikost i k - prosječan broj razlika nukleotida.

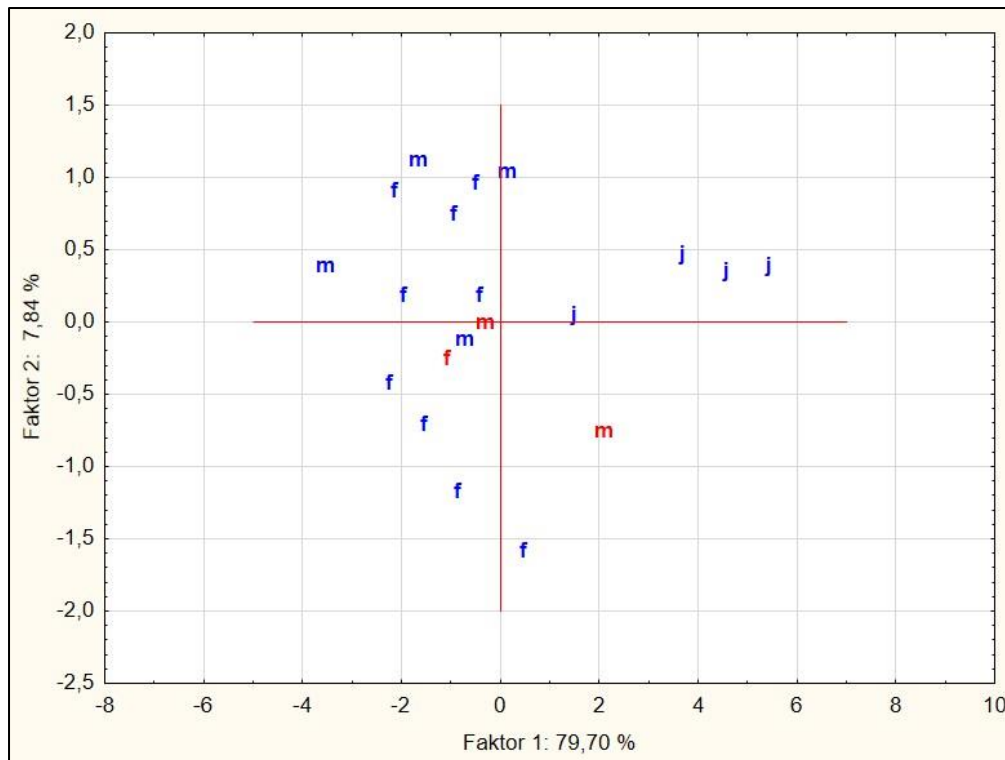
| GRUPA | N | S | η | H | Hd | π | k |
|-----------------------------|----|----|--------|----|-------|---------|--------|
| <i>Apodemus</i> sp. | 15 | 18 | 19 | 10 | 0,857 | 0,00756 | 4,105 |
| <i>Apodemus flavicollis</i> | 3 | 9 | 9 | 3 | 1 | 0,01105 | 6 |
| Sve sekvence | 20 | 53 | 54 | 15 | 0,921 | 0,03116 | 16,921 |

Nukleotidne pozicije koje predstavljaju fiksne razlike između istraživanih vrsta prikazane su u Tablici 8. Dobiveno je ukupno 28 dijagnostičkih pozicija. Uz pomoć tih pozicija te ovisno o tome koji se nukleotid na tim određenim pozicijama nalazi, možemo odrediti o kojoj se vrsti radi. Ovdje sam ponovno jedinke podijelila u skupine ovisno o tome kako su se grupirale u filogenetskom stablu dobivenom metodom najveće parsimonije (Slika 10) te su jedinke F001 i G007 isključene iz analize kako ne bi narušile točnost rezultata.

Tablica 8. Nukleotidne pozicije koje predstavljaju fiksne razlike između istraživanih skupina te baze koje se u svakoj grupi nalaze na tim pozicijama.

| NUKLEOTIDNA POZICIJA | VRSTA | |
|-------------------------|------------------------|---------------------------------------|
| | <i>Apodemus</i> sp. | <i>Apodemus</i> <i>flavicollis</i> |
| 45 | C | T |
| 61 | C | T |
| 75 | T | C |
| 102 | T | C |
| 108 | A | C |
| 109 | C | T |
| 117 | T | C |
| 123 | T | A |
| 135 | G | C |
| 138 | C | T |
| 144 | C | T |
| 189 | T | C |
| 207 | T | C |
| 234 | G | A |
| 237 | C | T |
| 249 | T | C |
| 261 | T | C |
| 280 | C | T |
| 291 | T | C |
| 309 | C | T |
| 318 | C | A |
| 321 | T | C |
| 426 | A | G |
| 444 | C | T |
| 445 | T | C |
| 448 | C | T |
| 513 | C | T |
| 543 | T | C |

4.3 Statistička analiza morfometrijskih podataka



Slika 12. Grafički prikaz projekcije slučajeva na faktorski prostor dobiven metodom glavnih komponentata (PCA). Plavom bojom su označene jedinke koje pripadaju vrsti *Apodemus* sp., a crvenom jedinke koje pripadaju vrsti *A. flavicollis*. Slovom „m“ su označene jedinke koje su mužjaci, slovom „f“ ženke, a slovom „j“ su označene juvenilne jedinke.

Na slici 12 nalazi se grafički prikaz projekcije slučajeva na faktorski prostor dobiven metodom glavnih komponentata (PCA). Vidljivo je da se skupina juvenilnih jedinki odvaja od ostatka dok se jedinke mužjaka i ženki uglavnom preklapaju, što ukazuje na manju varijabilnost morfoloških mjera u odraslih jedinki. Također, jedinke vrste *Apodemus* sp. ovom su metodom pokazale puno veću unutarvrstu morfološku varijabilnost, za razliku od jedinki vrste *A. flavicollis*. Na prvi faktor (prvu glavnu komponentu) su najveći utjecaj imale mjere: dužina tijela, BL (-0,961694), dužina repa, TL (-0,953127), dužina glave, HL (-0,927791) i dužina najduže vibrise, VL (-0,955556). Na drugi faktor najveći utjecaj imala je dužina uške, EL (0,656865).

Analiza varijance pokazala je statistički značajnu razliku među vrstama za sve varijable osim za dužinu uške, EL (Tablica 9) čija je p -vrijednost bila viša od 0,05. Ovo govori samo da postoje statistički značajne razlike među istraživanim vrstama, ali ne i o konkretnim odnosima među pojedinim vrstama – u to nam uvid daju rezultati *post-hoc* Fisherovih testova. Mužjaci ovih vrsta statistički se značajno razlikuju u tri varijable (morfloške mjere): dužina repa, dužina glave i dužina najduže vibrise (Tablica 10). Ženke vrste *Apodemus* sp. pokazale su statistički značajnu razliku samo s mužjacima vrste *Apodemus flavicollis* u širini uške (EW). Njima sam također utvrdila i da se grupa juvenilnih jedinki u većini varijabli statistički značajno razlikuje od mužjaka i ženki obje vrste. Budući da je od vrste *A. flavicollis* prikupljena samo jedna ženka, ona nije mogla ući u analizu varijance, stoga ovdje nema skupine f2.

Tablica 9. p -vrijednost dobivena analizom varijance (jednosmjerna ANOVA). Crvenom bojom označene su sve p -vrijednosti manje od 0,05, odnosno one od statističkog značaja.

| NAZIV MJERE | p -vrijednost |
|-------------------------------|-----------------|
| Dužina tijela; BL | 0,000011 |
| Dužina repa; TL | 0,000052 |
| Dužina glave; HL | 0,000175 |
| Dužina uške; EL | 0,062891 |
| Širina uške; EW | 0,007678 |
| Dužina stražnjeg stopala; HFL | 0,003608 |
| Dužina najduže vibrise; VL | 0,000164 |

Tablica 10. Rezultati Fisherovog *post-hoc* testa. Crvenom bojom označene su sve *p*-vrijedosti manje od 0,05, odnosno one od statističkog značaja. Korištene kratice: m1 – mužjaci vrste *Apodemus* sp., f1 – ženke vrste *Apodemus* sp., j1 – juvenilne jedinke vrste *Apodemus* sp., m2 – mužjaci vrste *Apodemus flavicollis*, df – stupnjevi slobode.

| LSD test; varijabla BL (dužina tijela), df = 14,0 | | | | |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|
| SPOL | m2 | f1 | j1 | m1 |
| m2 | | 0,145559 | 0,001281 | 0,084158 |
| f1 | 0,145559 | | 0,000002 | 0,472442 |
| j1 | 0,001281 | 0,000002 | | 0,000009 |
| m1 | 0,084158 | 0,472442 | 0,000009 | |
| LSD test; varijabla TL (dužina repa), df = 14,0 | | | | |
| SPOL | m2 | f1 | j1 | m1 |
| m2 | | 0,059312 | 0,013861 | 0,045439 |
| f1 | 0,059312 | | 0,000010 | 0,557905 |
| j1 | 0,013861 | 0,000010 | | 0,000045 |
| m1 | 0,045439 | 0,557905 | 0,000045 | |
| LSD test; varijabla HL (dužina glave), df = 14,0 | | | | |
| SPOL | m2 | f1 | j1 | m1 |
| m2 | | 0,099240 | 0,061455 | 0,009584 |
| f1 | 0,099240 | | 0,000128 | 0,061224 |
| j1 | 0,061455 | 0,000128 | | 0,000039 |
| m1 | 0,009584 | 0,061224 | 0,000039 | |
| LSD test; varijabla EL (dužina uške), df = 14,0 | | | | |
| SPOL | m2 | f1 | j1 | m1 |
| m2 | | 0,269535 | 0,618753 | 0,091015 |
| f1 | 0,269535 | | 0,042710 | 0,274605 |
| j1 | 0,618753 | 0,042710 | | 0,015760 |
| m1 | 0,091015 | 0,274605 | 0,015760 | |
| LSD test; varijabla EW (širina uške), df = 14,0 | | | | |
| SPOL | m2 | f1 | j1 | m1 |
| m2 | | 0,030601 | 0,579059 | 0,226251 |
| f1 | 0,030601 | | 0,001462 | 0,295678 |
| j1 | 0,579059 | 0,001462 | | 0,048884 |
| m1 | 0,226251 | 0,295678 | 0,048884 | |
| LSD test; varijabla HFL (dužina stražnjeg stopala), df = 14,0 | | | | |
| SPOL | m2 | f1 | j1 | m1 |
| m2 | | 0,576751 | 0,022319 | 0,586644 |
| f1 | 0,576751 | | 0,000555 | 0,928040 |
| j1 | 0,022319 | 0,000555 | | 0,003033 |
| m1 | 0,586644 | 0,928040 | 0,003033 | |
| LSD test; varijabla VL (dužina najduže vibrise), df = 14,0 | | | | |
| SPOL | m2 | f1 | j1 | m1 |
| m2 | | 0,165264 | 0,030444 | 0,018181 |
| f1 | 0,165264 | | 0,000098 | 0,072294 |
| j1 | 0,030444 | 0,000098 | | 0,000037 |
| m1 | 0,018181 | 0,072294 | 0,000037 | |

5. RASPRAVA

Dobivenih 15 haplotipova za ovako malo područje istraživanja, kao i visoke vrijednosti genskog polimorfizma svakako govore u prilog velikoj raznolikosti miševa na Medvednici i važnosti Medvednice za populacije miševa. Iako neki radovi (Michaux i sur., 1998; Dubey i sur., 2009; Kryštufek i sur., 2012) navode velik broj haplotipova u odnosu na uzorkovane jedinke, takvi radovi uglavnom obuhvaćaju veća područja istraživanja te su provedena na kvalitetnijim sekvencama. Također, treba uzeti u obzir da je sekvenci u ovom istraživanju malo (20) te da obuhvaćaju samo polovicu gena za citokrom *b* budući da njihova čitljivost nije bila u potpunosti jasna, zbog čega postoji mogućnost pogreške. Smatram da bi s boljim sekvencama (uz bolja očitavanja) broj haplotipova možda bio nešto manji, s obzirom na prisutnost nekoliko nesigurnih nukleotidnih pozicija u našem setu podataka. Međutim, i ovaj rezultat daje uvid u populacije malih sisavaca na Medvednici te njihovu raznolikost. Filogenetska stabla dobivena metodom najveće parsimonije i metodom najveće vjerojatnosti su pokazala jasno odjeljenje u tri skupine, odnosno vrste: *A. sylvaticus*, *A. flavicollis* i *Apodemus* sp. kojoj je pripala većina sekvenci jedinki s Medvednice. Ovo je vrlo zanimljiv rezultat iz dva razloga. Prvo, niti jedna od 20 analiziranih sekvenci ne odgovara vrsti *A. sylvaticus* iako je ta vrsta očekivana na tom području i na istraživanim staništima (Petrov, 1992; Macdonald i Barrett, 1993). Drugo, ovako jasno odjeljenje, ali i genska raznolikost cijele skupine ukazuje na prisutnost treće vrste koja nije niti *A. sylvaticus*, niti *A. flavicollis*. Također je sigurno da se ne radi ni o vrsti *A. agrarius* pošto je ta vrsta morfološki lako prepoznatljiva (Macdonald i Barrett, 1993), a i filogenetske rekonstrukcije drugih autora ju smještaju kao bazalnu liniju europskih vrsta roda *Apodemus* (Michaux i sur., 2002; Suzuki i sur., 2008; Bugarski-Stanojević i sur., 2011). Ovdje bi se potencijalno moglo raditi o novoj vrsti za ovo područje, najvjerojatnije *A. alpicola* ili *A. uralensis* čije su granice areala relativno blizu ovog područja, a i drugi autori (Michaux i sur., 2002; Bellinvia, 2004; Suzuki i sur., 2008) su filogenetskom rekonstrukcijom smjestili obje ili jednu od vrsta kao sestrinske s *A. flavicollis*. Također, postoji mogućnost da se radi i o potpuno novom taksonu koji još nije opisan. U svakom slučaju, potrebno je napraviti taksonomsku reviziju vrsta roda *Apodemus* na području kontinentalne, ali i cijele Hrvatske uz pomoć molekularnih i detaljnih morfoloških metoda.

Uz već istaknutu problematiku determinacije vrsta putem morfologije (Tvrtković, 1979; Popov, 1993; Jojić i sur., 2014), postoji mogućnost i krivo unesenih sekvenci u Banci gena što

bi u konačnici rezultiralo greškama pri filogenetskim istraživanjima te dodatno kompliciralo cijelu problematiku. Svakako ne bi bilo na odmet i na većoj skali učiniti taksonomsku reviziju.

Visoka genska raznolikost istraživanih skupina, ali i svih sekvenci zajedno upućuje na stabilnost istraživanih populacija na području Medvednice, odnosno na činjenicu da se ove populacije već dugo nalaze na ovom području, u povoljnim uvjetima. To je u skladu s istraživanjima Michaux i sur. (2005a) i Kryštufek i sur. (2012) koja navode područje jugoistočne Europe kao refugij za vrijeme zadnjeg ledenog doba vrstama šumskih miševa kao što su *A. sylvaticus* i *A. flavicollis*. Također, ovakvi rezultati ukazuju i na činjenicu da istraživane populacije nisu nedavno bile pod utjecajem genskog drifta, to jest da imaju raznoliku gensku zalihu (eng. *gene pool*). Sve dosad navedeno ide u prilog da ovim populacijama trenutno nije potrebna dodatna zaštita, međutim svakako je od koristi što se nalaze unutar zaštićenog područja Parka prirode i Natura 2000 mreže (Farkaš-Topolnik i sur., 2015; bioportal.hr/gis) kako bi ta visoka genska raznolikost i dalje opstala. S obzirom na tako veliku raznolikost ovih skupina postavlja se pitanje postojanja manjeg refugija na području Medvednice, što bi svakako bilo od interesa dodatno istražiti. Zanimljivo je kako Michaux i sur. (2005a) navode da je vrsta *A. sylvaticus* na području Balkana tijekom zadnjeg ledenog doba bila pod utjecajem efekta uskog grla, a u ovom istraživanju nisam dobila niti jednu jedinku koja bi pripadala toj vrsti. Predlažem ponavljanje istraživanja s većim brojem uzoraka (i kvalitetnijim sekvencama) kako bi se dobio uvid u gensku raznolikost i stanje populacija te vrste.

Nukleotidne pozicije koje predstavljaju fiksne razlike između istraživanih vrsta govore da se istraživane jedinke jasno odvajaju u dvije vrste. Tu se također treba osvrnuti na činjenicu da su sekvence bile kratke i slabije kvalitete, ali i sa samo jednog lokaliteta (uže područje Medvednice). Smatram da bi bolje i duže sekvence te obuhvaćanje više lokaliteta u Hrvatskoj smanjilo broj tih dijagnostičkih razlika, ali bi također povećao njihovu točnost. U svakom slučaju, i ovaj podatak ukazuje na korisnost molekularnih metoda pri determinaciji vrsta jer je s kratkim odsječkom DNA i malim brojem dijagnostičkih pozicija moguće odrediti o kojoj se vrsti radi. Ovakve metode mogle bi se primjenjivati pri analizi okolišne DNA (eDNA) ili pak pri uzetim uzorcima dlake i slično.

Statističkom analizom morfometrijskih podataka nažalost nisam mogla dobiti pouzdane zaključke s obzirom da sam u analize išla s malim brojem uzoraka (20). Već početni broj izmjerenih jedinki (57) nije bio optimalan, a onda se i on dodatno smanjio kao posljedica

neuspjelih sekvenci. Ova se problematika provlači kroz cijeli rad te ju treba imati na umu pri sagledavanju svih rezultata.

Analiza glavnih komponenti pokazuje veću varijabilnost morfoloških mjera unutar vrste *Apodemus* sp. Tu naravno treba uzeti u obzir mali broj analiziranih jedinki vrste *A. flavicollis* (samo tri) koji vrlo vjerojatno zamagljuje stvarnu predodžbu morfološke raznolikosti ove vrste. Budući da ne znam o kojoj se vrsti točno radi, kada govorimo o *Apodemus* sp. teško je usporediti ove rezultate s istraživanjima drugih autora. Međutim, poznato je da vrste *A. sylvaticus* i *A. flavicollis* pokazuju varijabilnost u morfološkim mjerama među populacijama (Tvrtković, 1979; Popov, 1993). I analiza glavnih komponenti i *post hoc* Fisherovi testovi pokazali su jasno odjeljenje juvenilnih jedinki, što je i očekivano budući da su te jedinke subjektivno na osnovu njihovih morfoloških mjera unaprijed svrstane u tu skupinu – odnosno, manje jedinke su pri determinaciji spola svrstane u kategoriju „juvenilne“. Analizom varijance i *post-hoc* Fisherovim testovima dobivene su statistički značajne razlike među mužjacima vrsta *A. flavicollis* i *Apodemus* sp. u dužini glave (HL), repa (TL) i najduže vibrise (VL). Dužina repa i dužina najduže vibrise neka su od svojstva koja se ponekad navode kao deterministička unutar roda *Apodemus* (Tvrtković, 1979; Macdonald i Barrett, 1993), stoga ovaj rezultat ukazuje na potencijalno determinističko svojstvo za ove dvije vrste, ali se svakako treba ispitati na većem uzorku. Kako se radi o jedinkama istoga spola možemo ignorirati mogući utjecaj spolnog dimorfizma. Razlika između ženki *Apodemus* sp. i mužjaka *A. flavicollis* u širini uške (EW) koja se pokazala statistički značajnom bi s druge strane mogla biti objašnjena spolnim dimorfizmom. Zbog nejasnih razlika u morfološkim mjerama dobivenim u ovom radu, ali i drugim radovima, te zbog njihove velike varijabilnosti smatram da se nije dobro oslanjati na morfometriju ovih vrsta pri determinaciji. Svakako bi se u budućnosti trebalo osvrnuti na molekularne metode ili eventualno istražiti potencijal fenoloških značajki (boja krzna, oštrina prijelaza, ogrlica), međutim i tu staviti naglasak na kombinaciju s molekularnim metodama.

6. ZAKLJUČAK

Ovim istraživanjem došla sam do sljedećih zaključaka:

- Filogenetska rekonstrukcija te broj dijagnostičkih mjesta ukazuju na jasnu odvojenost istraživanih jedinki u dvije vrste: *Apodemus flavicollis* i *Apodemus* sp. koja predstavlja zasad nepoznatu vrstu ovog područja
- Niti jedna analizirana jedinka ne pripada vrsti *Apodemus sylvaticus*
- Visoka genska raznolikost istraživanih vrsta upućuje na stabilnost i dugo postojanje ovih populacija na području Medvednice, što pak ide u prilog hipotezi o postojanju refugija na ovim područjima (područje jugoistočne Europe)
- Određivanje nukleotidnih pozicija koje predstavljaju fiksne razlike između istraživanih skupina ukazuje na isplativost i efektivnost molekularnih metoda pri determinaciji vrsta
- *Apodemus* sp. s područja Medvednice pokazuje veću varijabilnost morfometrijskih značajki od vrste *Apodemus flavicollis*
- Mužjaci vrsta *Apodemus* sp. i *A. flavicollis* statistički se značajno razlikuju u dužini repa, dužini glave i dužini najduže vibrise
- Morfometrijske značajke, zbog velike varijabilnosti i malog uzorka, nisu se pokazale pouzdanima kao potencijalni alat u determinaciji vrsta u budućnosti
- Potrebna je taksonomska revizija vrsta roda *Apodemus* na području Hrvatske, a također bi bilo dobro i ponoviti ovo istraživanje s ciljem dobivanja većeg broja iskoristivih sekvenci (od koristi bi bilo i obuhvaćanje većeg broja lokaliteta)

7. LITERATURA

Ancillotto, L., Mori, E., Sozio, G., Solano, E., Bertolino, S. i Russo, D. (2016): **A novel approach to field identification of cryptic *Apodemus* wood mice: calls differ more than morphology.** Mammal Review 47 (1), 6-10.

Andrzejewski R., Babińska-Werka J., Gliwicz J. i Goszczyński J. (1978): **Synurbization processes in population of *Apodemus agrarius*. I. Characteristics of populations in an urbanization gradient.** Acta Theriologica 23 (20), 341-358.

Antolović, J., Flajšman, E., Frković, A., Grgurev, M., Grubešić, M., Hamidović, D., Holcer, D., Pavlinić, I., Vuković, M. i Tvrčković, N. (autor i urednik) (2006): **Crvena knjiga sisavaca Hrvatske.** Hrvatski prirodoslovni muzej, Zagreb.

Barčiová, L. i Macholán, M. (2009): **Morphometric key for the discrimination of two wood mice species, *Apodemus sylvaticus* and *A. flavicollis*.** Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae 55 (1), 31-38.

Bartolommei, P., Sozio, G., Bencini, C., Cinque, C., Gasperini, S., Manzo, E., Prete, S., Solano, E., Cozzolino, R. i Mortelliti, A. (2016): **Field identification of *Apodemus flavicollis* and *Apodemus sylvaticus*: a quantitative comparison of different biometric measurements.** Mammalia 80 (5), 541-547.

Bellinvia, E. (2004): **A phylogenetic study of the genus *Apodemus* by sequencing the mitochondrial DNA control region.** Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research 42 (4), 289-297.

Bergstedt, B. (1965): **Distribution, reproduction, growth and dynamics of the rodent species *Clethrionomys glareolus* (Schreber), *Apodemus flavicollis* (Melchior) and *Apodemus sylvaticus* (Linné) in southern Sweden.** Oikos 16 (1/2), 132-160.

Bugarski-Stanojević, V., Blagojević, J., Stamenković, G., Adnađević, T., Giagia-Athanasopoulou, E. B. i Vujošević, M. (2011): **Comparative study of the phylogenetic structure in six *Apodemus* species (Mammalia, Rodentia) inferred from ISSR-PCR data.** Systematics and Biodiversity 9 (1), 95-106.

Çolak, R., Çolak, E. i Yiğit, N. (2005): **Morphometric, karyotypic and electrophoretic analysis of the genus *Apodemus* Kaup, 1826 (Mammalia: Rodentia) in Thrace.** Turkish Journal of Zoology 29 (2), 147-153.

Cox, C. B., Moore, P. D. i Ladle, R. J. (2016): **Biogeography: An Ecological and Evolutionary Approach – Ninth Edition.** John Wiley & Sons, Chichester, UK.

Demeter, A. i Lázár, P. (1984): **Morphometric analysis of field mice *Apodemus*: character selection for routine identification (Mammalia).** Annales historico-naturales musei nationalis hungarici 76, 297-322.

Dubey, S., Michaux, J., Brünner, H., Hutterer, R. i Vogel, P. (2009): **False phylogenies on wood mice due to cryptic cytochrome-*b* pseudogene.** Molecular Phylogenetics and Evolution 50 (3), 633-641.

Farkaš-Topolnik, N., Malić-Limari, S., Ban Ćurić, T., Sović, P., Jurjević Varga, M., Slukan, D., Vlašić, A., Ocvirek, M., Rosandić, H., Šantek, S. i Kramarić, Ž. (2015): **Plan upravljanja Parka prirode Medvednica.** Park prirode Medvednica, Zagreb.

Fowler, J., Cohen, L. i Jarvis, P. (1998): **Practical statistics for field biology.** Wiley, Chichester.

Hirning, U., Schulz, W. A., Just, W., Adolph, S. i Vogel, W. (1989): **A comparative study of the heterochromatin of *Apodemus sylvaticus* and *Apodemus flavicollis*.** Chromosoma (Berl) 98, 450-455.

Hoffmeyer, I. (1973): **Interaction and habitat selection in the mice *Apodemus flavicollis* and *A. sylvaticus*.** Oikos 24 (1), 108-116.

Jojić, V., Bugarski-Stanojević, V., Blagojević, J. i Vujošević, M. (2014): **Discrimination of the sibling species *Apodemus flavicollis* and *A. sylvaticus* (Rodentia, Muridae).** Zoologischer Anzeiger 253 (4), 261-269.

Kryštufek, B., Lužnik, M. i Buzan, V. E. (2012): **Mitochondrial cytochrome *b* sequences resolve the taxonomy of field mice (*Apodemus*) in the western Balkan refugium.** Acta Theriologica 57 (1), 1-7.

Macdonald, D. W. i Barrett, P. (1993): **Collins Field Guide to Mammals of Britain & Europe.** HarperCollins, London.

Marsh, A. C. W. i Harris, S. (2000): **Partitioning of woodland habitat resources by two sympatric species of *Apodemus*: lessons for the conservation of the yellow-necked mouse (*A. flavicollis*) in Britain.** Biological Conservation 92 (3), 275-283.

Michaux, J. R., Sara, M., Libois, R. i Matagne, R. (1998): **Is the woodmouse (*Apodemus sylvaticus*) of Sicily a distinct species?** Belgian Journal of Zoology 128 (2), 211-214.

Michaux, J. R., Chervret, P., Filippucci, M.-G. i Macholan, M. (2002): **Phylogeny of the genus *Apodemus* with a special emphasis on the subgenus *Sylvaemus* using the nuclear IRBP gene and two mitochondrial markers: cytochrome *b* and 12S rRNA.** Molecular Phylogenetics and Evolution 23 (2), 123-136.

Michaux, J. R., Magnanou, E., Paradis, E., Nieberding, C. i Libois, R. (2003): **Mitochondrial phylogeography of the Woodmouse (*Apodemus sylvaticus*) in the Western Palearctic region.** Molecular Ecology 12 (3), 685-697.

Michaux, J. R., Libois, R., Paradis, E. i Filippucci, M. G. (2004): **Phylogeographic history of the yellow-necked fieldmouse (*Apodemus flavicollis*) in Europe and in the Near and Middle East.** Molecular Phylogenetics and Evolution 32 (3), 788-798.

Michaux, J. R., Libois, R. i Filippucci, M. G. (2005a): **So close and so different: comparative phylogeography of two small mammal species, the Yellow-necked fieldmouse (*Apodemus flavicollis*) and the Woodmouse (*Apodemus sylvaticus*) in the Western Palearctic region.** Heredity 94 (1), 52-63.

Michaux, J., Bellinvia, E. i Lymberakis, P. (2005b): **Taxonomy, evolutionary history and biogeography of the broad-toothed field mouse (*Apodemus mystacinus*) in the eastern Mediterranean area based on mitochondrial and nuclear genes.** Biological Journal of the Linnean Society 85 (1), 53-63.

Montgomery, W. I. (1978): **Intra- and interspecific interactions of *Apodemus sylvaticus* (L.) and *A. flavicollis* (Melchior) under laboratory conditions.** Animal Behaviour 26 (4), 1247-1254.

Montgomery, W. I. (1980a): **Population structure and dynamics of' sympatric *Apodemus* species (Rodentia: Muridae).** Journal of Zoology 192 (3), 351-377.

Montgomery, W. I. (1980b): **Spatial organization in sympatric populations of *Apodemus sylvaticus* and *A. flavicollis* (Rodentia: Muridae).** Journal of Zoology 192 (3), 379-401.

Mujezinović, O., Margaletić, J., Treštić, T. i Dautbašić, M. (2013): **Utjecaj staništa na prisutnost šumske voluharice (*Myodes glareolus*) i žutogrlog šumskog miša (*Apodemus flavicollis*) na području Bosne.** Šumarski list 9-10, 487-494.

Petrov, B. (1992): **Mammals of Yugoslavia.** Natural History Museum, Beograd.

Popov, V. V. (1993): **Discriminant criteria and comparative study on morphology and habitat selection of *Apodemus sylvaticus* (Linnaeus, 1758) and *Apodemus flavicollis* (Melchior, 1834) (Mammalia, Rodentia, Muridae) in Bulgaria.** Acta Zoologica Bulgarica 46 (1), 101-111.

Reutter, B. A., Hausser, J. i Vogel, P. (1999): **Discriminant analysis of skull morphometric characters in *Apodemus sylvaticus*, *A. flavicollis* and *A. alpicola* (Mammalia; Rodentia) from the Alps.** Acta Theriologica 44 (3), 299-308.

Serizawa, K., Suzuki, H. i Tsuchiya, K. (2000): **A phylogenetic view on species radiation in *Apodemus* inferred from variation of nuclear and mitochondrial genes.** Biochemical Genetics 38 (1-2), 27-40.

Stearns, S. C. i Hoekstra, R. F. (2005): **Evolution: an introduction – Second edition.** Oxford University Press, New York.

Suzuki, H., Tsuchiya, K. i Takezaki, N. (2000): **A molecular phylogenetic framework for the Ryukyu endemic rodents *Tokudaia osimensis* and *Diplothrix legata*.** Molecular Phylogenetics and Evolution 15 (1), 15-24.

Suzuki, H., Filippucci, M. G., Chelomina, G. N., Sato, J. J., Serizawa, K. i Nevo, E. (2008): **A biogeographic view of *Apodemus* in Asia and Europe inferred from nuclear and mitochondrial gene sequences.** Biochemical Genetics 46 (5-6), 329-346.

Temple, H. J. i Terry, A. (urednici) (2007): **The Status and Distribution of European Mammals.** Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.

Tvrtković, N. (1979): **Razlikovanje i određivanje morfološki sličnih vrsta podroda *Sylvaemus* Ognjev & Vorobiev 1923 (Rodentia, Mammalia).** Rad JAZU 383 (18), 155-186.

Yoon, M., Jung, S. i Oh, H. (1997): **Population structure and reproductive pattern of the Korean striped field mouse, *Apodemus agrarius***. Korean Journal of Biological Sciences 1 (1), 53-61.

Mrežne stranice:

www.iucnredlist.org, pristupljeno: 08.09.2021.

www.pp-medvednica.hr, pristupljeno: 08.09.2021.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, pristupljeno: 01.02.2022.

<https://geoportal.dgu.hr/>, pristupljeno: 05.02.2022.

<https://eunis.eea.europa.eu/species/11231>, pristupljeno: 06.02.2022.

8. PRILOZI

Prilog 1. Popis svih ulovljenih jedinki roda *Apodemus* s pridruženim podacima i mjerama (sve su mjere izražene u milimetrima). Jedinke kojima je vrsta potvrđena putem molekularnih metoda imaju zadebljani (eng. *bold*) kod, dok vrste koje su determinirane putem morfologije imaju zadebljano ime vrste. BL – dužina tijela, TL – dužina repa, HL – dužina glave, EL – dužina uške, EW – širina uške, HFL – dužina stražnjeg stopala, VL – dužina najduže vibrise.

| KOD | VRSTA | LOKALITET | DATUM | SPOL | BL | TL | HL | EL | EW | HFL | VL |
|-------------|-----------------------------|------------|-------------|------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A002 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija A | 04.07.2020. | F | 85,84 | 92,17 | 29,73 | 13,7 | 10,15 | 20,95 | 29,65 |
| A009 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija A | 21.10.2020. | M | 86,15 | 97,55 | 31,68 | 14,77 | 10,56 | 22,1 | 33,76 |
| A010 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija A | 19.05.2021. | F | 78,17 | 76,59 | 26,34 | 15,07 | 10,51 | 20,74 | 33,36 |
| A011 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija A | 19.05.2021. | M | 94,8 | 103,82 | 35,45 | 17,71 | 10,81 | 24,12 | 40,34 |
| A012 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija A | 19.05.2021. | F | 80,89 | 82,04 | 31,46 | 16,21 | 11,74 | 21,43 | 29,78 |
| A013 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija A | 19.05.2021. | F | 80,98 | 84,74 | 31,53 | 15,75 | 12,02 | 20,28 | 32,3 |
| A017 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija A | 18.06.2021. | M | 89,1 | | 30,82 | 17,17 | 9,99 | 23,21 | 36,55 |
| A018 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija A | 18.06.2021. | M | 84,06 | 97,45 | 31,13 | 14,98 | 11,2 | 22,83 | 36,4 |
| B001 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija B | 31.07.2020. | M | 89,02 | 94,58 | 29,07 | | | 22,61 | 36,98 |
| C001 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija C | 21.08.2020. | J | 65,86 | 86,35 | 27,48 | 14,04 | 11,55 | 22,59 | 30,7 |
| C002 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija C | 21.08.2020. | F | 87 | 101,79 | 29,56 | 17,11 | 9,33 | 24,18 | 33,68 |
| C003 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija C | 16.03.2021. | J | 59,17 | 68,81 | 24,27 | 13,4 | 9,4 | 20,66 | 26,94 |
| C006 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija C | 11.06.2021. | M | 93,35 | 102,62 | 30,3 | 15,46 | 10,88 | 22,81 | 35,15 |
| C007 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija C | 30.06.2021. | F | 93,5 | 97,47 | 32,95 | 14,33 | 11,38 | 21,57 | 34,32 |
| C008 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija C | 30.06.2021. | M | 83,8 | 89,27 | 30,15 | 14,43 | 9,64 | 22,01 | 31,11 |
| C009 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija C | 30.06.2021. | M | 86,16 | 87,2 | 31,59 | 15,97 | 10,75 | 22,89 | 28,34 |
| E003 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija E | 15.06.2021. | F | 80,32 | 98,16 | 28,81 | 16,01 | 11,58 | 22,58 | 36,43 |
| E006 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija E | 30.06.2021. | M | 90,78 | 96,12 | 30,43 | 15,45 | 11,83 | 23,03 | 35,68 |
| E007 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija E | 30.06.2021. | F | 90,98 | 94,87 | 30,8 | 15,32 | 11,94 | 21,04 | 31,69 |
| E008 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija E | 30.06.2021. | F | 83,46 | 95,94 | 30,5 | 13,95 | 10,35 | 21,11 | 35,94 |
| F001 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija F | 23.02.2021. | F | 91,98 | 103,86 | 32,7 | 14,32 | 11,76 | 22,37 | 32,62 |
| F002 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija F | 23.02.2021. | M | 98,45 | 94,42 | 30,82 | 16,75 | 10,89 | 22,61 | 37,45 |
| F003 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija F | 23.02.2021. | M | 96,97 | 92,66 | 32,41 | 15,07 | 12,29 | 23,04 | 36,22 |
| F004 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija F | 23.02.2021. | F | 88,65 | 94,05 | 28,58 | 15,53 | 10,29 | 22,51 | 33,17 |
| F006 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija F | 19.03.2021. | F | 98,29 | 108,96 | 30,78 | 12,72 | 11,27 | 22,56 | 35,15 |
| F008 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija F | 23.04.2021. | M | 104,01 | | 32,34 | 14,47 | 10,64 | 23,18 | 35,7 |
| F011 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija F | 03.06.2021. | F | 71,46 | 92,44 | 26,81 | 15,15 | 10,31 | 22,71 | 30,84 |
| F014 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija F | 03.06.2021. | F | 81,13 | 94,03 | 27,44 | | | 22,29 | 33,1 |
| F015 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija F | 03.06.2021. | F | 81,65 | 91,21 | 29,53 | 13,12 | 11,57 | 22,45 | 26,65 |
| F018 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija F | 03.06.2021. | F | 88,82 | 96,61 | 30,95 | 15,62 | 12,22 | 22,53 | 33,75 |
| G001 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija G | 25.02.2021. | F | 96,44 | 99,5 | 30,05 | 15,05 | 9,69 | 21,84 | 36,6 |
| G004 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija G | 25.02.2021. | M | 95,53 | 91,42 | 27,51 | 15,5 | 9,5 | 21,9 | 38,83 |
| G005 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija G | 25.02.2021. | M | | 84,36 | 29,73 | 16,29 | 10,3 | 21,64 | 32,61 |
| G006 | <i>Apodemus flavicollis</i> | Lokacija G | 25.05.2021. | M | 74,53 | 71,88 | 29,01 | 12,44 | 9,35 | 21,88 | 28,96 |
| G007 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija G | 25.05.2021. | F | 85,92 | 94,95 | 31,21 | 16,45 | 11,13 | 21,98 | 32,97 |
| G008 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija G | 25.05.2021. | F | 86,48 | 94,28 | 30,49 | 16,97 | 11,24 | 22,41 | 31,46 |
| G009 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija G | 25.05.2021. | F | 88,21 | 93,42 | 30,76 | 13,06 | 11,34 | 22,62 | 36,02 |

| | | | | | | | | | | | |
|-------------|---------------------------------|------------|-------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| G012 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija G | 05.06.2021. | M | 85,09 | 96,13 | 29,88 | 14,52 | 11,09 | 23,15 | 34,15 |
| G013 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija G | 05.06.2021. | F | 82,99 | 91,86 | 30,74 | 16,32 | 11,18 | 21,46 | 32,87 |
| G014 | <i>Apodemus flavicollis</i> | Lokacija G | 05.06.2021. | M | 87,93 | 95,01 | 28,3 | 15,08 | 10,25 | 22,45 | 33,65 |
| G015 | <i>Apodemus flavicollis</i> | Lokacija G | 05.06.2021. | F | 94,9 | 93,5 | 31,13 | | | 22,5 | 35,48 |
| H002 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija H | 02.03.2021. | M | 97,61 | 98,4 | 36,34 | 14,99 | 9,62 | 22,74 | 32,75 |
| I001 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija I | 05.03.2021. | M | 95,95 | 97,95 | 32,56 | 15,94 | 11,57 | 21,75 | 36,91 |
| I002 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija I | 05.03.2021. | F | 92,73 | 95,39 | 32,06 | 17,42 | 11,32 | 22,7 | 37,41 |
| I003 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija I | 05.03.2021. | M | 88,29 | 90,29 | 30,68 | 15,76 | 12,05 | 23,4 | 35,01 |
| I004 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija I | 05.03.2021. | F | 94,05 | 96,86 | 32,15 | 16,22 | 11,28 | 22,9 | 35,94 |
| I005 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija I | 11.03.2021. | F | 87,73 | 93,07 | 31,4 | 15,39 | 12,59 | 23,46 | 37,72 |
| I007 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija I | 11.03.2021. | F | 85,28 | 89,58 | 30,89 | 11,84 | 9,95 | 22,4 | 31,72 |
| I008 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija I | 11.03.2021. | J | 54,34 | 60,56 | 23,89 | 12,63 | 9,87 | 20,12 | 23,57 |
| I009 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija I | 11.03.2021. | J | 52,36 | 58,22 | 23,66 | 12,49 | 8,13 | 20,27 | 22,41 |
| I010 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija I | 16.04.2021. | M | 93,95 | 91,46 | 33,77 | 16,61 | 10,62 | 21,38 | 40,21 |
| I011 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija I | 16.04.2021. | F | 87,46 | 96,52 | 32,99 | 15,35 | 11,36 | 23,42 | 35,68 |
| I012 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija I | 16.04.2021. | J | 73,82 | 77,37 | 29,99 | 13,75 | 10,33 | 21,16 | 29,07 |
| I013 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija I | 16.04.2021. | F | 79,75 | 84,53 | 27,03 | 15,68 | 13,01 | 20,99 | 34,38 |
| I014 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija I | 16.04.2021. | F | 75,69 | 78,82 | 29,01 | 14,6 | 10,35 | 20,78 | 30,38 |
| I015 | <i>Apodemus agrarius</i> | Lokacija I | 23.06.2021. | F | 78,55 | 71,35 | 30,95 | | | 18,78 | 22,48 |
| I016 | <i>Apodemus</i> sp. | Lokacija I | 23.06.2021. | F | 74,17 | 81,92 | 29,06 | 11,52 | 8,84 | 20,35 | 32,68 |

9. ŽIVOTOPIS

Dora Čuljak rođena je 31. ožujka 1996. godine u Zagrebu, gdje je odrasla, a gdje živi i danas. Zbog ljubavi i interesa prema životinjama, 2011. godine upisala je Veterinarsku školu u Zagrebu koju je završila 2015. obranivši završni rad u području mikrobiologije (ekperimentalni dio rada odradila je na Hrvatskom veterinarskom institutu u Zagrebu). Kroz školovanje je odrađivala praktičnu nastavu u Zoološkom vrtu grada Zagreba, skloništu za nezbrinute životinje Dumovec te u više veterinarskih ambulanti u Zagrebu. I dalje vođena interesom za životinje, 2015. godine upisuje preddiplomski studij Biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu, na kojem se lagano kreće razvijati zanimanje za područje malih sisavaca. Na 3. godini preddiplomskog studija upisuje kolegij laboratorijske stručne prakse zahvaljujući kojem počinje raditi na inventarizaciji zbirke malih sisavaca profesorice Beatrice Đulić. U toj zbirci radi narednih tri i pol godine te stječe znanja u determinaciji sisavaca iz redova Rodentia i Eulipotyphla (s područja Hrvatske). Preddiplomski studij Biologije završila je 2018. godine, seminarskim radom „Morfološke i ekološke značajke porodice Muridae (Mammalia) u Hrvatskoj“. Iste godine upisuje diplomski studij Ekperimentalne biologije, modul zoologija. Kroz fakultetsko obrazovanje sudjelovala je u dvije izvedbe „Dan i noć na PMF-u“, 2018. godine kao studentska koordinatorica, a 2019. kao izlagač. Kao članica studentske udruge BIUS sudjelovala je na dva istraživačko-edukacijska projekta („Insula Auri 2019.“ s mamaloškom sekcijom i „Žumberak 2020.“ s botaničkom sekcijom), na jednom istraživačkom projektu („Posjetitelji bez ulaznica 2019.“) i na jednom edukacijskom projektu („Mala škola mamalogije u Gorskom Kotaru 2018.“). U suradnji s kolegicom Teom Hutten 2018. godine je dobila Rektorovu nagradu za individualni znanstveni rad „Pojava mužjaka u vijetnamskog paličnjaka, *Medauroidea extradentata* (Brunner von Wattenwyl, 1907) koji se razmnožava partenogenezom“, koji je onda 2019. godine predstavila na Petom simpoziju studenata bioloških usmjerenja - SiSB5.