

Genska raznolikost gujavica (*Oligochaeta*, Annelida) rodova *Octodrilus* Omodeo, 1956 i *Octodriloides* Zicsi, 1986 u Hrvatskoj

De Bona, Dino

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:217:537570>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-04**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Dino De Bona

Genska raznolikost gujavica (Oligochaeta,
Annelida) rodova *Octodrilus* Omodeo, 1956 i
Octodriloides Zicsi, 1986 u Hrvatskoj

Diplomski rad

Zagreb, 2022

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Dino De Bona

Genetic diversity of earthworms (Oligochaeta,
Annelida) genera *Octodrilus* Omodeo, 1956
and *Octodriloides* Zicsi, 1986 in Croatia

Master thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj rad izrađen je na Zoologijskom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Görana Klobučara i na Odjelu za biologiju Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Davorke Hackenberger Kutuzović. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije.

Zahvaljujem se suvoditelju diplomskog rada prof. dr. sc. Goranu Klobučaru na uzorcima, ukazanom povjerenju, strpljenju, podršci i pomoći tijekom izrade diplomskog rada koja mi je na fakultetu puno značila.

Zahvaljujem se voditeljici diplomskog rada prof. dr. sc. Davorki Hackengerger Kutuzović na vodstvu i pomoći pri izradi diplomskog rada, na lijepom iskustvu u laboratoriju u Osijeku i korisnim lekcijama pri determinaciji gujavica.

Zahvaljujem se i svim sakupljačima uzoraka, posebno Romanu Ozimecu na svojoj velikoj zbirci gujavica iz čitave Hrvatske korištene u ovom radu.

Posebno se zahvaljujem kustosu Gradskog muzeja Varaždin dr. sc. Mišelu Jeliću na ogromnoj pomoći i bezbroj upućenih savjeta, ne samo vezano za projekte, laboratorijski rad i analizu rezultata, već i za znanost i život općenito.

Na kraju, ovaj diplomski rad i najveću zahvalu posvećujem svojim roditeljima, majci i ocu, na beskonačnoj podršci i povjerenju, što su mi tijekom najturbulentnijih razdoblja svog studentskog života bili i ostali oslonac, što nisu gubili nadu u uspjeh ni u vremenima kad mi je bilo najteže i kad mi je pomoć bila najpotrebnija.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Genska raznolikost gujavica (Oligochaeta, Annelida) rodova *Octodrilus*

Omodeo, 1956 i *Octodriloides* Zicsi, 1986 u Hrvatskoj

Dino De Bona

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Hrvatska je raznolika vrstama gujavica, a teritorij Hrvatske kao dio Balkanskog poluotoka smatra se jednim od centara divergencije vrsta rodova *Octodrilus* i *Octodriloides*. Dosad je u Hrvatskoj zabilježeno 15 vrsta roda *Octodrilus* i 5 vrsta roda *Octodriloides*. Istraživanje je provedeno u svrhu utvrđivanja genske raznolikosti i raznolikosti vrsta spomenutih rodova DNA barkodiranjem 177 uzoraka s 77 lokaliteta širom Hrvatske. Iz tkiva uzoraka izolirao sam, umnožio i poslao na sekvenciranje sekvence COI regije mtDNA, a upotrebom računalnih programa SEQUENCHER (4.1.4.) i MEGA-X sekvence sam sravnio i obradio. Uz malobrojne, javno dostupne sekvence konstruirao sam filogenetsko stablo prema metodi najveće vjerojatnosti, pomoću kojeg sam izdvojio ukupno 28 linija. Linije sam svrstao u 9 vrsta roda *Octodrilus* i 3 vrste roda *Octodriloides*. 3 linije roda *Octodrilus* zbog specifičnosti u građi ili juvenilnog stadija primjeraka nisu svrstane u opisane vrste. 5 vrsta čini kompleks od najmanje dvije linije sa značajnim genskim udaljenostima. Istraživanje je pokazalo i prednost određivanja vrsta gujavica molekularnim metodama u odnosu na određivanje vrsta prema građi tijela koje je kod gujavica vrlo složeno. Potrebno je provesti istraživanja na daleko većem broju uzoraka kako bi se molekularno-filogenetskim metodama detektirale preostale opisane vrste na području Hrvatske i kako bi se usporedbom s rezultatima ovog istraživanja odredio njihov filogenetski položaj.

(82 stranice, 39 slika, 4 tablice, 85 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: rod *Octodrilus*, rod *Octodriloides*, filogenija, COI, mtDNA

Voditelj: Izv. prof. dr. sc. Davorka Hackenberger Kutuzović

Suvoditelj: Red. prof. dr. sc. Göran Klobučar.

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

2. Dr. sc. Mirela Sertić Perić, doc.

3. Dr. sc. Nenad Judaš, izv. prof.

Rad prihvaćen: 10.02.2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

Genetic diversity of earthworms (Oligochaeta, Annelida) genera *Octodrilus* Omodeo, 1956 and *Octodriloides* Zicsi, 1986 in Croatia

Dino De Bona

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Croatia is diverse with earthworm species and the Croatian territory, as part of Balkan Peninsula, is considered to be one of the divergency centers of genera *Octodrilus* and *Octodriloides*. So far, 15 species of the genera *Octodrilus* and 5 species of the genera *Octodriloides* have been recorded in Croatia. The research was conducted in order to determine the genetic and species diversity of the mentioned genera by DNA barcoding 177 samples from 77 localities throughout Croatia. The COI region from mtDNA was isolated, amplified and sequenced from the sample's tissue. Using the SEQUENCHER (4.1.4) and MEGA-X computer programs, the sequences were aligned and processed and a phylogenetic tree was constructed according to the maximum-likelihood method. A total number of 28 lineages were singled out from a tree and classified to 9 species of the genera *Octodrilus* and 3 species of the genera *Octodriloides*. 3 lineages of the genera *Octodrilus* were not classified to described species due to specificity in structure or juvenile stage of samples. 5 species form a complex of at least two lineages with significant genetic distances. The research also showed the advantage of determining earthworm species by molecular methods instead of determination according to morphology and anatomy, which is very complex. It is necessary to conduct researches on a far larger number of samples in order to detect the remaining described species in Croatia by molecular-phylogenetic methods and to determine their phylogenetic position by comparing them with the results of this research.

(82 pages, 39 figures, 4 tables, 85 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Key words: genera *Octodrilus*, genera *Octodriloides*, phylogenetics, COI, mtDNA

Supervisor 1: Assoc. Prof. dr. sc. Davorka Hackenberger Kutuzović

Supervisor 2: Prof. dr. sc. Göran Klobučar

Reviewers: 1. Dr. Göran Klobučar, Prof.

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

3. Dr. Nenad Judaš, Assoc. Prof

Thesis accepted: 10.02.2022.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Molekularna filogenija	3
1.1.1. Mitohondrijska DNA.....	4
1.1.2. Filogenetsko stablo.....	5
1.1. Ekologija gujavica	9
1.1.1. Epigejne gujavice.....	10
1.1.2. Endogejne gujavice.....	11
1.1.3. Anecične gujavice.....	11
1.2. Biologija, sistematika i filogenija gujavica	12
1.2.1. Koljeno: Annelida (kolutićavci).....	12
1.2.2. Razred: Clitellata (pojasnici).....	13
1.2.3. Podrazred: Oligochaeta (maločetinaši).....	15
1.2.5. Podred Crassiclitellata (=Lumbricina).....	15
1.2.4. Porodica Lumbricidae.....	16
1.3. Identifikacija gujavica	18
1.4. Rodovi <i>Octodrilus</i> i <i>Octodriloides</i>	21
1.4.1. Rod <i>Octodrilus</i> (Omodeo, 1956).....	22
1.4.2. Rod <i>Octodriloides</i> Zicsi, 1986.....	26
1.5. Područje rasprostranjenosti vrsta rodova <i>Octodrilus</i> i <i>Octodriloides</i>	28
1.5.1. Područje rasprostranjenosti vrsta roda <i>Octodrilus</i> u RH i okolnoj regiji.....	28
1.5.2. Područje rasprostranjenosti vrsta roda <i>Octodriloides</i> u RH i okolnoj regiji.....	35
1.5.3. Područje rasprostranjenosti vrsta rodova <i>Octodrilus</i> i <i>Octodriloides</i> koje su potencijalno rasprostranjene Hrvatskoj.....	39
2. Cilj istraživanja	42
3. Materijali i metode	43
3.1. Područja uzorkovanja i determinacija vrste	43
3.2. Izolacija tkiva i DNA iz tkiva primjerka	45
3.3. PCR reakcija	46
3.4. DNA elektroforeza i purifikacija PCR produkata	48

3.5. Analiza sekvenci	50
4. Rezultati	52
4.1. Filogenetska analiza i sistematika gujavica roda <i>Octodrilus</i> u Hrvatskoj	57
4.2. Genska udaljenost izdvojenih linija.....	66
5. Rasprava	68
6. Zaključak	75
7. Literatura:	76

POPIS KRATICA

DNA	deoksiribonukleinska kiselina
RNA	ribonukleinska kiselina
mtDNA	mitohondrijska DNA
rRNA	ribosomska RNA
rDNA	ribosomska DNA
pb	parovi baza
ML	metoda najveće vjerojatnosti (engl. <i>Maximum likelihood</i>)
BA	Bayesian analiza (engl. <i>Bayesian analysis</i>)
COI	podjedinica 1 citokrom <i>c</i> oksidaze
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. <i>Polymerase chain reaction</i>)
dNTP	deoksinukleozid trifosfat
Oc.	<i>Octodrilus</i>
Oi.	<i>Octodriloides</i>
m.s.o.	muški spolni otvor
Loc. typ.	tipsko stanište

1. UVOD

„Može se sumnjati postoje li još puno drugih životinja koje su odigrale tako važnu ulogu u povijesti svijeta, kao ta jednostavno organizirana stvorenja.“

Charles Darwin, 1881

Gujavice (Lumbricidae) su među najraširenijim i najdominantnijim životinjama tla i imaju najveći udio u biomasi beskralješnjaka u tlima umjerenih kopnenih ekosustava (Lavelle i Spain, 2001; Domínguez i sur., 2018). Aristotel i Darwin naglašavali su važnost gujavica u prirodi. Darwin (1881) smatra kako gujavice imaju puno važniju ulogu, nego što bi se isprva pretpostavilo. Smatraju se najvažnijim organizmima tla jer imaju značajan učinak na fizikalna, kemijska i biološka svojstva tla, igraju ključnu ulogu u modifikaciji strukture tla, ubrzavanju raspadanja organskih tvari, prometu hranjivih tvari i ključna su karika u ciklusu ugljika i dušika tla (Lee, 1985; Edwards i Bohlen, 1996). Zbog svoje iznimne ekološke važnosti, gujavice su među najbolje istraženim životinjskim skupinama.

Gujavice su uz pijavice najpoznatija skupina kolutićavaca. Michaelsen (1903) i Černosvitov (1935) smatraju da je za vrijeme posljednjeg ledenog doba prvobitna fauna gujavica bila uništena na područjima prekrivenim ledom. Područje Balkanskog poluotoka, pa tako i teritorij Republike Hrvatske, nije bilo zahvaćeno oledbom, fauna tla je ostala očuvana, a područje je bilo svojevrsni refugij za terestričke organizme, čime je ostvaren visok stupanj bioraznolikosti gujavica (Hewitt, 1999; Halavuk, 2013) i općenito visok udio endemskih vrsta (Stojanović i sur., 2008).

Od objavljivanja Mršičeve (1991) monografije gujavica Balkana do danas provedeno je tek nekoliko istraživanja raznolikosti faune gujavica u Hrvatskoj (Hackenberger K., 2012; Hackenberger K., D. i Hackenberger K., B., 2013). Među 68 dosad opisanih i zabilježenih svojiti porodice Lumbricidae na teritoriju Republike Hrvatske (Hackenberger K., D. i Hackenberger K., B., 2013), mnoge su endemske, posebice vrste rodova *Octodrilus* i *Octodriloides*. Nedavna molekularna istraživanja na europskoj razini dokazuju postojanje kriptičnih vrsta unutar pojedinih rodova, odnosno visoku genetičku varijabilnost među već opisanim vrstama (James i sur., 2010). Molekularno-filogenetska analiza rodova *Lumbricus* i *Aporrectodea* u kontinentalnoj Hrvatskoj pokazala je veliku gensku divergenciju, a prisustvo više linija unutar vrsta ukazuje na postojanje

kriptičnih vrsta (Hodak, 2018). Prema tome, može se pretpostaviti da u Hrvatskoj postoje vrste gujavica koje još nisu opisane.

Većina znanstvenika naglašava važnost pouzdane taksonomije, bez koje su ekološke spoznaje uglavnom beznačajne (Domínguez, 2004). Budući da gujavice imaju značajnu ulogu u ekosustavima koji uključuju tlo, taksonomija i točna identifikacija vrsta neophodna je za većinu ekoloških i ekotoksikoloških istraživanja. DNA barkodiranje je univerzalni sustav za determinaciju biološkog materijala u smislu identifikacije vrste. Metodom DNA barkodiranja mogu se otkriti nove, još neopisane vrste, a izvrsna je metoda otkrivanja bioraznolikosti sitnijih organizama kod kojih postoje morfometrijska ograničenja (Laforest i sur., 2013). Korištenjem BIN registra (BIN – *Barcode Index Number*) (Ratnasingham i sur. 2013) u DNA barkodiranju olakšana je sistematizacija i revizija postojećih taksona te otkrivanje novih linija u genetički raznolikim kompleksima vrsta. Morfološka identifikacija, odnosno identifikacija prema građi tijela gujavica prilično je zahtjevna, pa je analiza sekvenci određenih gena korisno sredstvo za identifikaciju vrsta ne samo odraslih, već i juvenilnih, loše očuvanih i oštećenih primjeraka te njihovih ostataka (Chang i sur., 2009; Porco i sur., 2013). Sekvenca koja se najviše koristi za identifikaciju životinjskih vrsta, tzv. DNA barkodiranje, je fragment gena na mitohondrijskoj DNA (mtDNA) veličine oko 650 pb koji kodira podjedinicu I mitohondrijskog proteina citokrom *c* oksidaze (COI) (Folmer i sur., 1994; Klarica i sur., 2011).

1.1. Molekularna filogenija

Filogenija je grana prirodnih znanosti koja se bavi rekonstrukcijom filogenetskih odnosa među organizmima proučavajući evoluciju pojedinih svojti te određivanjem stupnja međusobne srodnosti pojedinih svojti organizama na temelju taksonomskih karaktera (morfoloških, anatomskih, ekoloških, fizioloških, biogeografskih i paleontoloških). Cilj filogenije je rekonstruirati genealogiju među organizmima i odrediti vrijeme divergencije od vremena kada su dijelili zajedničkog pretka. Pojam „filogenija“ prvi je upotrijebio Ernst Haeckel pokušavajući konstruirati razvojno stablo živoga svijeta. S obzirom da se evolucija tradicionalno temelji na paleontološkim nalazima i komparativnoj morfologiji i anatomiji koje se nisu pokazale kao najpouzdanije metode, istraživanja i utvrđivanja filogenetskih odnosa među taksonima sve više uključuju analize sljedova nukleotida rRNA i DNA molekula. Iako se evolucija i filogenija naizgled čine vrlo slične, među njima postoje značajne razlike. Evolucija proučava zakonitosti koje su zajedničke svim živim bićima, dok filogenija opisuje proces razvoja i podrijetla neke svojte. Molekularna biologija danas je neizostavna u mnogim taksonomskim istraživanjima, stoga važno mjesto u analizi srodstvenih odnosa zauzima grana filogenije tzv. molekularna filogenija koja proučava evolucijsku prošlost i odnose među organizmima na molekularnoj razini (pomoću DNA, RNA i proteina).

Molekularno-filogenetska analiza temelji se na umnožavanju i određivanju redosljeda nukleotida malog dijela DNA ili RNA molekule, te međusobnoj usporedbi tih sekvenci koja na temelju razlika u sljedovima nukleotidnih baza određuje filogenetske hijerarhijske odnose među jedinkama, te u konačnici konstruira filogenetska stabla. Pomoću računalnih programa i dostupnih modela statističke obrade razmatraju se, definiraju i konstruiraju srodstveni odnosi među organizmima. Rezultati dobiveni molekularno-filogenetskim analizama daju hipoteze o evolucijskoj povezanosti taksona, a njihova međusobna divergencija u kontekstu evolucijske stope mutacija može dati vremenski okvir evolucije organizama. Kod filogenetskih analiza DNA se koristi više od proteina, jer DNA pruža više informacija ili signala od proteina. Tihe točkaste mutacije detektiraju se na DNA sekvenci, ali ne i na izgledu proteina zbog degeneriranog genetičkog koda, gdje više kombinacija kodona može kodirati jednu te istu aminokiselinu (Lemey i sur., 2009).

U procesu sekvenciranja koriste se molekularni biljezi ili markeri, odnosno fragmenti kodirajuće ili nekodirajuće DNA, s obzirom da je sekvenciranje čitavog genoma vrlo skup i dugačak proces. Za proučavanje srodstvenih odnosa odabir molekularnog biljega temelji se na njihovoj veličini, konzerviranosti i varijabilnosti. Visoko konzervirani molekularni biljezi, poput histonskih gena, koriste se kod proučavanja filogenetskih odnosa između udaljenih skupina, dok varijabilni biljezi otkrivaju filogenetske odnose bliskih srodnih skupina koje su se nedavno odvojile (Hwang i Kim, 1999). Najčešće se koriste varijabilni biljezi poput mitohondrijske DNA jer se lako izoliraju i mogu se koristiti u detekciji genske varijabilnosti nastale zbog promjena u slijedu nukleotida djelovanjem mutacija (Schulman i sur., 2004). Također, odabir molekularnog biljega ovisi o skupini organizma pa se u zoologijskim istraživanjima najčešće koriste biljezi nuklearne ili mitohondrijske DNA. Mitohondriji se umnožavaju češće od stanica, pa su spontane mutacije, nastale kao greška rada DNA-polimeraze tijekom replikacije mtDNA, učestalije nego kod nuklearne DNA. Npr., molekularno-filogenetske analize gujavica na različitim molekularnim biljezima pokazale su da nuklearna 18S rRNA ima manju stopu mutacija od 28S rRNA, a obje su pak konzervativnije od mitohondrijskih 16S i 12S rRNA biljega, dok geni koji kodiraju mitohondrijske proteinske podjedinice (COI, COII i ND1) imaju najveću stopu mutacija i najveću varijabilnost (Chang, 2011).

1.1.1. Mitohondrijska DNA

Prema teoriji molekularnog sata, Zuckerkandle i Pauling (1965) zaključili su da je “evolucijska stopa konstantna u vremenu za svaku promatranu evolucijsku liniju”. To znači da se mutacijske promjene javljaju uvijek određenom konstantnom brzinom pa se na osnovu kvantifikacije razlika u strukturi određenih proteina može procijeniti kada su se vremenski odvojili. U molekularno-filogenetičkim istraživanjima posebno su korisne mitohondrijska DNA i ribosomska RNA. S obzirom da molekularni sat mitohondrijske DNA “kuca brže“ i nasljeđuje se putem citoplazme, odnosno majčinskom linijom, mtDNA koristi se za proučavanje relativno recentnijih filogenetskih događaja, starosti do 20 milijuna godina.

Mitohondrijska DNA je kružna dvolančana molekula DNA koja se nalazi u matriksu mitohondrija i ima vrlo visoku stopu mutacije, zbog čega je varijabilnost među sekvencama mtDNA veća među različitim vrstama, a manja unutar jedne vrste. Organizmi koji su u

srodstvenom odnosu imaju DNA koja potječe od zajedničkog pretka, što znači da su im geni sličniji od gena organizma u daljem srodstvu. Na temelju analize sljedova nukleotida i određivanja konstante stope mutacije (molekularnog sata), može se dobiti procjena vremena koje je proteklo od odvajanja dva taksona od zajedničkog pretka.

Mitohondrijska DNA koristi se kao molekularni biljeg u filogeniji zbog jednostavne izolacije, velikog broja kopija i vrlo brze evolucije u odnosu na jezgrinu DNA. Predloženo je da DNA barkodiranja budu provedena pomoću mitohondrijskog gena COI (podjedinica I citokrom *c* oksidaze) jer je visoko konzervirana među koljenima što omogućuje jednostavno sravnjivanje sekvenci (Matoničkin i sur., 2010). S druge strane, ribosomska RNA se koristi uglavnom za proučavanje filogenetskih odnosa unutar protista, sporije mutira tijekom vremena te je zbog toga najpouzdanija metoda za istraživanje skupina koje su se razdvojile u daljnjoj evolucijskoj prošlosti.

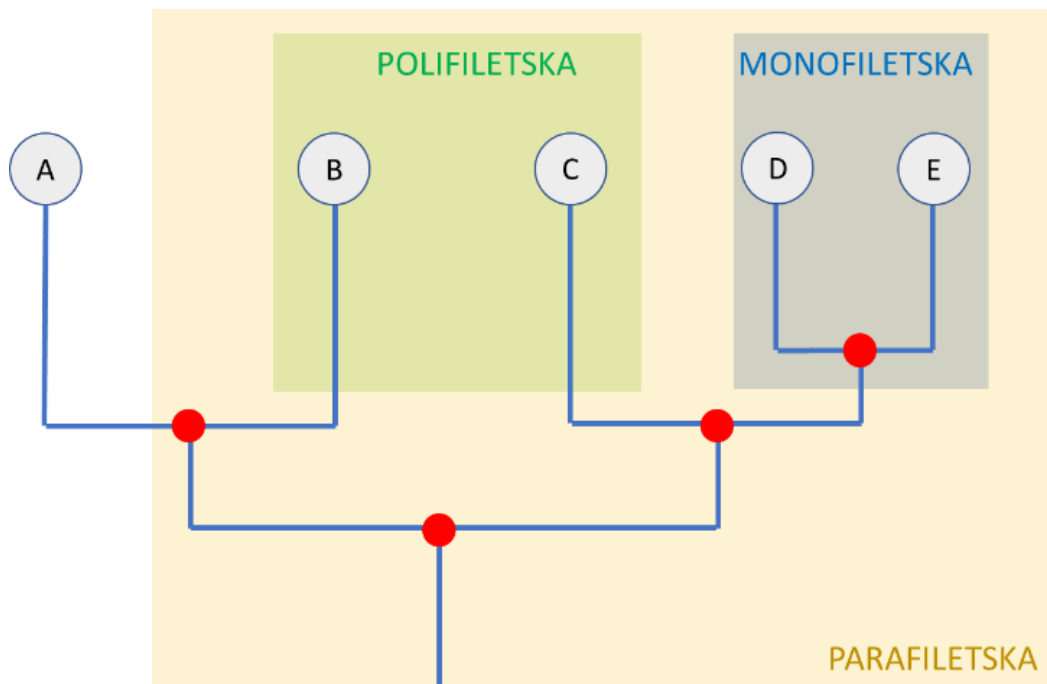
1.1.2. Filogenetsko stablo

Filogenetsko stablo predstavlja model evolucijske povijesti i prikazuje odnose između različitih vrsta i taksona za koje se pretpostavlja da imaju zajedničke pretke. Filogenetska stabla mogu biti ukorijenjena i neukorijenjena. Za ukorjenjivanje stabla koristi se vanjska grupa (engl. *outgroup*) koja nije član analizirane grupe, već može biti sestrinska grupa. Ukorijenjena stabla važna su jer govore o precima, objašnjavaju karakter evolucije te sadrže jedinstveni čvor (korijen) koji predstavlja najstariji dio stabla, odnosno posljednji zajednički predak svih taksonomskih jedinica u stablu.

Kod svakog stabla razlikujemo čvorove koji predstavljaju taksonomske jedinice i ogranke ili grane koje predstavljaju vertikalne odnose među jedinicama (predak-potomak). Čvorovi mogu biti unutarnji (HTU, engl. *Hypothetical Taxonomic Unit*) te predstavljaju hipotetskog pretka čije su karakteristike nepoznate, i krajnji ili vanjski (OTU, engl. *Operational Taxonomical Unit*) koji opisuju taksone čije su karakteristike poznate (slika 1.). Na drugom kraju filogenetskog stabla nalazi se jedan jedinstveni interni čvor koji je predstavlja korijen stabla, odnosno pretka svih OTU-a. Ogranci mogu biti periferni i završavati opisanim skupinama ili unutarnji i predstavljati odnose hipotetskih predaka.

Proučavajući odnose među taksonomskim jedinicama na filogenetskom stablu, taksoni mogu imati monofiletsko, parafiletsko i polifiletsko podrijetlo (slika 1.):

- Monofiletsko podrijetlo imaju taksoni koji potječu od zajedničkog pretka i pripadaju istoj grani ili liniji. Monofiletska skupina obuhvaća i zajedničkog pretka i **sve** njegove potomke. Takva grupa često se u sistematici naziva kladij ili klad (engl. *clade*).
- Polifiletsku grupu čine taksoni koji mogu dijeliti slične osobine, ali ne i isto podrijetlo, odnosno pretka s tim osobinama. Zajedničke osobine najčešće su rezultat konvergentne evolucije.
- Parafiletsku skupinu čine i taksoni i njihovi zajednički preci, ali neki potomci tih predaka uvršteni su u druge skupine.



Slika 1. Prikaz taksona i njihovih odnosa na filogenetskom stablu. Taksoni A, B, C, D, E prikazuju krajnje, vanjske ili OTU čvorove tj. članove poznatih osobina, a crveni unutarnje ili HTU čvorove, tj. pretke.

Stabla se mogu konstruirati na različite načine. U filogramu duljine grana predstavljaju iznos evolucijske divergencije, odnosno govore o trajanju evolucije između taksona. Dulja grana od mjesta račvanja prikazuje veću divergenciju, odnosno više promjena u proučavanoj molekuli

DNA. U kladogramu duljine grana ne govore o broju promjena koje su se dogodile tijekom evolucije, već samo topologiju stabla u kojima je važan samo poredak taksona (Xiong, 2006).

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

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

U izradi filogenetskih stabla odabiru se metode koje mogu biti temeljene na udaljenosti (engl. *Distance methods*) koje uključuju metodu susjednog sparivanja (NJ, engl. *Neighbor joining*) te metode temeljene na karakteru (engl. *character state*) unutar koje su najpoznatije metode najveće štedljivosti (MP, engl. *Maximum parsimony*), metoda najveće vjerojatnosti (ML, engl. *Maximum likelihood*) i Bayesova analiza (BA, engl. *Bayesian analysis*). Metode temeljene na stanju karaktera proučavaju nukleotide ili aminokiseline na određenoj poziciji sravnjene sekvence te uključuju pojavu delecije i insercije (Li, 1997). U filogenetičkim analizama za dobivanje najvjerođostojnijih rezultata danas se najčešće koristi metoda Bayesove analize, metoda najveće vjerojatnosti i metoda najveće štedljivosti.

Metoda najveće vjerojatnosti (ML) smatra se najboljom i najkorisnijom u konstrukciji molekularno-filogenetskog stabla. Izračunava se vjerojatnost pojavljivanja nukleotidnih baza ili aminokiselina u unutarnjim čvorovima. Potom se rekonstruira vjerojatnost strukture stabla iz tih podataka. Kao i MP, ML koristi metodu iscrpnog pretraživanja, tj. izvodi svoje analize na svakom mjestu (poziciji) višestrukog poravnanja. Koristi model stabla za nukleotidne supstitucije i pokušava naći najslučniji stablo (od svih stabala koja se nalaze u bazi podataka). Vrlo je osjetljiva metoda na velikim evolucijskim udaljenostima i vremenski i računalno vrlo zahtjevna (Felsenstein, 1973, 1981). Kod velikih evolucijskih udaljenosti neće dati pouzdane hijerarhijske odnose među taksonima.

Bayesova analiza (BA) je vrlo kvalitetna metoda, ali računalno zahtjevna. Temelji se na spoznaji o naknadnim vjerojatnostima, odnosno vjerojatnostima koje su procijenjene po nekom evolucijskom modelu (npr. modeli HKY, GTR, K2P, F81) (Ronquist i sur., 2011). Prednost ove metode je što algoritam traži grupu najpouzdanijih stabala, a ne samo jedno najbolje stablo (Mau i sur., 1999).

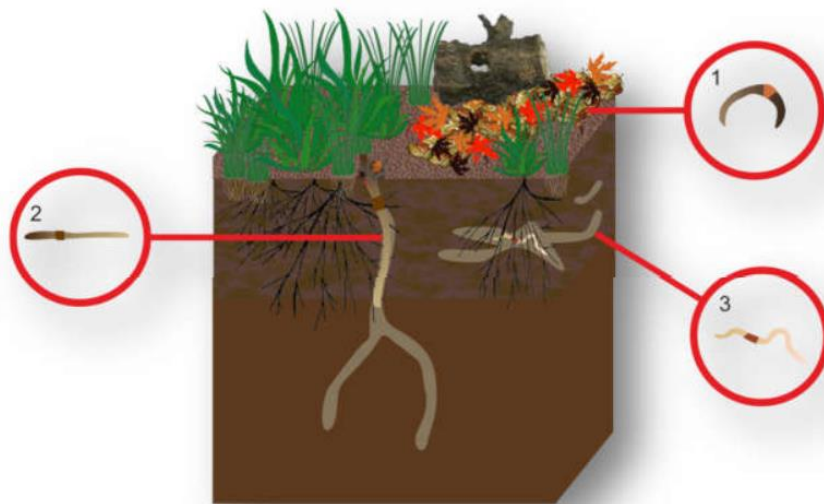
Važno je napomenuti da ne postoji točno stablo, već samo aproksimacije stabala te da nema idealne metode. Pri izradi stabla, nužno je kombinirati različite metode, odabirati i konfigurirati različite parametre te uspoređivati rezultate kako bi se dobilo optimalno i podržano stablo koje će dati najviše pouzdanih informacija o evolucijskim događajima u prošlosti i genealogiji taksona.

1.1. Ekologija gujavica

Gujavice su biomasom dominantni beskralježnjaci tla svugdje na Zemlji. Rijetko ih nalazimo u područjima ekstremnih okolišnih uvjeta, poput područja prekrivenih ledom ili pustinja. Zbog antropogenog djelovanja, gujavice su nastanile gotovo sve ostale dijelove svijeta. Najvažniji čimbenici koji utječu na rasprostranjenost gujavica su vlažnost tla te kvaliteta i količina organske tvari što je u izravnoj vezi s vrstom staništa (Edwards i Bohlen, 1996). Gujavice imaju važnu ulogu u kopnenim ekosustavima, a njihova raznolikost indikator je onečišćenja tla. (Fründ i sur., 2010). Brojnost gujavica u tlu varira ovisno o staništu, od 10 do nekoliko stotina gujavica po kvadratnom metru (Lee, 1985; Halavuk, 2013), a najviše ih ima u tlima koja su bogata organskim tvarima.

Gujavice svojim načinom života i ishranom stvaraju slojeve i povećavaju poroznost tla, zbog čega ih se smatra inženjerima ekosustava (Jouquet i sur., 2006). Ključna su karika u kruženju tvari zbog razgradnje organske tvari uginulih mnogostaničnih organizama. Miješanjem, tj. disperzijom organske tvari u različite slojeve tla povećava se plodnost, a razlaganjem organske tvari nastaju produkti kojima se hrane gljive i bakterije koje obiluju na mjestima gdje su gujavice aktivne. S druge strane, bakterije i gljive odgovorne su za oslobađanje hranjivih tvari koje postanu dostupne biljkama. Također, izmet koje gujavice izbacuju važan je za finu strukturu tla. Najaktivnije su tijekom proljeća i jeseni. Temperaturni ekstremi, kao i nagle promjene temperature i ostalih ekoloških čimbenika im ne odgovaraju, stoga tijekom zime i sušnih razdoblja ljeta mogu smanjiti svoju aktivnost i ući u stadij dijapauze dok se ne uspostave povoljni uvjeti.

Bouché (1977) i Lee (1985) podijelili su gujavice u tri osnovne ekološke kategorije prema načinu života: epigejne, endogejne i anecične (Slika 2.). Osim osnovnih, postoje i potkategorije koje ne upadaju u okvire klasične ekološke klasifikacije (Lavelle, 1988) kao što su gujavice arborealnih staništa ili tzv. kortikolne gujavice, koje se hrane i žive u raspadajućim trupcima stabala.



Slika 2. Tri ekološke kategorije gujavica; 1 – epigejne, 2 – anecične, 3 - endogejne (Hackenberger K. i sur., 2015)

1.1.1. Epigejne gujavice

Epigejne (grč. *epígeios*, „na“ + *gê*, „zemlja“) gujavice žive iznad mineralnog sloja tla, ispod biljnih ostataka ili druge organske tvari. Male su veličine, pigmentirane, brzo se kreću, te imaju kratke životne cikluse. Većinom su tamnijeg obojenja (crvene, ljubičaste ili smeđe). Pod velikim su pritiskom predatora. Nepovoljne okolišne uvjete obično preživljavaju u stadiju kokona. Hrane se lišćem, organskim tvarima i/ili pridruženom mikroflorom te probavljaju malo ili ništa tla. Najpoznatiji predstavnici u Hrvatskoj su vrste roda *Dendrobaena* (npr. *Dendrobaena octaedra* (Savigny, 1826)) i *Bimastos rubidus* (Savigny, 1826) koje se mogu pronaći u šumi ispod ili u trulim trupcima, *Lumbricus castaneus* (Savigny, 1826) koji preferira izmet te *Eisenia andrei* (Bouché, 1972) koja je specijalizirana za staništa s puno organske tvari, npr. kompost.

Epi-endogejne gujavice prebivaju u plitkim vodoravnim hodnicima, netom ispod biljnih ostataka. Srednje su veličine (do 13 cm) i rijetko se uvlače dublje u tlo. Pigmentirane su. Tipičan predstavnik je *Lumbricus rubellus* (Hoffmeister, 1843) koji se često može naći na pašnjacima ispod izmeta.

1.1.2. Endogejne gujavice

Endogejne (grč. *éndon*, „u“ + *gê*, „zemlja“) gujavice kopaju vodoravne hodnike u tlu, najčešće na dubini od 10-20 cm od površine tla. Uglavnom su nepigmentirane, a mogu se činiti tamnijima zbog sadržaja crijeva, ili slabo pigmentirane: ružičaste, sivkaste, bjelkaste. Sporo se gibaju. Mogu biti različitih veličina. Pod niskim su pritiskom predatora, čak i od životinja koje ruju po površini tla. Po dužini života i trajanju životnog ciklusa nalaze se između epigejnih i anecičnih. Kroz sušna razdoblja ulaze u dijapauzu. Geofagne endogejne vrste hrane se česticama tla, koje su obogaćene organskom tvari. Najvažniji predstavnici iz Hrvatske su *Allolobophora chlorotica* (Savigny, 1826), *Aporrectodea caliginosa* (Savigny, 1826), *Aporrectodea rosea* (Savigny, 1826) i *Octolasion lacteum* (Rosa, 1884) i većina pripadnika rodova *Octodrilus* (Omodeo, 1956) i *Octodriloides* (Zicsi, 1986).

1.1.3. Anecične gujavice

Anecične (grč. *anékhō*. „koji dopire do gore“) gujavice žive u trajnim okomitim hodnicima u mineralnom sloju tla, čak do 3 m dubine. Pripadnici ove kategorije su veliki i tamnije pigmentirani na dorzalnoj strani tijela, posebice na anteriornoj. Mogu se brzo uvući u svoje hodnike, ali su općenito relativno spori. Općenito, dugoživuće su vrste s dugim životnim ciklusima. U svojim dubokim hodnicima zaštićeni su od predatora i sušnih razdoblja. Hrane se na površini tla tako da uvlače otpalo lišće i druge biljne ostatke u svoje hodnike, pri čemu probavljaju i nešto tla. Preferiraju lišće bogato dušikom i bez tanina kao što su lipa (*Tilia* sp.), jasen (*Fraxinus* sp.) i javor (*Acer* sp.). Najpoznatiji predstavnici na području Hrvatske su *Lumbricus terrestris* (Linnaeus, 1758) i *Aporrectodea longa* (Ude, 1885).

1.2. Biologija, sistematika i filogenija gujavica

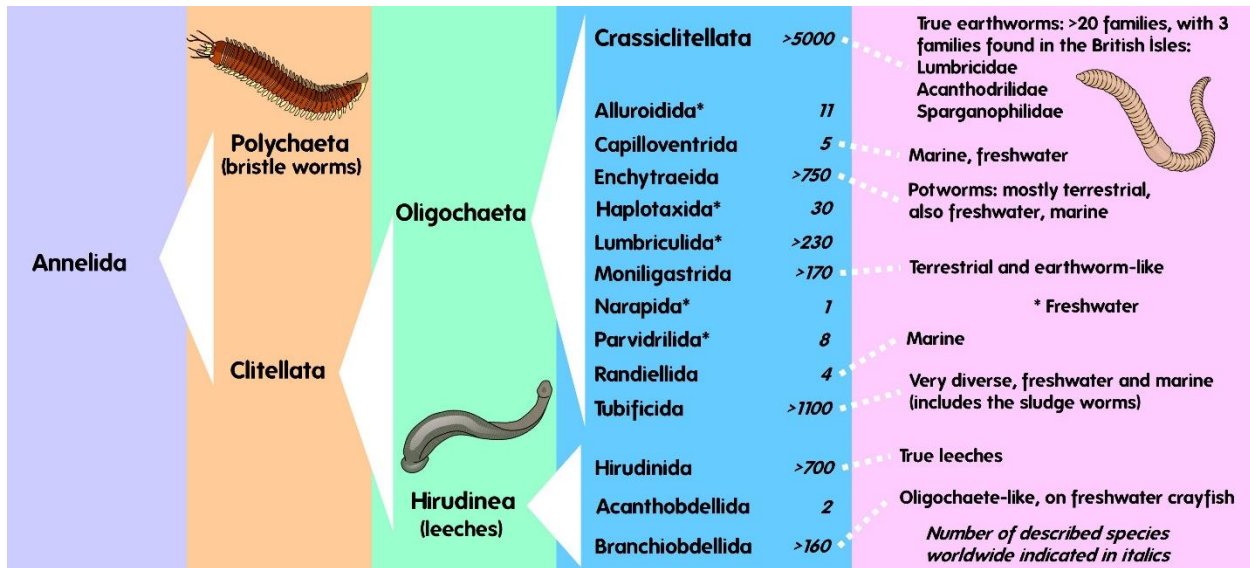
Gujavice pripadaju koljenu Annelida (kolutićavci), potkoljenu Clitellata (pojasnici), razredu Oligochaeta (maločetinaši), redu Haplotaxida (syn. Opisthophora), podredu Lumbricina (syn. Crassiclitellata), natporodici Lumbricoidea (Blakemore, 2007).

1.2.1. Koljeno: Annelida (kolutićavci)

Kolutićavci su bilateralno simetrične, prostomične, triploblastične, shizocelne, kolutićave životinje raširene po cijeloj biosferi. Na kolutićima se mogu nalaziti parapodiji (mногоčetinaši), četine za kretanje (maločetinaši) ili dvije prijanjaljke (pijavice). Na tijelu se razlikuju prostomij ili akron, peristomij – prvi kolutić na kojem su usta, trupni kolutići te analni kolutić ili pigidij. Na površini kolutićavaca se nalazi jednoslojni epiderm koji izlučuje tanku kutikulu. Ispod jednoslojnog epiderma i kutikule nalazi se bazalna lamina i mišićni snopovi od kružnih i uzdužnih mišića koji omogućuju peristaltičke pokrete. Unutar kolutićavog tijela nalazi se razvijeni ljestvičast živčani sustav s cerebralnim ganglijem, zatvoreni optjecajni sustav, celom koji je ispunjen tjelesnom tekućinom koja služi kao potpora organizmu (hidroskelet) i prenosi hranjive tvari i metabolite, organi za izlučivanje (protonefridiji i metanefridiji), koji su kolutićavo raspoređeni pa se još nazivaju i segmentalnim organima, te relativno razvijeni endokrini sustav. Celom iliti sekundarna tjelesna šupljina nastala je puknućem mezoderma, a nalazi se između kožno-mišićnog sloja i probavila. Šireća puknuća formirale su dvije celomske vrećice, po jedna s lijeve i desne strane svakog kolutića, a na mjestima njihovog spajanja nalaze se leđna i trbušna mezentera, unutar koje su se smjestile krvne žile (leđna i trbušna mezentera) i živčana vrpca (trbušna mezentera). Kolutićavost je jednolika, tzv. homonomna metamerija, a između kolutića nalazi se pregrada ili septa. Organi za izlučivanje, pokretanje i disanje ponavljaju se u svakom kolutiću.

Koljeno Annelida čini dva razreda (slika 3.): Polychaeta (mногоčetinaši) koji su najbrojniji vrstama i Clitellata (pojasnici) među kojima su gujavice najbrojnije vrstama. Ukupno Annelida broji oko 14 000 vrsta od kojih su oko 9 000 vrsta mnogočetinaši i oko 5 000 vrsta pojasnici. Koljeno kolutićavaca formirano je prema morfološkim obilježjima svojti poput kolutićavosti, prisutnosti četina i nuhalnih organa, no monofiletsko podrijetlo kolutićavaca molekularno nije

dokazano. Mnogočetinaši uglavnom nastanjuju mora, dok većina pojasnika živi u vodama na kopnu i vlažnim staništima. (Matoničkin i sur., 2010; Rouse i Pleijel, 2006).



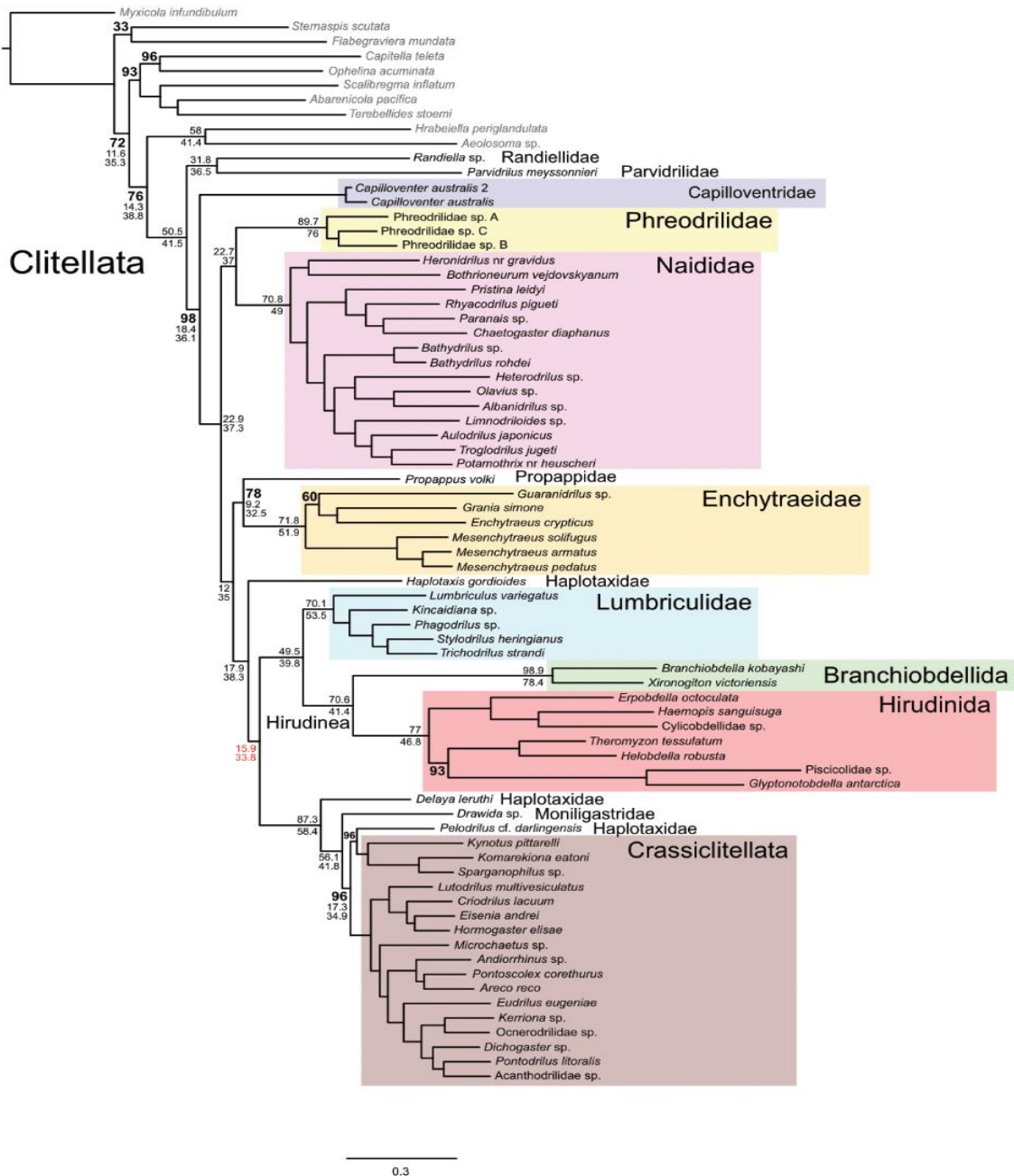
Slika 3. Sistematika kolutićavaca prema Schmelz, R.M. i sur. (2021); Annelid Taxonomy Diagram© Keiron Derek Brown, Rüdiger Schmelz, Emma Sherlock & Dan Asaw, Licensed under a Creative Common By Attribution 4.0 Licence ([CC BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)), <https://www.earthwormsoc.org.uk/index.php/earthworm-biology>

1.2.2. Razred: Clitellata (pojasnici)

Clitellata ili pojasnici nazvani su po latinskom pojmu *clitellum*, što je u prijevodu sedlasta torba ili bisaga, a odnosi se na pojas koji je trajno ili povremeno vidljiv na spolno zrelim jedinkama. Pojas pojasnika obuhvaća nekoliko kolutića uglavnom na anteriornom dijelu tijela s zadebljalom žljezdanom epidermom. Uloga pojasa je izlučivanje sluzi koja pomaže pri kopulaciji i oplodnji te pohranjivanju hranjivih tvari za jajne stanice i izlučivanje kokona u kojem se inkubiraju oplođene jajne stanice i u kojem se odvija embrionalni razvoj jedinki. Pojas je prisutan kod adultnih maločetinaša čitav život, a kod pijavica samo u vrijeme spolne aktivnosti (Matoničkin i sur., 2010)

Slika 4. prikazuje stablo konstruirano filogenomskom analizom u kojoj je utvrđeno monofiletsko podrijetlo pojasnika i najbliži zajednički predak koji je bio slatkovodan i koji je živio tijekom Devona (prije 419-359 milijuna godina). Sve veće skupine pojasnika oformile su se tijekom sljedećih 150 milijuna godina u slatkovodnom staništu ili na kopnu (Erséus i sur., 2020).

Prisustvo kliteluma, specifična organizacija dvospolnog sustava i nedostatak nualnih organa apomorfije su pojasnika koje ih odjeljuju od ostalih pripadnika koljena Anellida. Razred Clitellata sastoji se od dva podrazreda: Oligochaeta (maločetinaši) i Hirudinea (pijavice) (Rouse and Pleijel, 2006).



Slika 4. Filogram najveće vjerojatnosti iz filogenomske analize Clitellata (Erséus i sur., 2020)

1.2.3. Podrazred: Oligochaeta (maločetinaši)

Maločetinaši obuhvaćaju sve terestričke i vodene organizme s prisutnim pojasom (klitelumom) i četiri snopa jednostavnih četina na svakom kolutiću, po dva snopa s lijeve i desne strane tijela, bez jasno vidljive glave, bez parapodija i očiju. Broj, oblik i položaj četina na kolutiću specifičan je kod pojedine skupine. Kod terestričkih maločetinaša četine su kratke i može ih biti do osam po kolutiću, dok su kod vodenih vrsta duže. Za razliku od pijavica, kod maločetinaša prisutna je potpuna vanjska i unutarnja kolutićavost. Ovisno o načinu života maločetinaši se služe peristaltičkim kontrakcijama prilikom plivanja, puzanja i rovanja, pri čemu se dužina tijela skraćuje ili povećava, dok volumen celomske tekućine pojedinog kolutića ostaje stalan. Četine se izvlače pri skraćivanju tijela što omogućuje kretanje prema naprijed (Habdija i sur., 2011). Žive u morskim vodama i vodama na kopnu (npr. rod *Tubifex*), u vlažnoj zemlji gdje prave cjevaste hodnike, a postoji i nešto nametničkih vrsta. Izmjena plinova odvija se preko površine tijela, a mali broj ima škrge u obliku izvrata kože na stražnjem dijelu tijela. Dišni pigment u celomskoj tekućini je hemoglobin pomoću kojeg se prenosi oko 20% kisika. Nakon većih kiša i pljuskova terestričke vrste izlaze na površinu jer u tlu opada koncentracija kisika, dok vodene vrste podnose niske količine kisika (Habdija i sur., 2011).

U filogeniji, „maločetinaši“ je naziv za parafiletsku skupinu pojasnika koji ne pripadaju niti jednoj skupini pijavica tj. niti jednoj skupini podrazreda Hirudinea, koju čine redovi Acanthobdellida, Branchiobdellida, Hirudinida. Na filogenetskom stablu Clitellata dobivenom molekularnom analizom 28S rDNA utvrđeno je da maločetinaši i pijavice nisu dvije monofiletske skupine organizama, jer granjanje skupina Oligochaetae i Hirudinea nije podržano (Rouse i Pleijel, 2006).

1.2.5. Podred Crassiclitellata (=Lumbricina)

Pripadnici skupine Crassiclitellata imaju višeslojni klitelum. Molekularno je potvrđeno monofiletsko podrijetlo Crassiclitellata, pa se smatra da se pojava višeslojnog kliteluma dogodila jedanput u evoluciji maločetinaša (Jamieson i sur., 2002). Dvadesetak porodica gujavica čini podred Crassiclitellata.

1.2.4. Porodica Lumbricidae

Porodica Lumbricidae najpoznatija je i dobro proučena monofiletska porodica maločetinaša. Opisano je oko 670 vrsta unutar 44 roda (Blakemore, 2007).

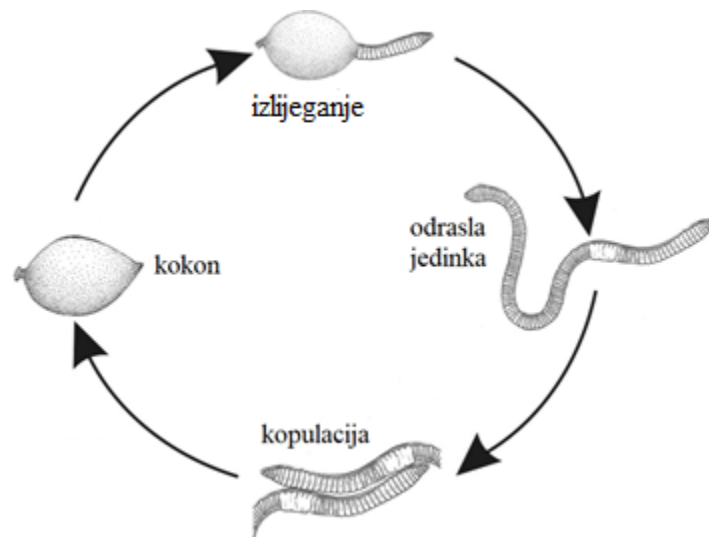
Na površini tijela gujavica nalazi se tanka kutikula koja prekriva epidermalni sloj stanica sa sluznim žljezdanim stanicama. Ispod epidermalnog sloja nalazi se sloj prstenastih i uzdužnih mišića, dok kolutiće odvajaju celomske pregrade ili septe (Matoničkin i sur., 2010). Svaki kolutić sadrži pore koje se nalaze u žljebovima između kolutića te se kroz njih na površinu tijela izlučuje celomska tekućina koja služi podmazivanju tijela ili čak odbijanju predatora (Matoničkin i sur., 2010), kao kod roda *Eisenia* (Kobayashi i sur., 2001).

Živčani sustav je ljestvičav, a sastoji se od cerebralnog ganglija koji je okoždrijelnim prstenom povezan s podždrijelnim ganglijem i trbušnom živčanom vrpcom. Podždrijelni ganglij služi za motoričke i refleksne radnje. Iako im oči nisu razvijene kao kod mnogočetinaša, na leđnoj strani tijela imaju jednostanične fotoreceptore (Matoničkin i sur., 2010), tako da posjeduju određeni stupanj fotosenzibiliteta.

Za izlučivanje koriste metanefridijski sustav u kojem se metanefridiji nalaze na bočnim stranama svakog kolutića. Krvotok je zatvoren i u njemu se razlučuju dvije krvne žile: leđna i trbušna. U svakom kolutiću one su spojene kružnim krvnim žilama. Kružne žile koje imaju mogućnost kontrakcije igraju ulogu srca, pa se još nazivaju lažnim ili bočnim srcima. Bočnih srca obično ima pet parova u organizmu, a smještene su u anteriornom dijelu tijela (Matoničkin i sur., 2010).

Gujavice se hrane detritusom na površini, a organske tvari gutaju dok ruju. Probavilo je jednostavno, započinje ustima koja se nalaze ispod prostomija. Na ždrijelo se nastavlja jednjak koji može posteriorno biti zamijenjen voljom (žljezdani želudac) koja služi za spremanje hrane i/ili mišićnim želucem koji služi za usitnjavanje hrane. Mnoge vrste unutar jednjaka sadrže vapnene žlijezde koje izlučuju kristaliće kalcita. Smatra se da one služe izbacivanju ugljikova(IV) oksida (Habdija i sur., 2011). U prednji dio crijeva izlučuju se enzimi, dok srednje crijevo služi za apsorpciju hranjivih tvari (Bleidorn i sur., 2015). Radi povećanja površine za efikasnijom apsorpcijom hranjivih tvari, uvratom gornje površine crijeva formiran je tiflozolis. Posljednji kolutić je analni kolutić, pigidij (Matoničkin i sur., 2010).

Gujavice su hermafroditi. Rasplodni sustav ograničen im je na nekoliko kolutića u prednjem dijelu tijela gdje se nalaze muški i ženski spolni sustav. Muški i ženski spolni sustav međusobno su odvojeni kako bi se izbjegla samooplodnja. Dva para sjemenika nastavljaju se u sjemene mjehuriće. Iz sjemenih mjehurića pružaju se dva sjemenovoda s po jednim otvorom s lijeve i desne strane, koji je kod većine vrsta porodice Lumbricidae smješten na petnaestom kolutiću. Ženski spolni sustav čini jedan par kratkih jajovoda koji se najčešće otvara na četrnaestom kolutiću, a izvana je teško vidljiv. Sjemeni spremišta (spermateke) primaju spermije od druge jedinke tijekom kopulacije i odvojeni su od jajnika. Životni ciklus gujavice prikazan je na slici 5. Tijekom kopulacije izmjenjuju se spermiji obje jedinke, a ona se odvija u povoljnim uvjetima (Matoničkin i sur., 2010). Nakon kopulacije gujavice svlače kokon s žljezdanog epidermalnog tkiva (pojasa) prema anteriornom dijelu tijela. U kokon se raspoređuju neoplođene jajne stanice koje izlaze iz ženskog spolnog otvora. Kokon s neoplođenim jajnim stanicama zatim dolazi do dijela sa spermatekama, gdje su pohranjeni spermiji druge jedinke. Oplodnja se odvija u kokonu (vanjska oplodnja) kada gujavica izbacuje spermije druge jedinke iz spermateka u kokon s vlastitim neoplođenim jajnim stanicama (Barrett, 1948).



Slika 5. Životni ciklus gujavice (Monroy i sur., 2007)

Većina vrsta i rodova porodice Lumbricidae prirodno su rasprostranjeni u Holarktičkoj regiji. Velik broj vrsta Lumbricidae smatra se peregrinim, što znači da su široko rasprostranjene i na geografski udaljenim lokacijama (Blakemore, 2009). Primjerice, vrste *Lumbricus terrestris* i *Lumbricus rubellus* smatraju se invazivnim vrstama u fauni Nearktisa (Klein i sur., 2019).

Gujavice porodice Lumbricidae obično se koriste kao modelni organizmi u istraživanjima bioraznolikosti, biogeografije i evolucije. Gujavice vrste *Eisenia andrei/fetida* najčešće se koriste kao modelni organizmi u ekotoksikološkim istraživanjima (Lee, 2008). Unatoč njihovom biološkom i ekološkom značaju, taksonomski, evolucijski i hijerarhijski odnosi još su uvijek predmet rasprave nekih rodova i vrsta (Pérez-Losada i sur., 2011).

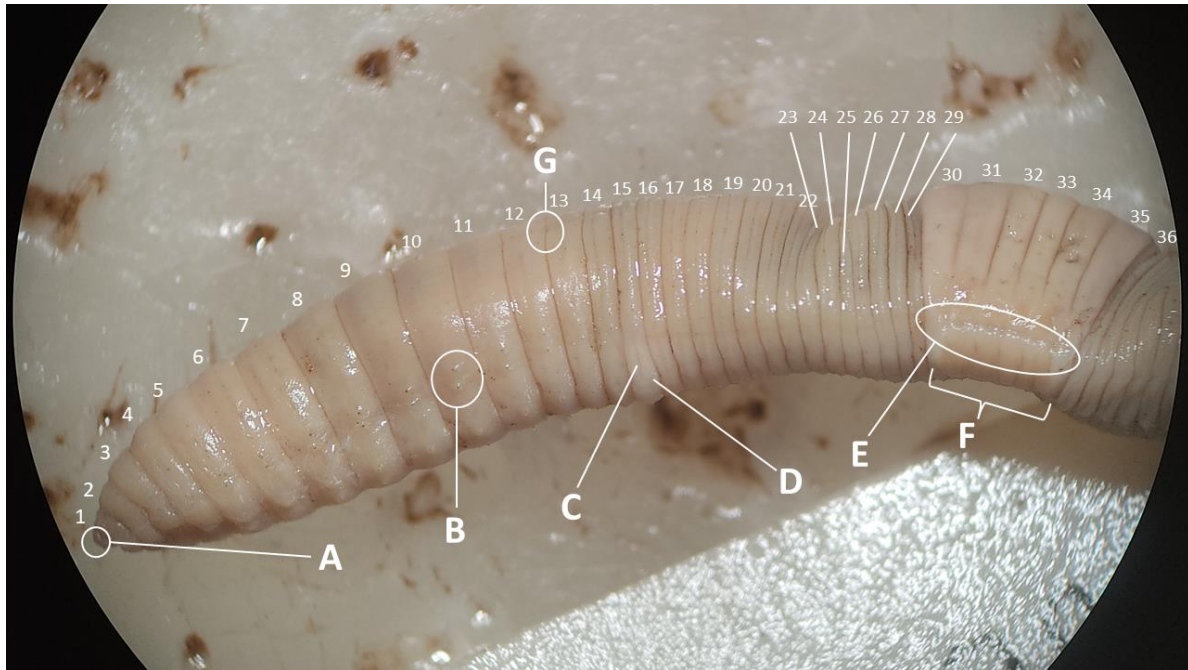
Prema zadnjem popisu iz 2013. godine, u Hrvatskoj je zabilježeno ukupno 68 vrsta gujavica svrstanih u 17 rodova, od kojih su 19 vrsta hrvatski endemi, a 10 regionalni endemi Hrvatske s susjednim zemljama. Najčešće vrste gujavica u Hrvatskoj su *Aporrectodea rosea*, *Octolasion lacteum*, *Lumbricus rubellus*, *Bimastos rubidus* i *Eiseniella tetraedra* (Hackenberger K. i Hackenberger K., 2013).

1.3. Identifikacija gujavica

Identifikacija gujavica temelji se na analizi vanjskih ili morfoloških i unutarnjih ili anatomskih osobina odraslih, spolno zrelih jedinki. Neke morfološke i anatomske osobine gujavica prikazane su na slikama 6 i 7. Međutim, morfološke i anatomske karakteristike varijabilne su kod nekih taksona gujavica i mogu se dogoditi preklapanja, što otežava identifikaciju vrsta (Pérez-Losada i sur., 2009). Mršić (1991) je u prvoj monografiji gujavica za područje Balkana, u kojem je opisan veći broj novih vrsta za znanost, iznio determinacijski ključ te objedinio svoje i dotadašnje morfološke i anatomske osobine za determinaciju vrsta. Za determinaciju vrsta rodova *Octodrilus* i *Octodriloides* Csuzdi i sur. (2018) služili su se još položajem nefridiopora, a Pop (1998) mjestom na kojem završava tiflozolis. Pop (1991) je kao primarnu osobinu u razvrstavanju gujavica roda *Octodrilus* s Karpata po vrstama koristio smještaj stidne izbočine. Najznačajnije osobine implementirane su u digitalnom ključu za određivanje gujavica Hrvatske (ErIK) (Hackenberger K. D. i sur., 2015), a navedene su u tablici 1.

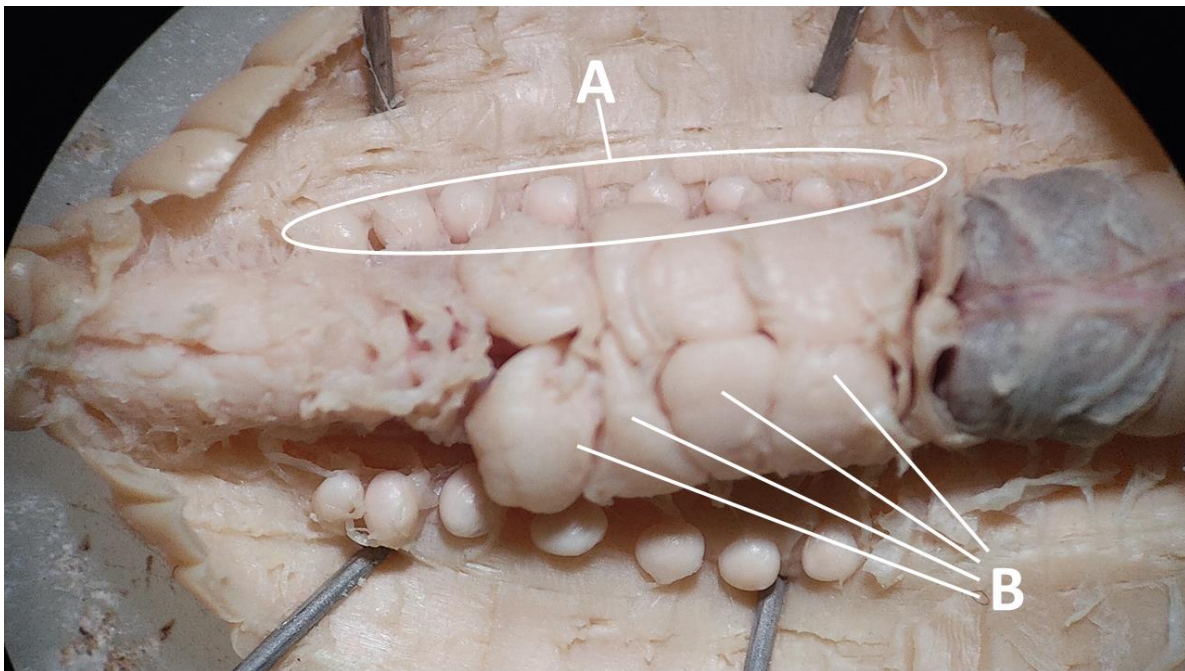
Tablica 1. Morfološke i anatomske osobine gujavica korištene pri određivanju gujavica Hrvatske

Morfološke (vanjske) osobine	Anatomske (unutarnje) osobine
položaj kliteluma	tip longitudinalnih mišića
oblik stidne izbočine	oblik i orijentacija nefridijskih mjehura
položaj stidne izbočine	oblik i položaj vapnenih žlijezda
oblik prostomija	oblik tiflozolis
pigmentacija	tip testikularne vreće
položaj muškog spolnog otvora (m.s.o.)	zadebljanje pregrada
razvijenost žljezdanog atrija oko m.s.o.	broj i veličina sjemenih vrećica
prva leđna pora	broj parova sjemenih spremišta (spermateka)
dužina	položaj otvora sjemenih spremišta (spermateka)
širina	
broj kolutića	
sparenost četina	
žljezdane papile	



Slika 6. Morfološke osobine vrste *Octolasion lacteum* (HREW88-04):

1-36 – kolutiči; A – prostomij; B – (usko sparene) četine; C – muški spolni otvor na 15. kolutiću; D – žljezdani atrij oko m.s.o.; E – stidna izbočina; F – klitelum (pojas); G – leđna (dorzalna) pora



Slika 7. Anatomske osobine vrste *Octodrilus complanatus* (HREW57-1)

A – sjemenne spremište (spermateke); B – sjemenne vrećice

1.4. Rodovi *Octodrilus* i *Octodriloides*

Koljeno ANNELIDA de Lamarck, 1803

Potkoljeno CLITELLATA Michaelsen, 1919

Razred OLIGOCHAETA Grube, 1850

Red HAPLOTAXIDA

Podred CRASSICLITELLATA

Natporodica LUMBRICOIDEA

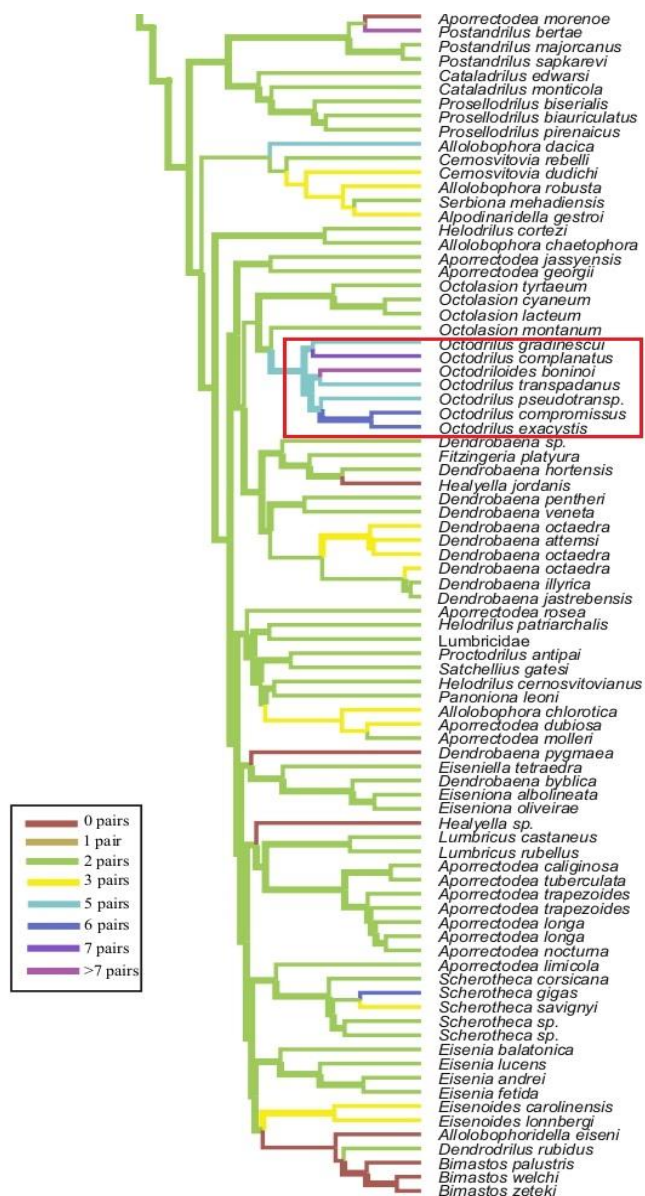
Porodica LUMBRICIDAE Rafinesque-Schmaltz, 1815

Potporodica LUMBRICINAE Rafinesque-Schmaltz, 1815

Rod *Octodrilus* Omodeo, 1956 (sensu Zicsi & Sapkarev, 1982)

Rod *Octodriloides* Zicsi, 1986

Predstavnici rodova *Octodrilus* i *Octodriloides* predstavljaju prilično raznoliku skupinu gujavica. Distinktivni su prema veličini tijela, broju spermateka (slika 8.) i pigmentaciji. Oba roda zajedno čine monofiletsku grupaciju vrsta. Omodeo (1956) razdvojio je rod *Octodrilus* od roda *Octolasion* prvenstveno prema broju parova spermateka, čiji se broj parova kod vrsta roda *Octodrilus* i *Octodriloides* kreće od 5-8. Zicsi (1986) je odvojio rod *Octodriloides* od roda *Octodrilus* prema smještaju muškog spolnog otvora, koji je kod vrsta roda *Octodriloides* varijabilan.

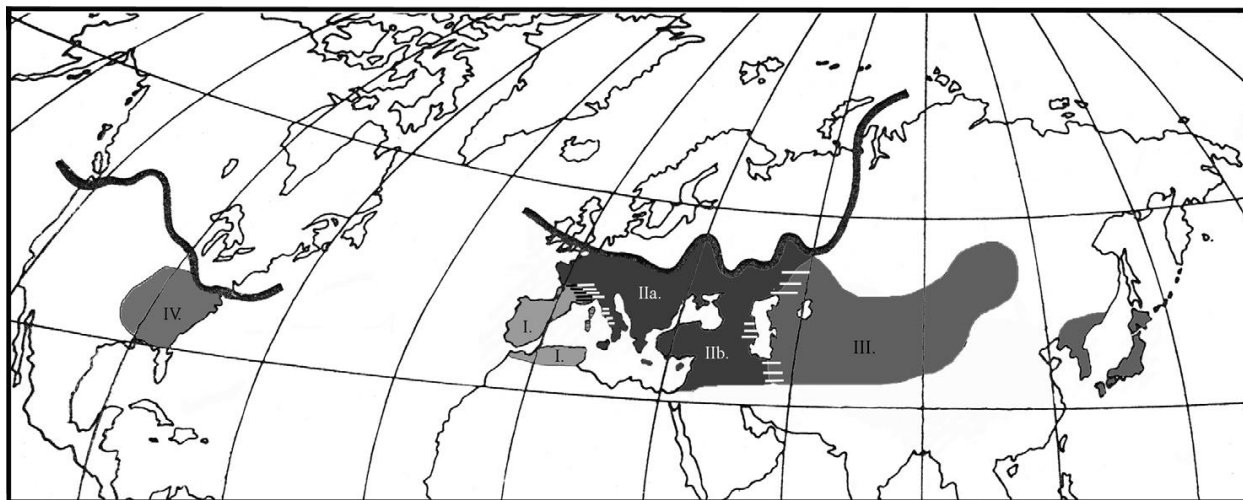


Slika 8. Broj parova sjemenih spremišta za pojedine vrste gujavica porodice Lumbricidae prikazanim u filogenetskom kontekstu (Domínguez, 2015). Skupina *Octodrilus/Octodriloides* označena je crvenim okvirem.

1.4.1. Rod *Octodrilus* (Omodeo, 1956)

Rod *Octodrilus* obuhvaća najmanje 52 vrste (Blakemore, 2007) i mnoštvo podvrsta (Pop, 1991). U Hrvatskoj je zabilježeno 15 vrsta roda *Octodrilus* od kojih se čak sedam vrsta klasificiraju kao hrvatski endemi (Mršić, 1991). Pripadnici roda *Octodrilus* rasprostranjeni su gotovo čitavim Holarktikom, a nastanjeni su u pretežito gorskim područjima. Raznoliki su ponajviše veličinom, pa tako duljina jedinki vrste *Oc. croaticus* iznosi oko 40 mm, dok jedinke vrste *Oc. rucneri* mogu

narasti do gotovo pola metra (500 mm). Mršić (1991) smatra da se evolucija roda *Octodrilus* odvijala u sjeverno-Egejskoj, odnosno u trans-Egejskoj poddomeni (slika 9), koja obuhvaća Alpsko-Balkansko-Karpatsko područje. Na tim područjima upravo je i najveća raznolikost vrsta, pa se područje Balkana uz južne Alpe i Karpatate smatra jednim od tri centara divergencije vrsta roda *Octodrilus* (Csuzdi i sur., 2003). Mali broj vrsta je peregrino rasprostranjeno, poput vrste *Oc. complanatus* koji je distribuiran širom Europe i Sredozemlja i koji je introduciran na teritorij Sjeverne Amerike (Pop, 1998).



Slika 9. Domene rasprostranjenosti endemskih vrsta porodice Lumbricidae. Puna linija označava granicu leda tijekom posljednje oledbe (Wisconsin, Würm oledba); **I** – Francusko-Iberijska domena, **IIa** – Sjevernoegejska poddomena, **IIb** – Južnoegejska poddomena, **III** – Turansko-Dalekoistočna domena, **IV** – Sjevernoamerička domena (Csuzdi i Zicsi, 2003).

Malo je podataka i tek nekoliko ekoloških istraživanja provedeno na vrstama roda *Octodrilus*. Najviše istražena vrsta je *Octodrilus complanatus* (Monroy i sur., 2007), a nekoliko ekoloških istraživanja provedeno je i na nekim endemskim vrstama s Karpata (Pop, 1987, 1997). Pripadnici roda *Octodrilus* obitavaju najčešće na vapnenačkim staništima, čime je uzorkovanje otežano. Neke vrste na površini izbacuju probavljeno tlo tvoreći humke (slika 10.). Životni ciklus endogejne vrste *Octodrilus complanatus* sličniji je anecičnim vrstama kao što je *Lumbricus terrestris*, nego epigejnim vrstama gujavica. Primijećeno je da je inkubacija kokona vrste *Oc. complanatus* nešto duža, valivost juvenila manja nego kod ostalih Lumbricidae, a iz kokona izlazi samo jedna jedinka (Monroy i sur., 2007).



Slika 10. Gujavica vrste *Oc. tergestinus* na humku u Motovunskoj šumi (**lijevo**); humak vrste *Oc. tergestinus* iz Motovunske šume (leg. Roman Ozimec, lipanj 2021.) (**desno**)

Zajedničko svim vrstama roda *Octodrilus* je: široko sparene četine, klitelum i stidna izbočina koji počinju iza 26. kolutića, nefridijski mjehur u obliku okarine (obrnuto J), perasti tip uzdužnih mišića, m.s.o. bez žljezdanog atrija, trakasti oblik stidne izbočine, epiloban oblik prostomija (rijetko proloban i taniloban), m.s.o. na 15. kolutiću (vrlo rijetko se kod nekih pojavi na 16. ili 17., na jednoj ili obje strane gujavice) (Mršić, 1991). U tablici 2. navedene su vrste zabilježene na teritoriju Hrvatske te njihove morfološke i anatomske osobine neophodne za determinaciju vrsta.

Tablica 2. Morfološke i anatomske osobine vrsta roda *Octodrilus* iz Hrvatske, prema Mršić (1991) i Hackenberger i sur. (2015)

Vrsta	Klitelum	Stidna izbočina	1. ledna pora	Dužina/ mm	Broj kolutića	Sjemene vrećice/ br.; polož.	Sjemena spremišta/ br. par.; polož.	Oblik test. vreće	Pigmentacija
<i>Oc. bretscheri</i>	(28-30) – 36	29 – 36	10/11	42 – 71	97 – 117	4; 9-12	6; 5/6 – 10/11	P	crvenkasta
<i>Oc. kvarnerus</i>	29 – 36	29 – 36	7/8	46 – 85	123 – 154	4; 9-12	6; 6/7 – 11/12	P	smeđe-crvena
<i>Oc. croaticus</i>	28 – 35	(28,29) – 35	5/6 – 8/9, 14/15	35 – 45	80 – 144	4; 9-12	6; 5/6 – 10/11	P	crveno-ljubičasta
<i>Oc. lissaensis</i>	(28,29) – (35,36)	(28-30) – 36	7/8, 10/11, 11/12, 12/13	80 – 150	72 – 170	4; 9-12	6; 5/6 – 10/11	P	siva, smeđe-crvena
<i>Oc. pseudolissaensis</i>	(28,29) – 36	(28-30) – 36	12/13, 13/14	82 – 160	99 – 198	4; 9-12	7; 6/7 – 12/13	P	smeđa
<i>Oc. complanatus</i>	(27-30) – 37	(28-30) – (38-41)	11/12, 12/13, 13/14	80 – 270	150 – 251	4; 9-12	7; 6/7 – 12/13	E	smeđe-siva
<i>Oc. istrianus</i>	29 – 42	(29,30) – 42	12/13	240 – 275	178 – 210	4; 9,10,R,12	7; 6/7 – 12/13	E	smeđa
<i>Oc. velebiticus</i>	29 – 39	30 – 39	12/13	80 – 130	173 – 224	4; 9-12	7; 6/7 – 12/13	E	smeđa
<i>Oc. mimus</i>	(28,29) – (38-41)	(28-30) – (40-42)	12/13, 13/14	220 – 232	198 – 271	4; 9-12	6; 6/7 – 11/12 7; 6/7 – 12/13	P	-
<i>Oc. rucneri</i>	28 – 43	28 – 43	12/13	390 – 475	293 – 376	4; 9,10,R,12	8; 5/6 – 12/13	P	smeđa
<i>Oc. slovenicus</i>	(28-30) – 38	(28-30) – 38	-	134 – 300	131 – 325	4; 9-12	5; 6/7 – 10/11	E	smeđa, sivo-smeđa
<i>Oc. tergestinus</i>	(29,30) – (44-46)	30 – (44-46)	-	190 – 330	220 – 299	4; 9-12	7; 6/7 – 12/13	P	sivo-smeđa
<i>Oc. transpadanus</i>	(29-30) – 37	30 – 37	6/7 – 13/14	40 – 450	100 – 252	4; 9-12	5; 6/7 – 10/11	P	tamno-siva, sivo-smeđa
<i>Oc. pseudotranspadanus</i>	(29,30) – 37	(29,30) – 37	11/12, 13/14	52 – 105	88 – 145	2; 10,12	5; 5/6 – 9/10	E	siva, sivo-smeđa
<i>Oc. pseudozirianus</i>	30 – 37	30 – 37	12/13, 13/14	125 – 146	151 -160	4; 9-12 3; 9,10,12	7; 6/7 – 12/13	P/E	-

R – reducirana sjemena vrećica, P – periezofagealna testikularna vreća, E – ezofagealna testikularna vreća

1.4.2. Rod *Octodriloides* Zicsi, 1986

Rod *Octodriloides* čine dimenzijom male gujavice, a pojedine vrste se od roda *Octodrilus* prvenstveno razlikuju po tome što im muški spolni otvor nije smješten na 15., već na nekom drugom kolutiću. Prema Blakemoreu (2007) rod *Octodriloides* broji najmanje 22 vrste, a u popis nije uključeno nekoliko slovenskih endema koje je opisao Mršić (1991). Vrste su prirodno rasprostranjene uglavnom u južnoj, središnjoj i jugoistočnoj Europi, a najveći broj vrsta endema zabilježen je na području Slovenije i Hrvatske. U Hrvatskoj se od ukupno 5 zabilježenih vrsta, čak četiri klasificiraju kao hrvatski endemi (Mršić, 1991).

O biologiji vrsta malo je poznato, a njihova ekologija gotovo je neistražena. Vrste roda *Octodriloides* imaju razdvojenije četine, a stidna izbočina im se kod gotovo svih vrsta produljuje na nekoliko kolutića poslije kliteluma. Vrste se međusobno razlikuju po položaju kliteluma i stidne izbočine, mjestu m.s.o. i broju sjemenih spremišta (tablica 3.).

Tablica 3. Morfološke i anatomske osobine vrsta *Octodriloides* iz Hrvatske, prema Mršić (1991) i Hackenberger i sur. (2015)

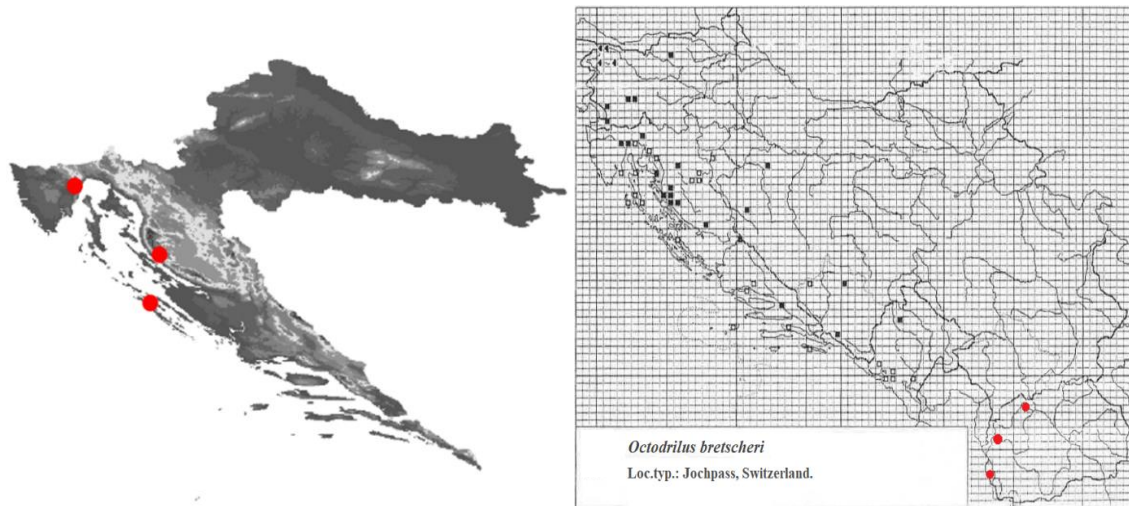
Vrsta	Klitolum	Stidna izbočina	1. ledna pora	Dužina/mm	Broj kolutića	Sjemene vrećice/br.; polož.	Sjemena spremišta/br. par.; polož.	Oblik test. vreće	m.s.o.	Pigmentacija
<i>Oi. bolei</i>	30 – 37	30 – (39,40)	-	42 – 51	100 – 119	4; 9,10,R,12	7; 6/7 – 12/13	P	16-18, 26, 27	bez pigmentacije
<i>Oi. poklonensis</i>	30 – 37	30 – (39,40)	13/14	52 – 102	74 – 174	2; 10,12	6; 6/7 – 11/12	P	16	smeda
<i>Oi. kamnensis</i> (syn. <i>karawankensis</i>)	(29,30) – 37	(29,30) – 39	13/14, 14/15	40 – 82	101 – 160	4; 9-12	7; 6/7 – 12/13	P	16-18, 23, 25, 26	sivkasta
<i>Oi. kovacevici</i>	(28,29) – (35,36)	(28,29) – (37-39)	4/5, 11/12	26 – 36	74 – 104	4; 9-12	8; 6/7 – 13/14	P	27, 28	smeđe-crvena
<i>Oi. janetscheki</i>	(28,29) – 36	(28-30) – 39	4/5, 5/6	38 – 65	119 – 139	4; 9,10,R,12	8; 6/7 – 13/14	P	27, 28	smeđe-crvena

R – reducirana sjemena crećica, P – periezofagealna testikularna vreća

1.5. Područje rasprostranjenosti vrsta rodova *Octodrilus* i *Octodriloides*

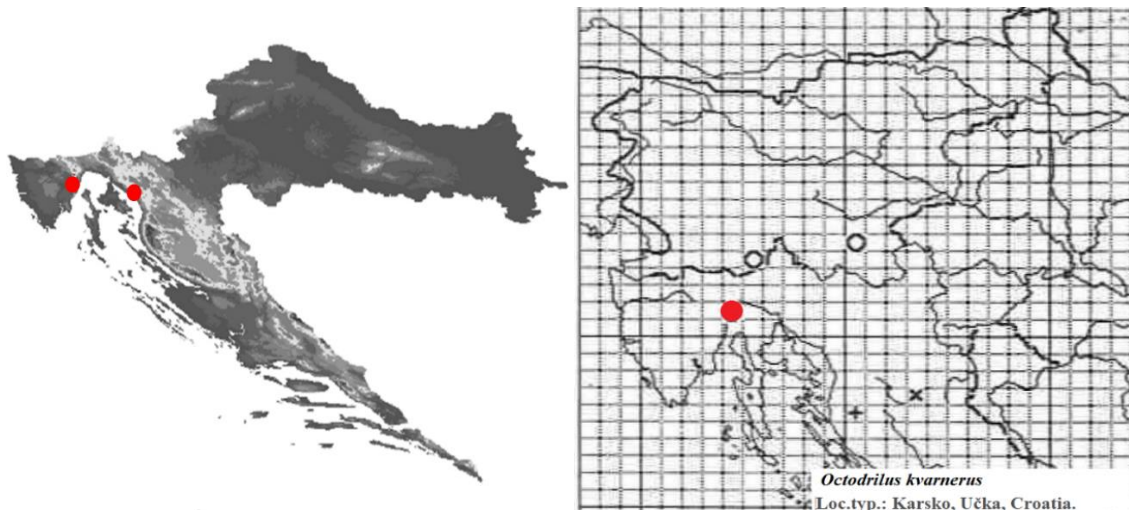
1.5.1. Područje rasprostranjenosti vrsta roda *Octodrilus* u RH i okolnoj regiji

1.5.1.1. *Octodrilus bretscheri* Zicsi, 1969



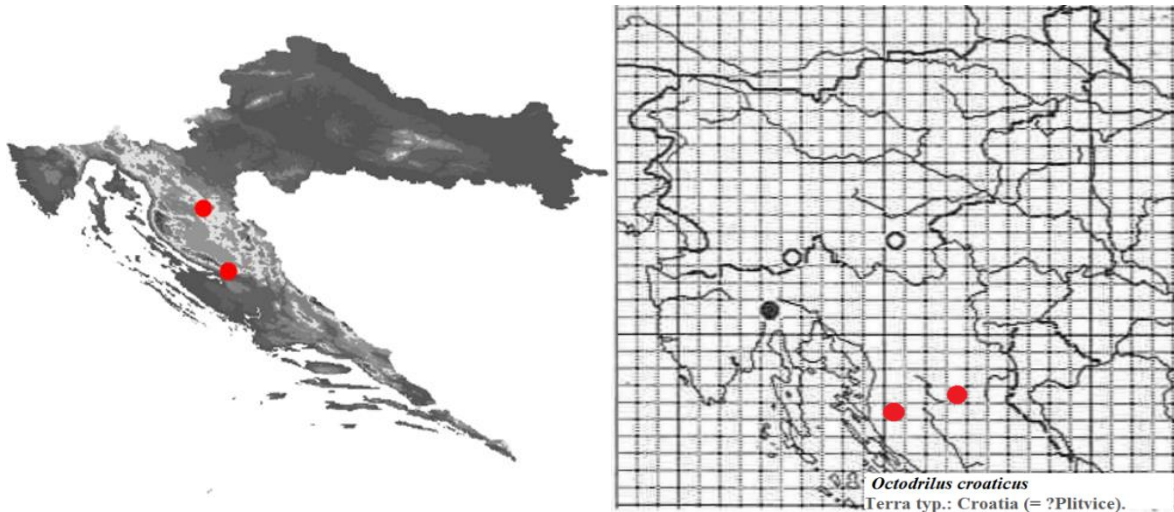
Slika 11. Rasprostranjenost vrste *Oc. bretscheri* u Hrvatskoj, crvene točke označavaju lokacije vrste (lijevo) (Hackenberger K. i sur., 2015) i regionalna rasprostranjenost vrste, crvene točke označavaju kvadrante na kojima je zabilježena vrsta (desno) (Mršić, 1991).

1.5.1.2. *Octodrilus kvarnerus* Mršić, 1987



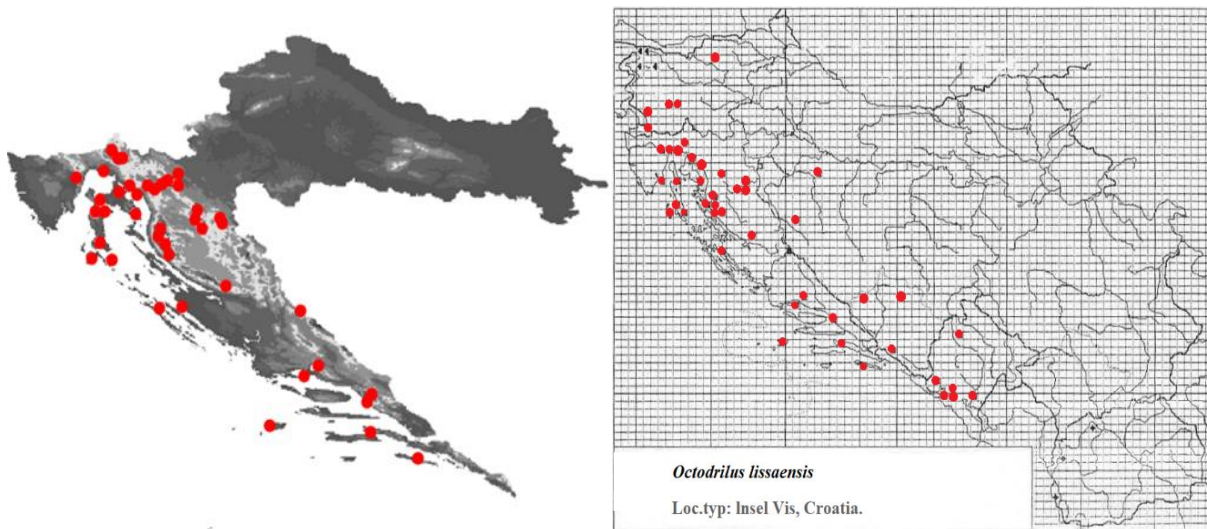
Slika 12. Rasprostranjenost vrste *Oc. kvarnerus* u Hrvatskoj, crvene točke označavaju lokacije vrste (lijevo) (Hackenberger K. i sur., 2015) i regionalna rasprostranjenost vrste, crvene točke označavaju kvadrante na kojima je zabilježena vrsta (desno) (Mršić, 1991).

1.5.1.3. *Octodrilus croaticus* Rosa, 1895



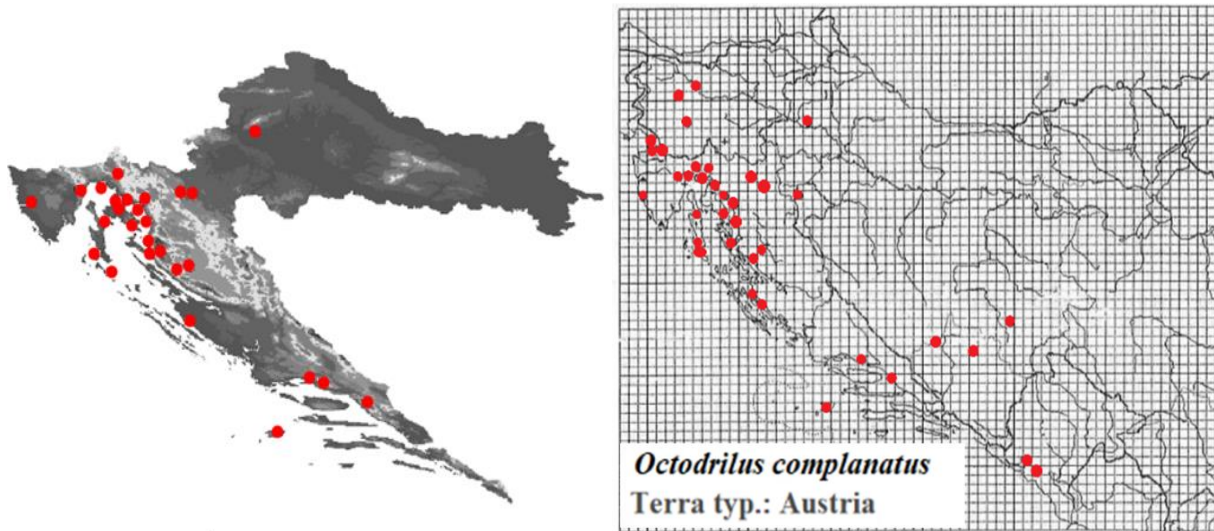
Slika 13. Rasprostranjenost vrste *Oc. croaticus* u Hrvatskoj, crvene točke označavaju lokacije vrste (lijevo) (Hackenberger K. i sur., 2015) i regionalna rasprostranjenost vrste, crvene točke označavaju kvadrante na kojima je zabilježena vrsta (desno) (Mršić, 1991).

1.5.1.4. *Octodrilus lissaensis* Michaelsen, 1891



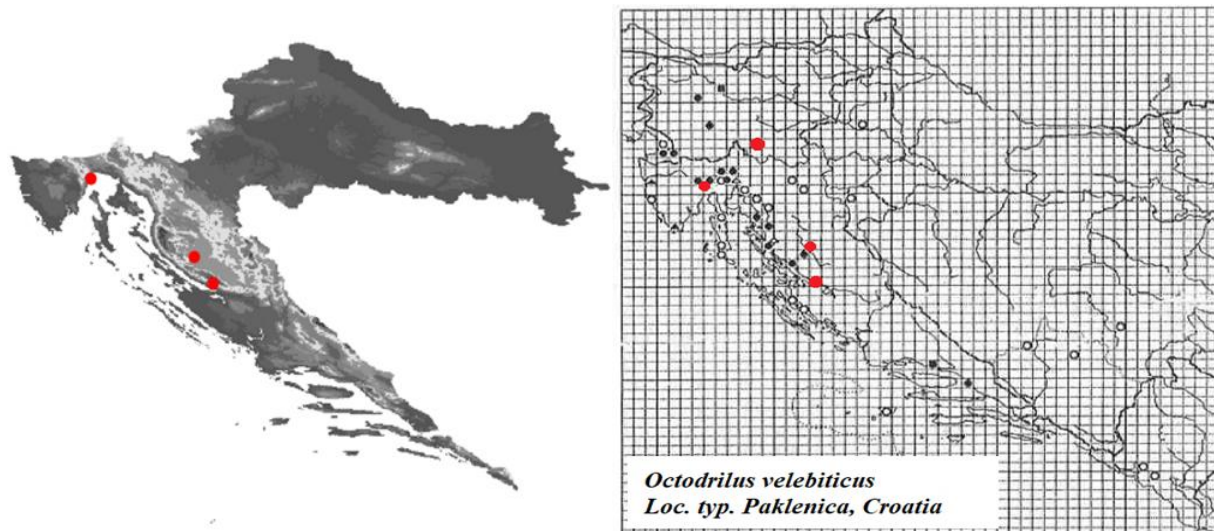
Slika 14. Rasprostranjenost vrste *Oc. lissaensis* u Hrvatskoj, crvene točke označavaju lokacije vrste (lijevo) (Hackenberger K. i sur., 2015) i regionalna rasprostranjenost vrste, crvene točke označavaju kvadrante na kojima je zabilježena vrsta (desno) (Mršić, 1991).

1.5.1.5. *Octodrilus complanatus* Duges, 1828



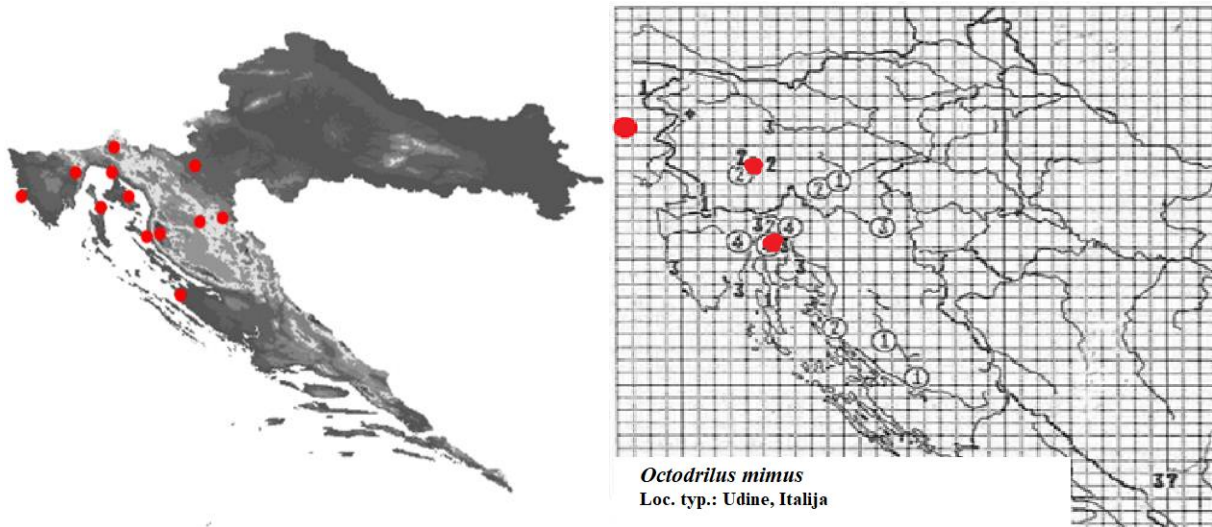
Slika 15. Rasprostranjenost vrste *Oc. complanatus* u Hrvatskoj, crvene točke označavaju lokacije vrste (lijevo) (Hackenberger K. i sur., 2015) i regionalna rasprostranjenost vrste, crvene točke označavaju kvadrante na kojima je zabilježena vrsta (desno) (Mršić, 1991).

1.5.1.6. *Octodrilus velebiticus* Mršić, 1991



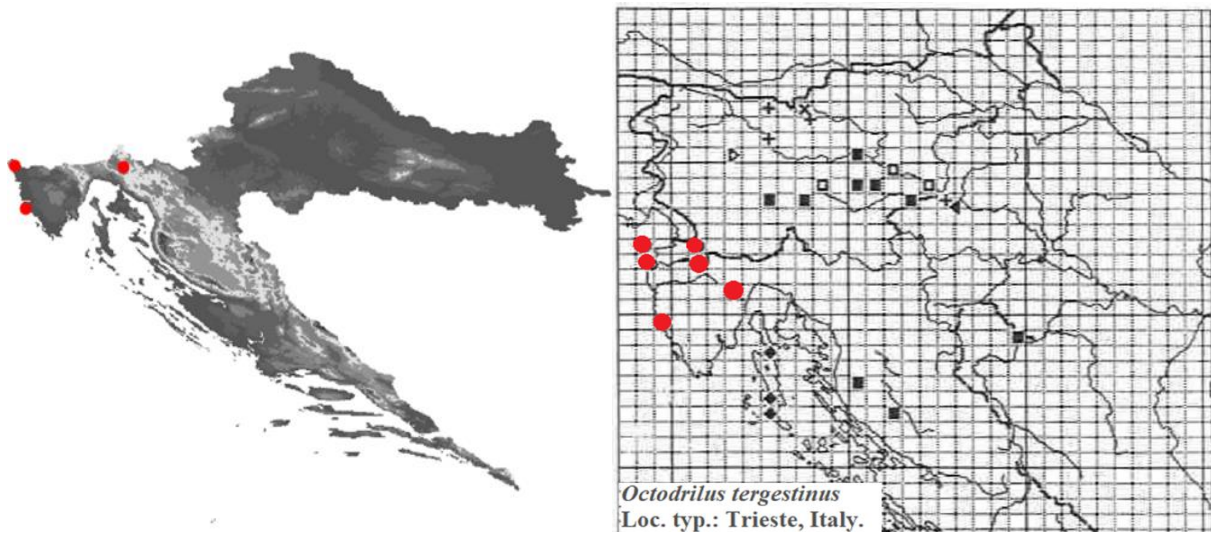
Slika 16. Rasprostranjenost vrste *Oc. velebiticus* u Hrvatskoj, crvene točke označavaju lokacije vrste (lijevo) (Hackenberger K. i sur., 2015) i regionalna rasprostranjenost vrste, crvene točke označavaju kvadrante na kojima je zabilježena vrsta (desno) (Mršić, 1991).

1.5.1.7. *Octodrilus mimus* Rosa, 1896



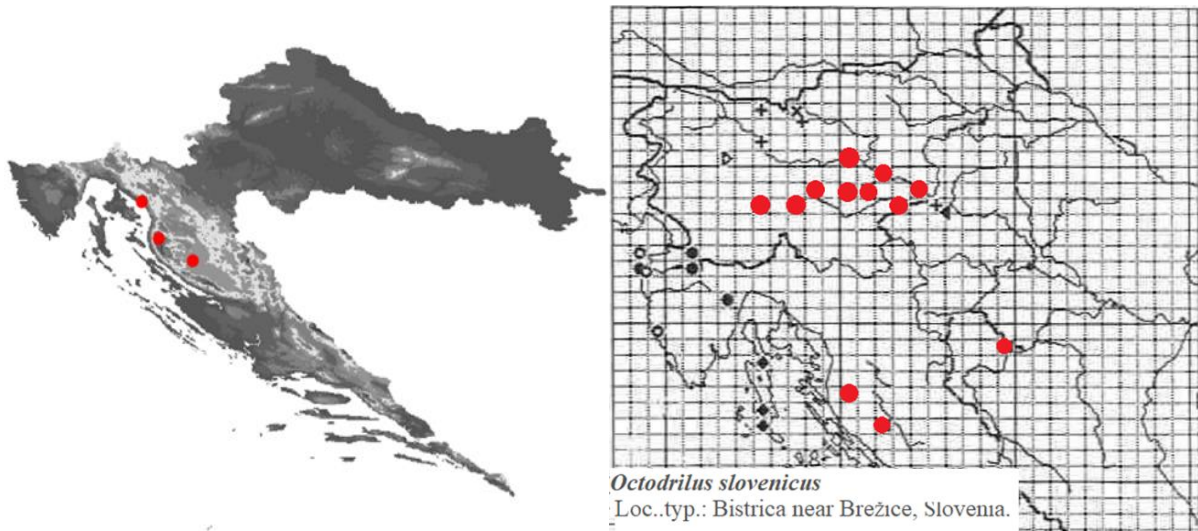
Slika 17. Rasprostranjenost vrste *Oc. mimus* u Hrvatskoj, crvene točke označavaju lokacije vrste (lijevo) (Hackenberger K. i sur., 2015) i regionalna rasprostranjenost vrste, crvene točke označavaju kvadrante na kojima je zabilježena vrsta (desno) (Mršić, 1991).

1.5.1.8. *Octodrilus tergestinus* Michaelsen, 1910



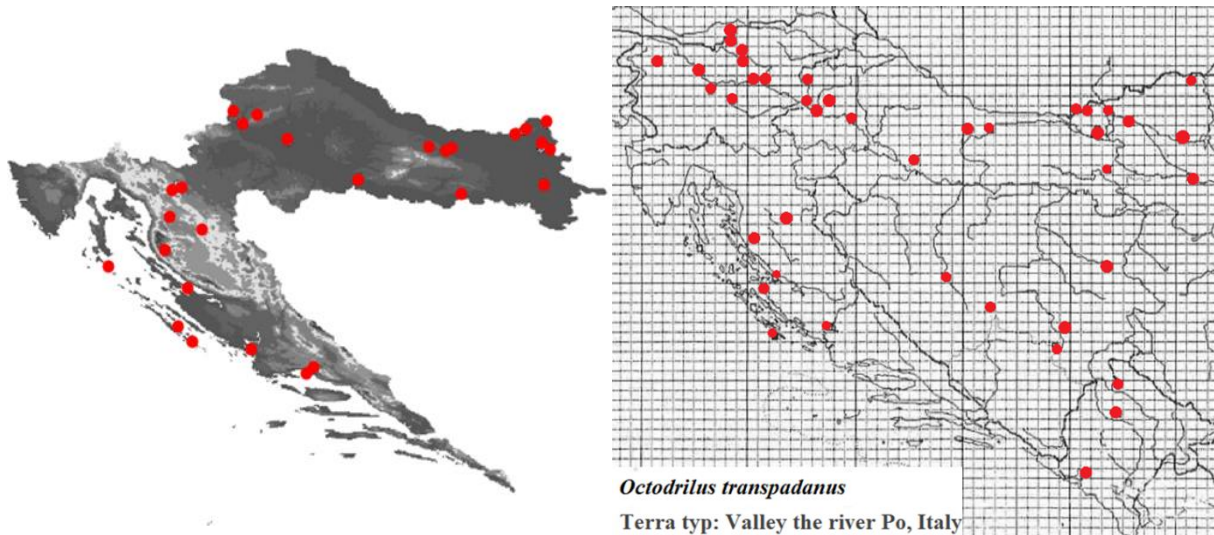
Slika 18. Rasprostranjenost vrste *Oc. tergestinus* u Hrvatskoj, crvene točke označavaju lokacije vrste (lijevo) (Hackenberger K. i sur., 2015) i regionalna rasprostranjenost vrste, crvene točke označavaju kvadrante na kojima je zabilježena vrsta (desno) (Mršić, 1991).

1.5.1.9. *Octodrilus slovenicus* Karaman, 1972



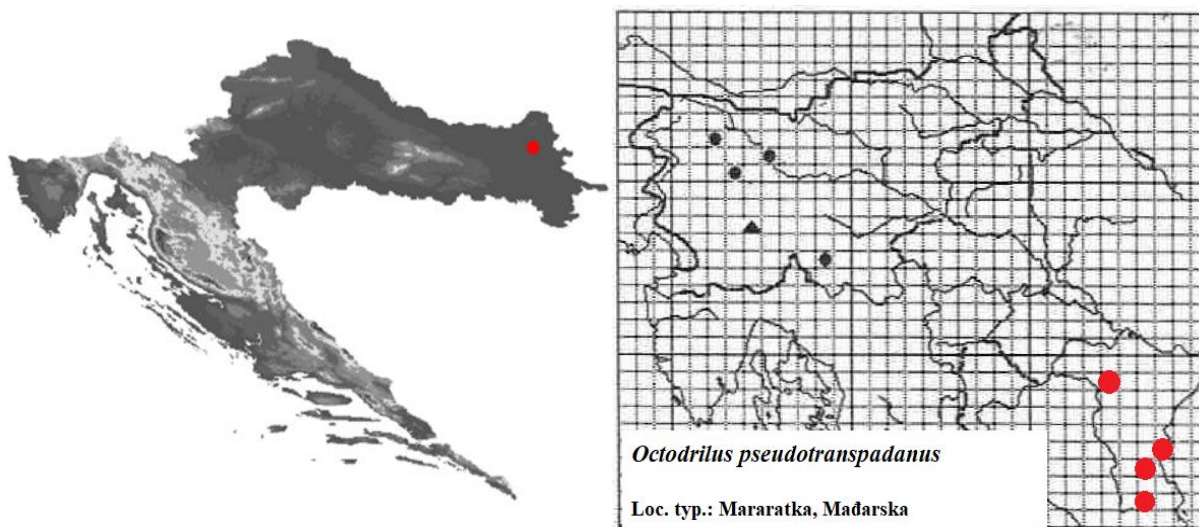
Slika 19. Rasprostranjenost vrste *Oc. slovenicus* u Hrvatskoj, crvene točke označavaju lokacije vrste (lijevo) (Hackenberger K. i sur., 2015) i regionalna rasprostranjenost vrste, crvene točke označavaju kvadrante na kojima je zabilježena vrsta (desno) (Mršić, 1991).

1.5.1.10. *Octodrilus transpadanus* Rosa, 1884



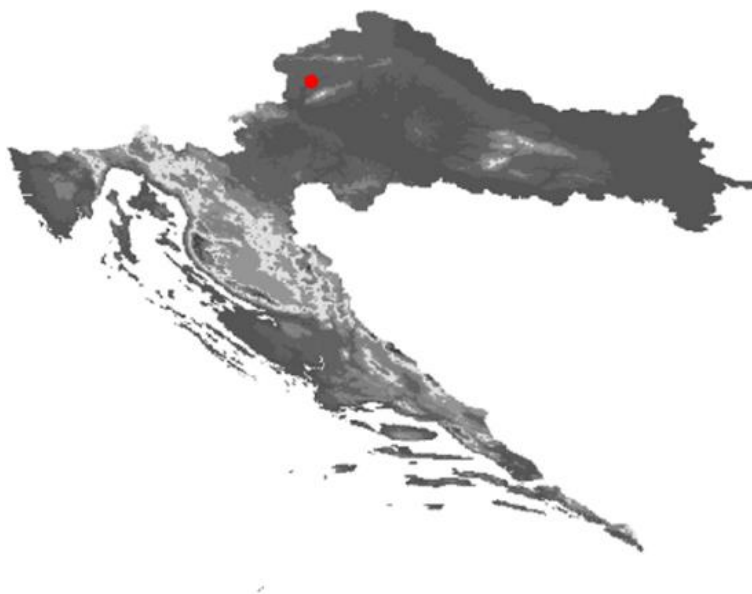
Slika 20. Rasprostranjenost vrste *Oc. transpadanus* u Hrvatskoj, crvene točke označavaju lokacije vrste (lijevo) (Hackenberger K. i sur., 2015) i regionalna rasprostranjenost vrste, crvene točke označavaju kvadrante na kojima je zabilježena vrsta (desno) (Mršić, 1991).

1.5.1.11. *Octodrilus pseudotranspadanus* Zicsi, 1971



Slika 21. Rasprostranjenost vrste *Oc. pseudotrasnpadanus* u Hrvatskoj, crvene točke označavaju lokacije vrste (lijevo) (Hackenberger K. i sur., 2015) i regionalna rasprostranjenost vrste, crvene točke označavaju kvadrante na kojima je zabilježena vrsta (desno) (Mršić, 1991).

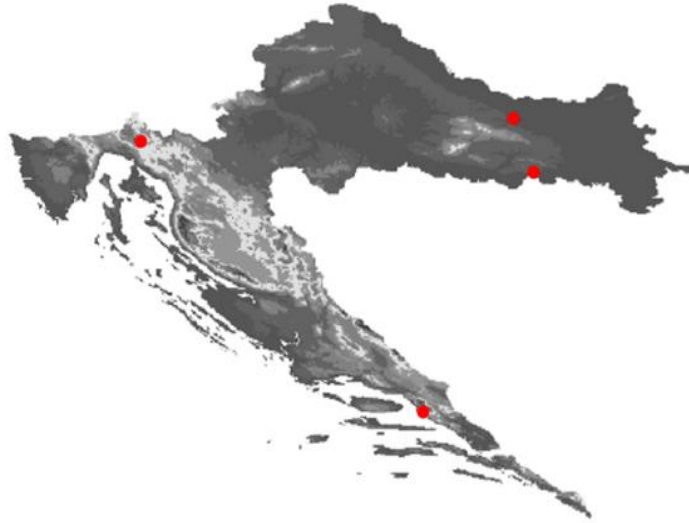
1.5.1.12. *Octodrilus pseudozirianus* Mršić, 1991



Slika 22. Geografska rasprostranjenost vrste *Oc. pseudozirianus* u Hrvatskoj (Hackenberger K. i sur., 2015). Crvene točke označavaju lokacije na kojima je zabilježena ova vrsta.

Loc. typ.: Mokrice, Hrvatska (Mršić, 1991)

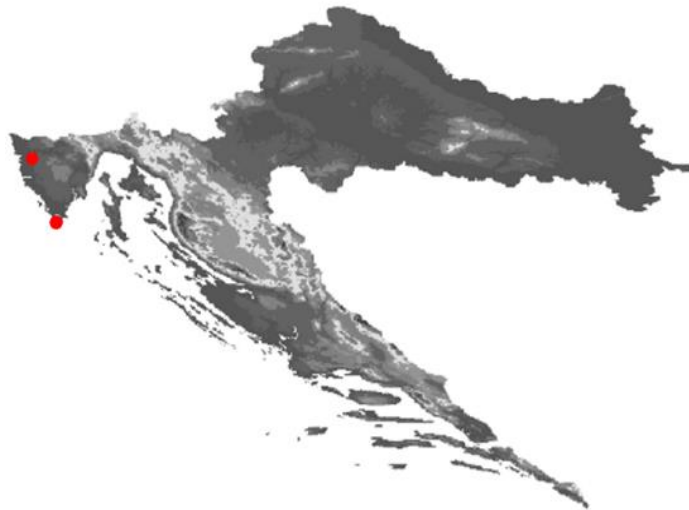
1.5.1.13. *Octodrilus pseudolissaensis* Mršić, 1991



Slika 23. Geografska rasprostranjenost vrste *Oc. pseudolissaensis* u Hrvatskoj (Hackenberger K. i sur., 2015). Crvene točke označavaju lokacije na kojima je zabilježena ova vrsta.

Loc. typ.: Risnjak, Hrvatska (Mršić, 1991)

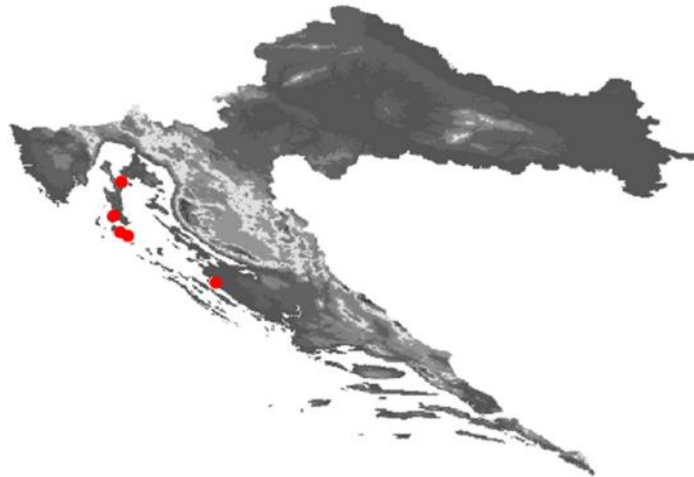
1.5.1.14. *Octodrilus istrianus* Mršić, 1991



Slika 24. Geografska rasprostranjenost vrste *Oc. istrianus* u Hrvatskoj (Hackenberger K. i sur., 2015). Crvene točke označavaju lokacije na kojima je zabilježena ova vrsta.

Loc. typ.: rt Kamenjak, Istra, Hrvatska (Mršić, 1991)

1.5.1.15. *Octodrilus rucneri* Plisko & Zicsi, 1970

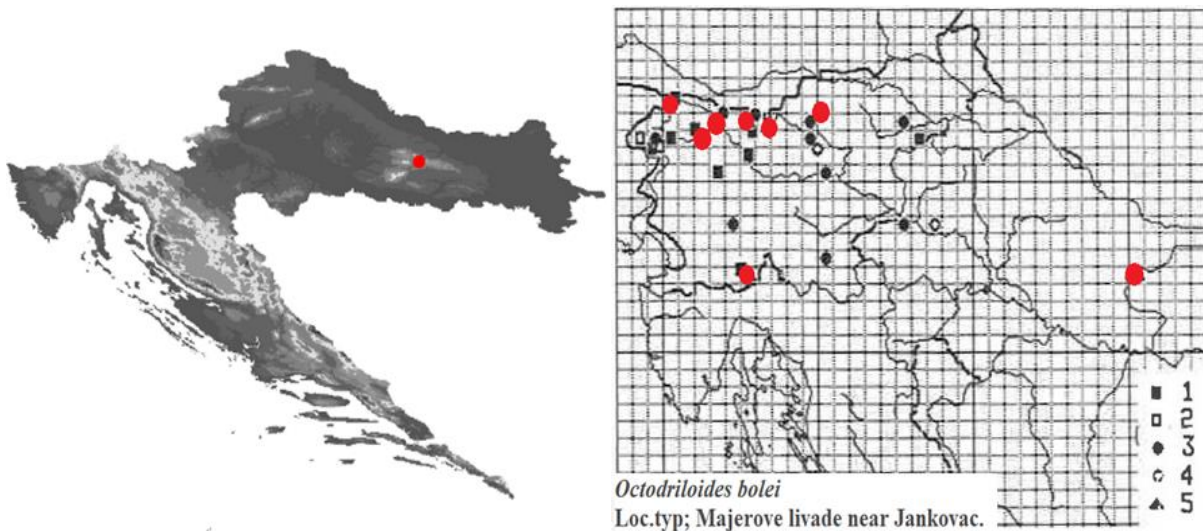


Slika 25. Geografska rasprostranjenost vrste *Oc. rucneri* u Hrvatskoj (Hackenberger K. i sur., 2015). Crvene točke označavaju lokacije na kojima je zabilježena ova vrsta.

Locus typicus: Merag, otok Cres, Hrvatska (Mršić, 1991)

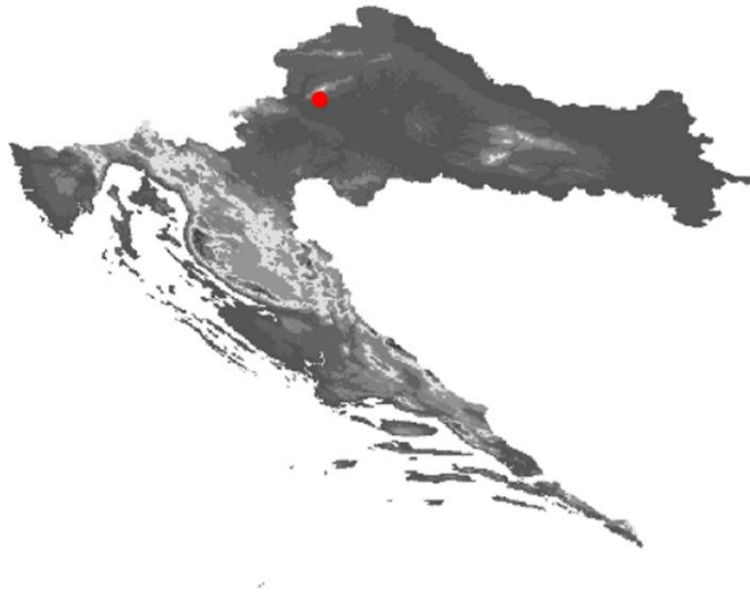
1.5.2. Područje rasprostranjenosti vrsta roda *Octodriloides* u RH i okolnoj regiji

1.5.2.1. *Octodriloides bolei* Mršić, 1987

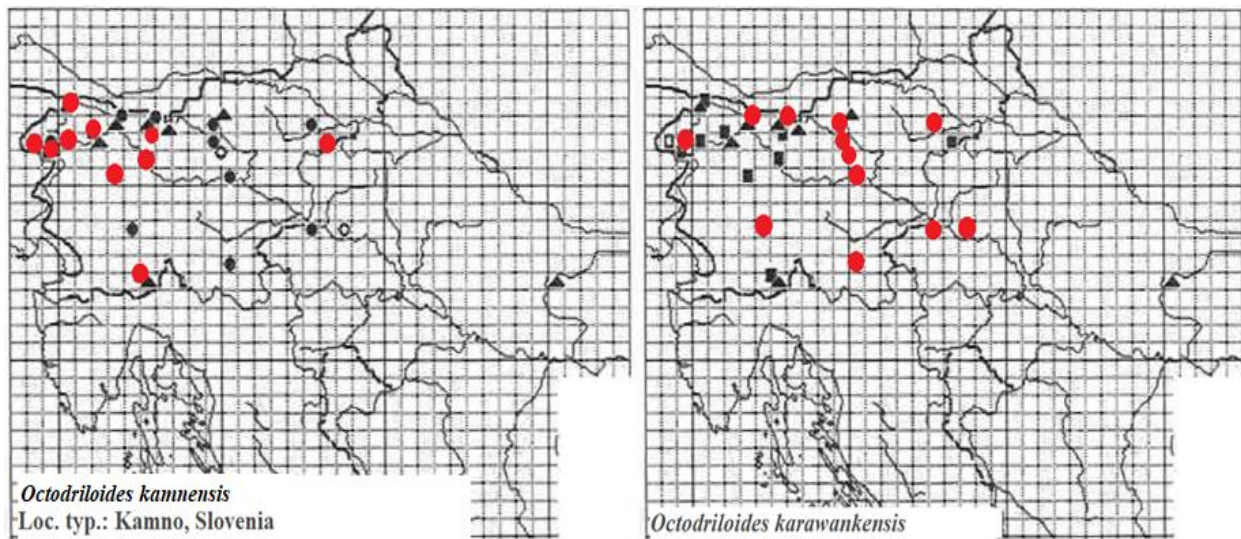


Slika 26. Rasprostranjenost vrste *Oi. bolei* u Hrvatskoj, crvene točke označavaju lokacije vrste (lijevo) (Hackenberger K. i sur., 2015) i regionalna rasprostranjenost vrste, crvene točke označavaju kvadrante na kojima je zabilježena vrsta (desno) (Mršić, 1991).

1.5.2.2. *Octodriloides kamnensis* Baldasseroni, 1919

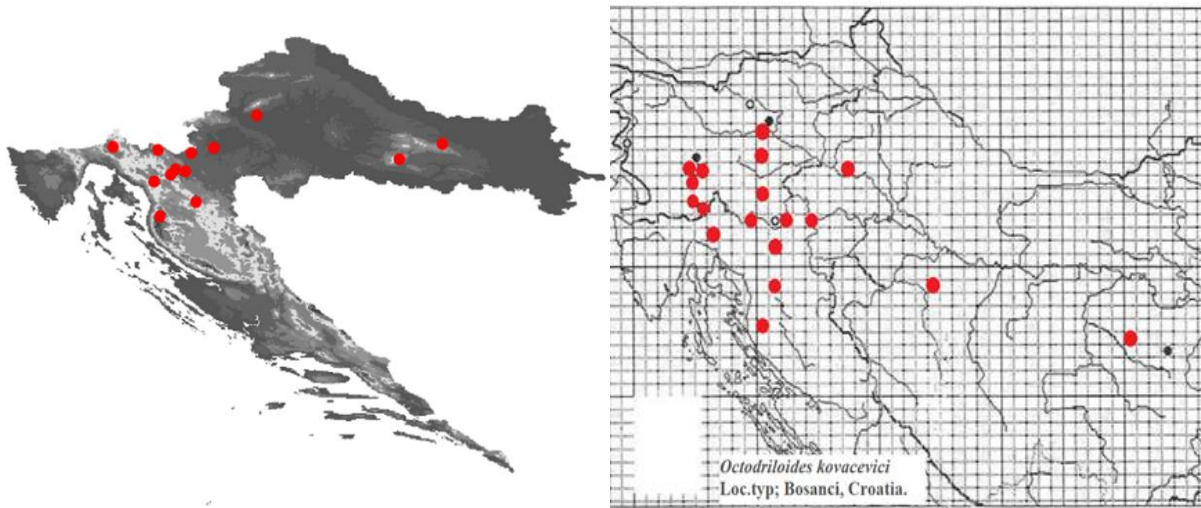


Slika 27. Geografska rasprostranjenost vrste *Oi. kamnensis* (syn. *Oi. karawankensis*) u Hrvatskoj (Hackenberger K. i sur., 2015). Crvene točke označavaju lokacije na kojima je zabilježena ova vrsta.



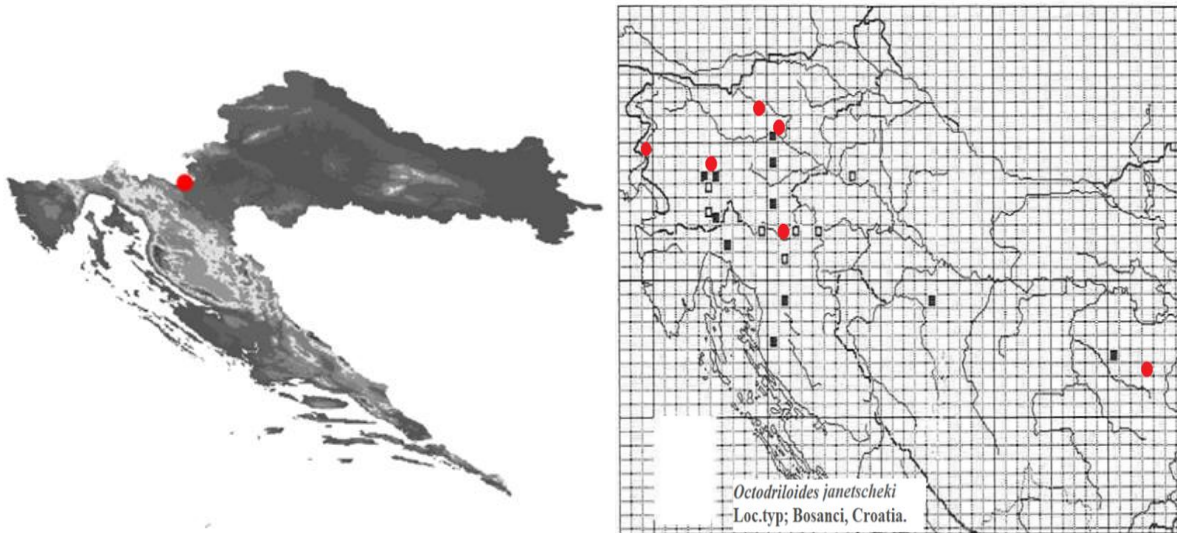
Slika 28. Geografska regionalna rasprostranjenost vrste *Oi. kamnensis* (syn. *Oi. karawankensis*) (Mršić, 1991). Crvene točke označavaju kvadrante na kojima je zabilježena ova vrsta.

1.5.2.3. *Octodriloides kovacevici* Zicsi, 1970



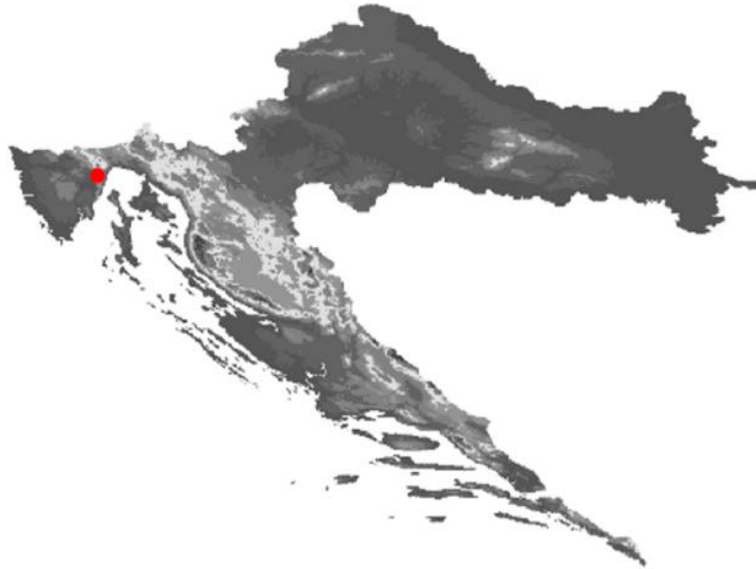
Slika 29. Rasprostranjenost vrste *Oi. kovacevici* u Hrvatskoj, crvene točke označavaju lokacije vrste (lijevo) (Hackenberger K. i sur., 2015) i regionalna rasprostranjenost vrste, crvene točke označavaju kvadrante na kojima je zabilježena vrsta (desno) (Mršić, 1991).

1.5.2.4. *Octodriloides janetscheki* Zicsi, 1970



Slika 30. Rasprostranjenost vrste *Oi. janetscheki* u Hrvatskoj, crvene točke označavaju lokacije vrste (lijevo) (Hackenberger K. i sur., 2015) i regionalna rasprostranjenost vrste, crvene točke označavaju kvadrante na kojima je zabilježena vrsta (desno) (Mršić, 1991).

1.5.2.5. *Octodriloides poklonensis* Mršić, 1991

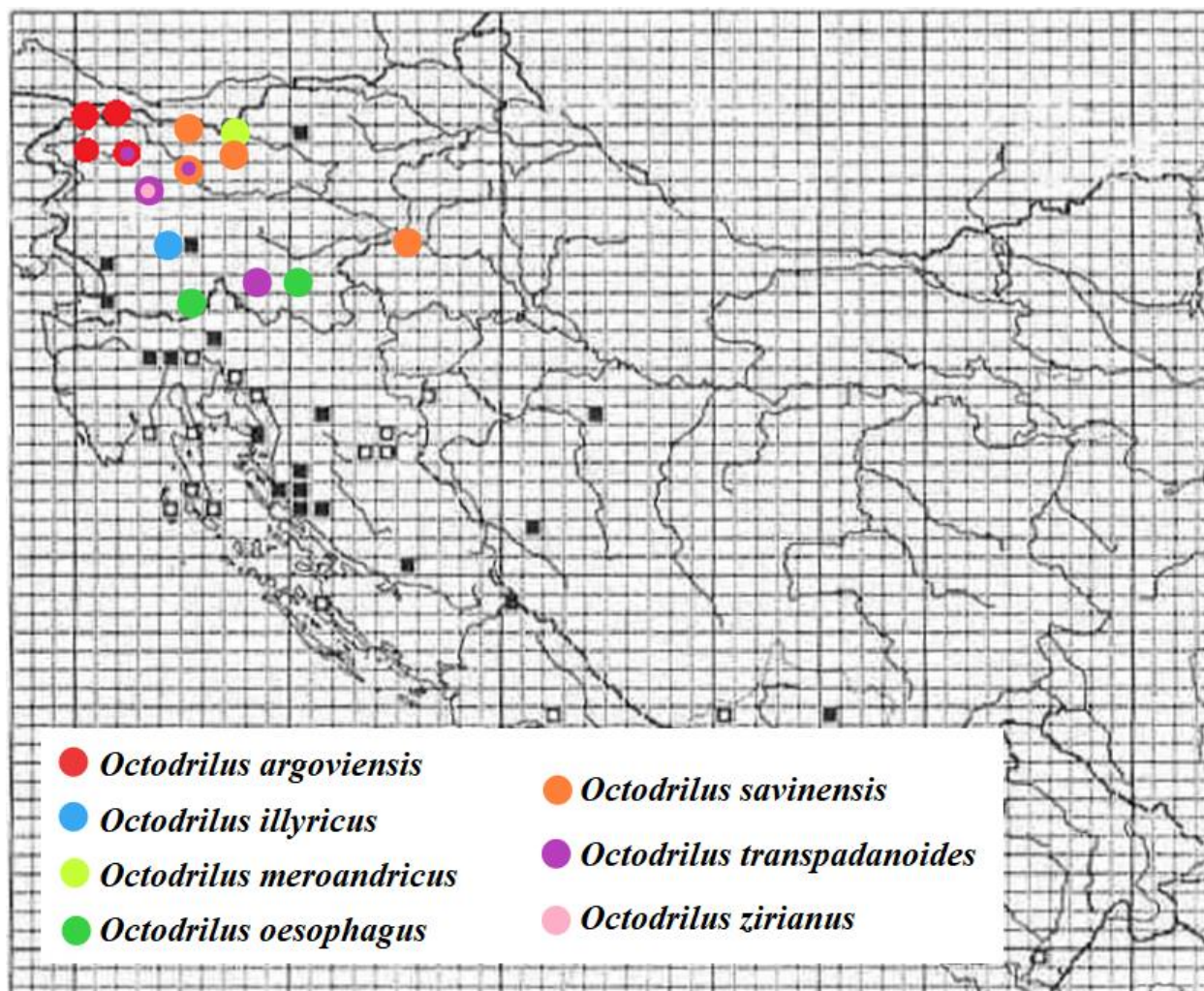


Slika 31. Geografska rasprostranjenost vrste *Oi. poklonensis* u Hrvatskoj (Hackenberger K. i sur., 2015). točke označavaju lokacije na kojima je zabilježena ova vrsta.

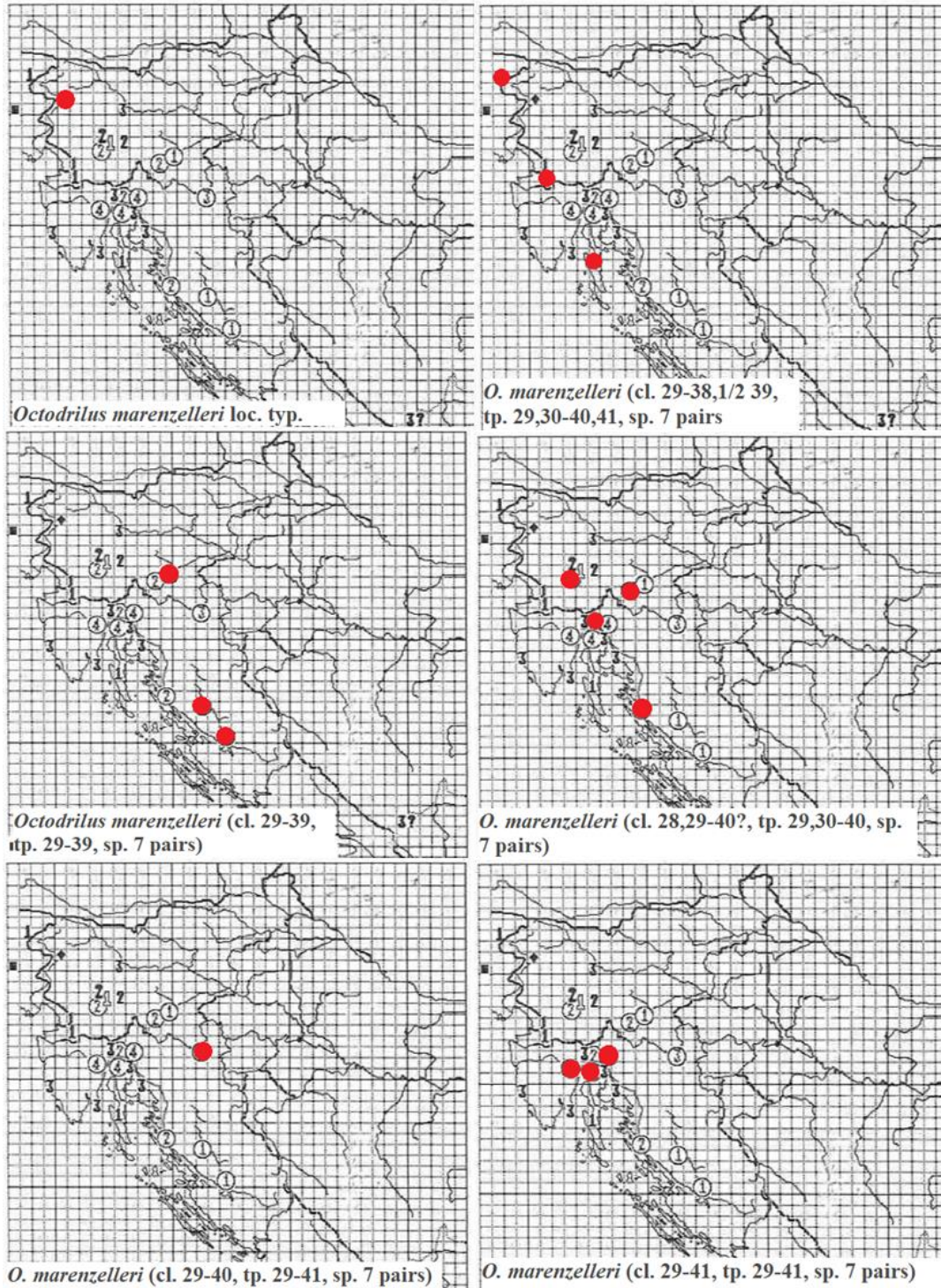
Locus typicus: Poklon, Učka, Hrvatska (Mršić, 1991)

1.5.3. Područje rasprostranjenosti vrsta rodova *Octodrilus* i *Octodriloides* koje su potencijalno rasprostranjene Hrvatskoj

1.5.3.1. Područje rasprostranjenosti vrsta roda *Octodrilus* potencijalno rasprostranjenih u RH

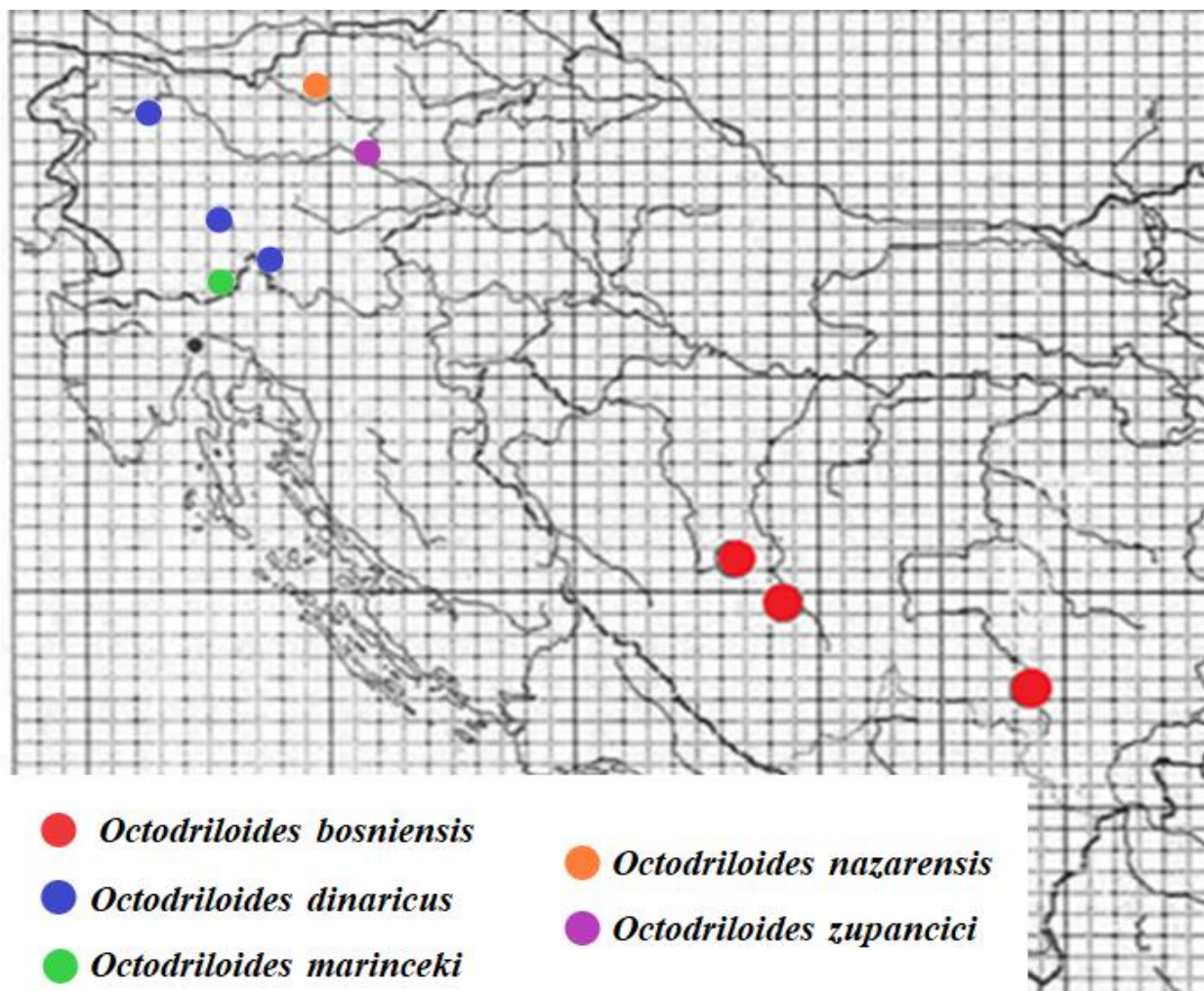


Slika 32. Geografska regionalna rasprostranjenost vrsta roda *Octodrilus* (Mršić, 1991). Boje točkica označavaju kvadrante na kojima su zabilježene vrste *Oc. argoviensis* Bretscher, 1899, *Oc. illyricus* Mršić, 1987, *Oc. meroandricus* Mršić, 1985, *Oc. oesophagus* Mršić, 1991, *Oc. savinensis* Mršić, 1987, *Oc. transpadanoides* Zicsi, 1981 i *Oc. zirianus* Mršić, 1987.



Slika 33. Geografska rasprostranjenost vrste *Oc. marenzelleri* (Mršić, 1991). Crvene točke označavaju kvadrante na kojima je zabilježena vrsta; **cl.** – položaj kliteluma, **tp.** – položaj stidne izbočine, **7 pairs** – 7 parova sjemenih spremišta

1.5.3.2. Područje rasprostranjenosti vrsta roda *Octodriloides* potencijalno rasprostranjenih u RH



Slika 34. Geografska regionalna rasprostranjenost vrsta roda *Octodriloides* prema Mršić (1991). Boje točkica označavaju kvadrante na kojima su zabilježene vrste *Oi. bosniensis* Mršić, 1991, *Oi. dinaricus* Mršić, 1991, *Oi. marinceki* Mršić, 1987, *Oi. nazarensis* Mršić, 1991, *Oi. zupancici* Mršić, 1987.

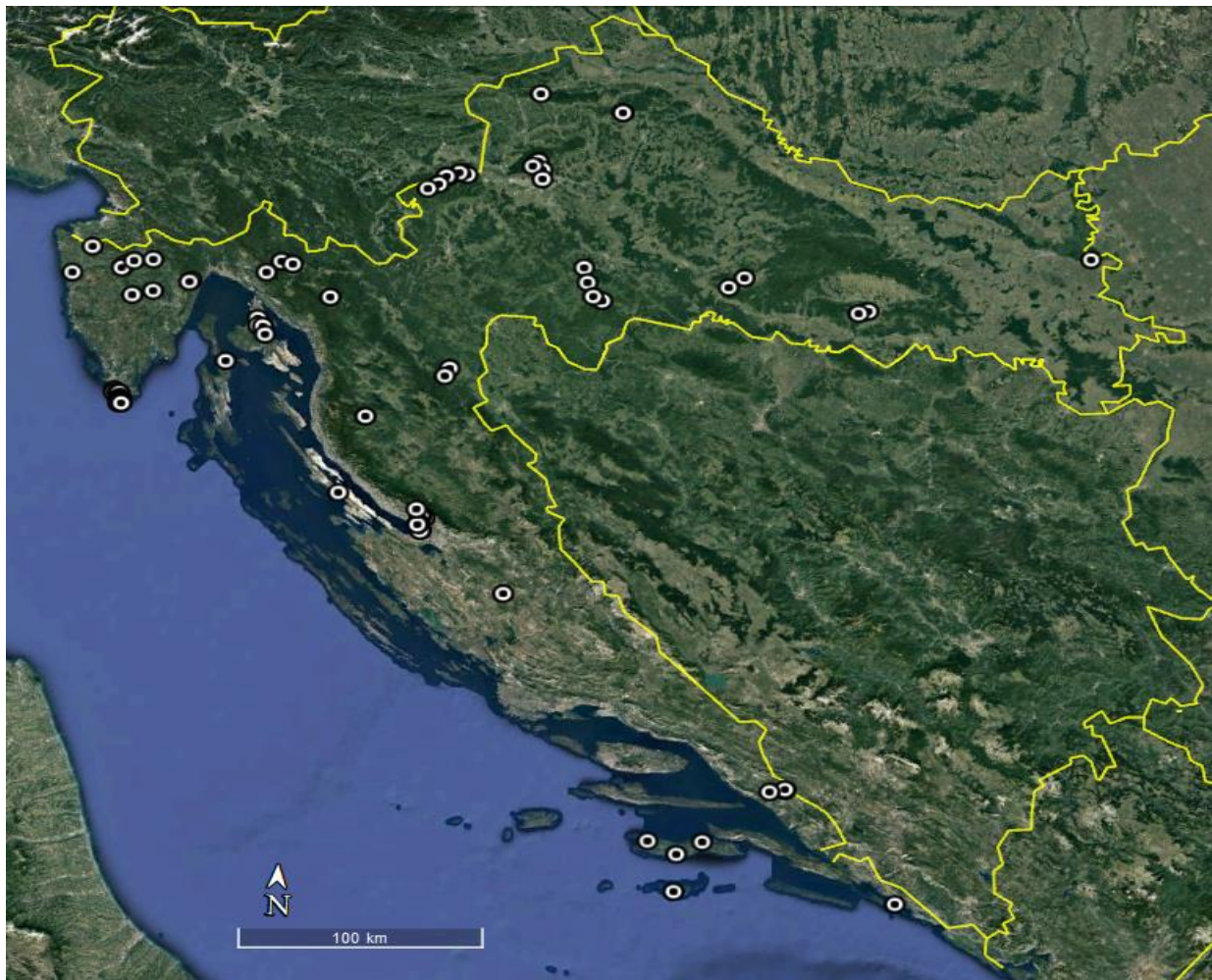
2. Cilj istraživanja

Glavni cilj istraživanja je među gujavicama uzorkovanim na području Republike Hrvatske morfološkom determinacijom izdvojiti jedinke koje pripadaju rodovima *Octodrilus* i *Octodriloides*, odrediti kojoj vrsti pripadaju na temelju vanjske i unutarnje građe, izvesti DNA barkodiranje COI regije mtDNA izdvojenih jedinki te filogenetskim metodama odrediti gensku raznolikost među vrstama i linijama. Determinacija vrsta rodova *Octodrilus* i *Octodriloides* prilično je zahtjevna zbog mnogo varijabilnih morfoloških osobina koje se kod vrsta katkad preklapaju, pa je jedan od ciljeva istraživanja da se DNA barkodiranjem i uporabom filogenetskih metoda sekvence povežu s opisanim vrstama, kako javno dostupnih sekvenci rodova *Octodrilus* i *Octodriloides* u bazama poput BOLD i GenBank iz Hrvatske nema.

3. Materijali i metode

3.1. Područja uzorkovanja i determinacija vrste

Iz zbirke Prirodoslovnog odjela Gradskog muzeja Varaždin, Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i privatne zbirke Romana Ozimeca izdvojio sam 177 jedinki koje sam determinacijom svrstao u rodove *Octodrilus* i *Octodriloides*. Jedinke su uzorkovane na ukupno 77 lokaliteta širom Hrvatske (prilog 1). Primjerke pojedinog lokaliteta označio sam kodom lokacije (eng. *site code*, npr. **HREW12**), a svakom primjerku s lokacijskim kodom dodao sam i redni broj da se dobije kod primjerka (eng. *sample ID*, npr. **HREW10-2**). Lokaliteti su geografski prikazani na karti Hrvatske na slici 35.



Slika 35. Karta s oznakama lokaliteta na kojima su uzorkovani primjerci rodova *Octodrilus* i *Octodriloides* (Google Earth Pro, v. 7.3.4.)

Gujavice, primjer jedinke na slici 36., uzorkovane su različitim metodama: kopanjem, skupljanjem s površine, električnim agregatom, tretiranjem tla s alkoholnom otopinom gorušice ili klinčića itd. Jedinke su pohranjene u 70%-tnom, a nakon toga prebačene u apsolutni etanol kako bi se očuvala DNA primjerka. Vrste sam determinirao prema osobinama u građi i anatomiji (tablica 1) pomoću digitalnog ključa za određivanje gujavica Hrvatske (ErIK) (Hackenberger K. i sur., 2015) i Mršićevog (1991) determinacijskog ključa za rodove *Octodrilus* i *Octodriloides*. Koristio sam se binokularnom lupom za promatranje i bilježenje morfoloških i anatomskih obilježja za koje je bila potrebna i sekcija anteriornog dijela gujavica. Potrebno je naglasiti da je determinacija gujavica, naročito rodova *Octodrilus* i *Octodriloides*, prilično zahtjevna zbog mnogo varijabilnih morfoloških osobina čije se vrijednosti kod vrsta često preklapaju.



Slika 36. Primjerak gujavice vrste *Oc. istrianus* uzorkovan na rtu Kamenjaku

3.2. Izolacija tkiva i DNA iz tkiva primjerka

Pribor: mikroepruveta 2 mL, ploča za izolaciju DNA (96 jažica, volumen jažice 300 μ L), poklopci za ploče, automatske pipete, sterilizirana plastična posudica, nastavci za pipete, žilet, aluminijska folija, pinceta, kirurške škariće, špatula

Kemikalije: Chelex 100 (Sigma-Aldrich), Proteinaza K (>600 mAU/mL, Sigma-Aldrich), 96% etanol, deionizirana voda

Instrumenti i uređaji: termo-treskalica TS-100 (bioSan), CVP-2 centrifuga za PCR ploče (bioSan), , magnetska miješalica s magnetičem MS-3000 (bioSan), digitalna vagica (OHAUS YA102, 100 g \times 0.01 g), zaštitni kabinet UVT-B-AR (bioSan)

Kirurškim škarićama izrezao sam komadić epitelnog tkiva površine 10 mm x 10 mm svakog primjerka i stavio ga u mikroepruvetu volumena 2 mL s oznakom. Mikroepruvetu s izoliranim tkivom zatim sam napunio 96%-tnim etanolom. Puno manji komadić tkiva dovoljan je za izolaciju DNA i provedbu ostalih koraka, a ostatak tkiva može poslužiti za izolaciju i amplifikaciju sekvenci drugih molekularnih biljega u drugim istraživanjima. Tkivo u etanolu pohranio sam u hladnjaku na + 4°C. Važno je napomenuti da sam izrezivao epitelno tkivo posteriornog dijela gujavica, jer se na području od kliteluma prema ustima gujavice nalaze ključne morfološke osobine za determinaciju vrste.

U svaku jažicu ploče za izolaciju DNA pipetirao sam 5 μ L 96%-tnog etanola. Ovaj korak je preventivna mjera da komad tkiva, zbog statičkog elektriciteta „u suhom“, ne bi izletio iz jažice i kontaminirao druge uzorke. Na komadiću aluminijske folije žiletom sam odrezao komadić epitelnog tkiva gujavice površine 1 mm \times 1 mm i pincetom ga stavio u jažicu s etanolom. Komadić folije se baci, a pincetu i žilet sam sterilizirao plamenom. Ploču za izolaciju s tkivom sam ostavio u zaštitnom kabinetu da etanol ispari, a tkivo ostane suho u jažici. Treba napomenuti da alkohol u potpunosti mora ispariti, jer se enzimaska razgradnja u idućim koracima mora odvijati u vodenom mediju, bez prisustva etanola. Chelex je kelatirajući organski polimer koji na principu ionske izmjene uklanja Mg^{2+} katione inhibirajući aktivnost DNAza (Walsh i sur., 1991) koje bi degradirale DNA molekule oslobođene enzimatskim djelovanjem Proteinaze K. Proteinaza K razgrađuje membranske proteine i proteine lizata pri čemu se oslobađaju nukleinske kiseline, a istovremeno razgradnjom DNAza i RNAza inhibira njihovo djelovanje. Proteinaza K otporna je

na tragove kelatirajućih reagensa u otopini poput EDTA, djelotvorna je u širokom spektru pH, aktivnost joj je najveća pri 50-60°C, a denaturira se pri temperaturi većoj od 65°C (Hilz i sur., 1975).

U sterilnu plastičnu posudicu ulio sam 15 mL deionizirane vode. Odvagao sam 1.5 g Chelexa i dodao u plastičnu posudicu s vodom. 100 mg Proteinaze K otopio sam u 5 mL vode kako bih dobio zalihi za nekoliko ploča. 960 µL tako pripremljene 2%-tne Proteinaze K pipetirao sam u otopinu Chelexa. Smjesu sam stavio miješati na magnetskoj miješalici. 160 µL smjese Chelexa i Proteinaze K pipetirao sam u svaku jažicu s tkivom. Ploču sam zatvorio poklopcima i stavio na brzo centrifugiranje uz vorteksiranje (S-M-S mod na centrifugi: 30s spin – 30s mix – 30s spin, 1000 rpm) da ne ostane zraka u otopini. Ploču sam zatim položio na termo-treskalicu i podesio inkubaciju na suhoj kupelji na 55 °C, uz trešnju 500 rpm, preko noći. Sljedeći dan ponovno sam centrifugirao ploču uz vorteksiranje (mod S-M-S) i stavio na hlađenje u hladnjak na +4°C.

3.3. PCR - lančana reakcija polimeraze

Pribor: ploča za PCR (96 jažica, volumen jažice 150 µL), poklopci za ploče, automatske pipete, nastavci za pipete, mikropraveta 1.5 mL, stalak za hlađenje PCR ploče, stalak za hlađenje mikropraveta

Kemikalije: DNA-polimeraza *DreamTaq Mix 2x* 3 mM, DNA početnice F („*forward*“) smjera (LCO1490, 5 µM) i R (*reverse*) smjera (HCO2198, 5 µM), deionizirana voda, izolat sadržaja tkiva iz prethodnog koraka

Instrumenti i uređaji: CVP-2 centrifuga za PCR ploče (bioSan), PCR uređaj (MiniAmp™ plus Thermal Cycler (ABI))

U mikropraveti od 1.5 mL pripremio sam „*premix*“ mješavinu DNA-polimeraze i početnica za 96 uzoraka (PCR ploča), tako da sam pipetira redom:

- a) 540,6 µL deionizirane vode (5.3 µL je potrebno po uzorku)
- b) 765,0 µL *DreamTaq Mix 2x* DNA-polimeraze (7.5 µL množinske koncentracije 1,5 mM je potrebno po uzorku)
- c) 61,2 µL početnice F smjera (LCO1490) (0,6 µL množinske koncentracije 200 nM je potrebno po jažici)

d) 61,2 μL početnice R smjera (HCO2198) (0,6 μL množinske koncentracije 200 nM je potrebno po jažici)

= ukupno 1428 μL „*premixa*“ (1344 μL za 96 jažica)

Pogodno je pripremiti malo veći volumen „*premixa*“ nego što je potrebno zbog standardne pogreške preciznosti automatske pipete prilikom pipetiranja. Kemikalije koje su u mikroeprevetama treba držati na stalku za hlađenje.

14 μL „*premixa*“ pipetirao sam u svaku jažicu ploče za PCR. Ploču za izolaciju DNA s izolatom držao sam u stalku za hlađenje. Tako se održava niska temperatura i niska aktivnost proteinaze K koja je prisutna u otopini izolata, kako ne bi počela razgrađivati DNA-polimerazu kad ju se slučajno s izoliranom DNA prenese u jažicu s „*premixom*“. 1 μL izolata, u kojemu je izolirana DNA tkiva, prenio sam iz svake jažice ploče za izolaciju DNA u odgovarajuću jažicu ploče za PCR s „*premixom*“. Pločicu sam zatvorio poklopcima i stavio centrifugirati uz vorteksiranje (S-M-S mod). Dobro je napomenuti da poklopci dobro moraju „dihtati“ da smjesa tijekom PCR procesa ne ispari. U PCR uređaj stavio sam pločicu i namjestio protokol:

- 1) Inicijalna aktivacija: $T = 95^{\circ}\text{C}$, 3 min
- 2) Broj ciklusa: 35
 - I. Denaturacija: 95°C , 60s
 - II. Vezivanje početnica: 46°C , 60s
 - III. Elongacija: 72°C , 60s
- 3) Finalna elongacija 72°C , 10 min

Ploču s umnoženim PCR produktima zatim sam stavio nakratko centrifugirati da se kapljice na stijenkama slegnu.

Lančanom reakcijom polimeraze (PCR) DNA početnicama LCO1490 i HCO2198 (5'GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG3' i 5'TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA3') (Folmer i sur., 1994) umnožava se tzv. „Folmerova“ ili COI regija mitohondrijske DNA koja kodira sintezu proteinske podjedinice I citokrom *c* oksidaze, a regija ima široku primjenu u DNA barkodiranju metazoa. Umnažanje DNA regije započinje denaturacijom na 95°C tijekom 3 minute, tijekom kojih se denaturira Proteinaza K i ostali enzimi, ali ne i DNA-polimeraza. Zatim slijedi 35 ciklusa od kojih se svaki sastoji od 60 sekundi na temperaturi 94°C tijekom kojih se lanci DNA

odvajaju, 60 sekundi vezanja početnica na DNA na 46°C i 60 sekundi sinteze amplikona na 72°C. Završnom sintezom amplikona na 72°C u trajanju 10 min završava PCR, a ploča se hladi na 10°C do preuzimanja iz PCR uređaja.

3.4. DNA elektroforeza i purifikacija PCR produkata

Pribor: Erlenmeyerova tikvica s širokim grlom, termometar, digitalna vagica (OHAUS YA102, 100 g × 0.01 g)), špatula, automatske pipete, nastavci za pipete, rastezljiva folija

Kemikalije: agarozna, TAE pufer (pH 8.0), 2%-tna Midori Green Advance DNA stain otopina (Nippon Genetics Europe GmbH), AnP (Antarctic Phosphatase, *NEB*, 5 u/μL), Exonuclease I (*NEB*, 20 u/μL), PCR produkti iz prethodnog koraka, destilirana voda, deionizirana voda

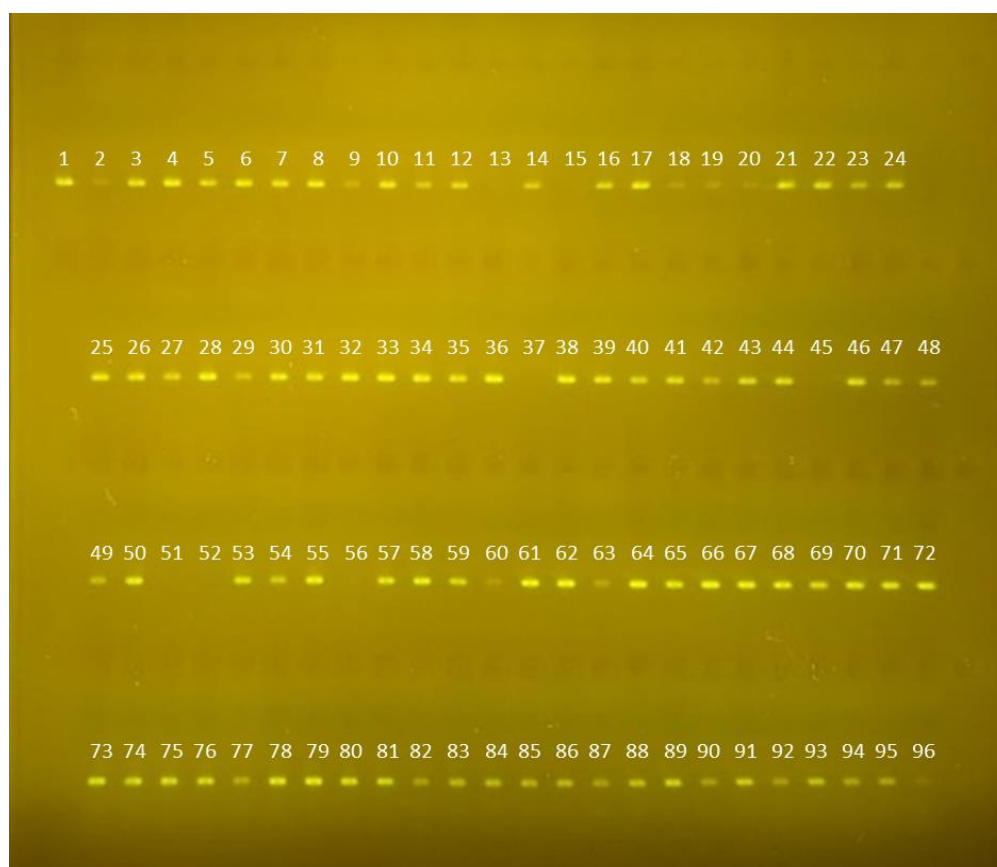
Instrumenti i uređaji: Blue LED Transilluminator (IO Rodeo Inc.) u tamnoj komori, Uređaj za elektroforezu s kadicom, nosačem za gel i češljicama (Mupid®One), mikrovalna pećnica

Uspješnost PCR-a provjerava se gel elektroforezom koja se temelji na razdvajanju molekula na osnovi naboja i molekulske mase kroz agarozni gel pod utjecajem električnog polja. DNA je negativno nabijena molekula zbog fosfatnih skupina i putovat će prema pozitivno nabijenoj anodi.

U Erlenmeyerovu tikvicu s širokim grlom ulio sam malo više od 80 mL destilirane vode. Odvagao sam 0,8 g agaroze i špatulom dodao u Erlenmeyerovu tikvicu s širokim grlom, čiji sam otvor prekrivio rastezljivom folijom kako bih spriječio isparavanje tijekom zagrijavanja. Smjesu sam zagrijavao u mikrovalnoj pećnici dok se sva agarozna nije otopila. Kada je temperatura pripremljene otopine agaroze pala ispod 80°C, otopini sam dodao 2%-tnu Midori Green Advance DNA-stain otopinu, koja služi za detekciju DNA i RNA molekula na gelu i sigurnosna je zamjena etidij-bromida. Agaroznu otopinu sam zatim ravnomjerno razlio po nosaču gela za elektroforezu. U razliveni gel sam uronio češljice i ostavio da se hladi. Kada je gel očvrstnuo, češljice sam izvadio, a nosač s gelom sam učvrstio u uređaj za elektroforezu. U kadicu uređaja sam ulio oko 350 mL TAE pufera (Sambrook i Russell, 2001) tako da površina pufera bude 1-1.5 cm iznad površine gela. U svaku jažicu na gelu pipetirao sam 5 μL PCR produkta. Uređaj za elektroforezu poklopio sam poklopcem i podesio trajanje elektroforeze 15 minuta na 100V. Zelena boja pufera u sastavu *DreamTaq Mix 2x* DNA-polimeraze je dvokomponentna. Žuta boja manjeg je iznosa molekularne mase, pa se ona uzima kao fronta tijekom elektroforeze. Elektroforezu sam prekinuo

isključivanjem uređaja kada je odvojena žuta pruga doputovala pred jažice u drugom redu ispod. Gel sam stavio u tamnu komoru na Blue LED Transilluminator i rezultate fotografirao za fotodokumentaciju (slika 37.).

Prema protokolu bi se u prvu i posljednju jažicu gela svakog reda trebalo pipetirati 5 μ L DNA standarda s poznatom veličinom tj. brojem baza pomoću kojih bi se mogla procijeniti veličina nepoznate DNA. Međutim, kako sam za svih 96 PCR produkata primijenio isti molekularni biljeg (COI regija) i znam koliku veličinu produkta očekujem, procijenio sam da dodavanje DNA standarda za analizu gela nije potrebno.



Slika 37. Elektroforetogram PCR produkata.

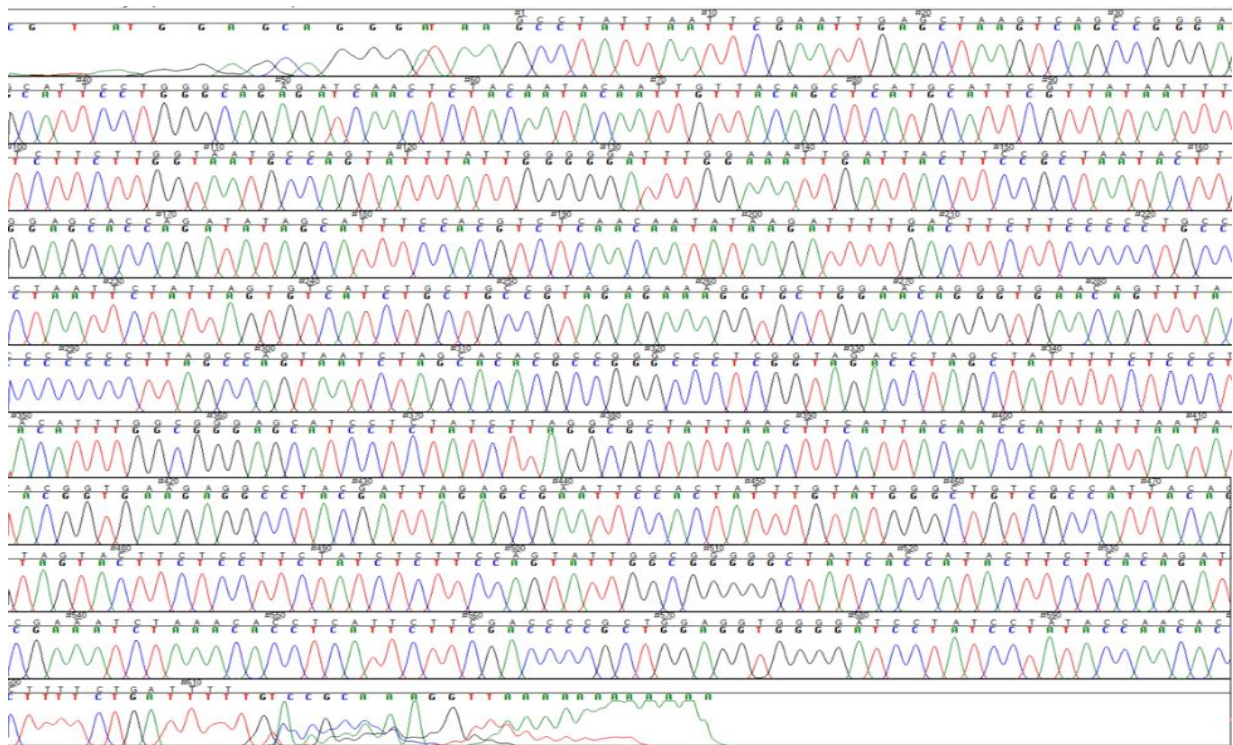
Za purifikaciju PCR produkata koristi se mješavina enzima Exonuklease I i AnP (Antarctic Phosphatase). Exonuclease I razgrađuje oligonukleotide (preostale DNA početnice), a AnP neugrađene dNTP-ove koji bi mogli ometati reakciju sekvenciranja. Za 96 uzoraka pripremio sam mješavinu enzima na način da sam u jednu mikroeprijetu pipetirao:

- a) 5.5 μL Exonuclease I (0.05 μL po jažici, koncentracije 1 u/ μL)
- b) 11 μL AnP (0,1 μL po jažici, koncentracije 0.5 u/ μL)
- c) 203.5 μL deionizirane vode

Ponovno, pogodno je pripremiti malo veći volumen mješavine nego što je potrebno zbog standardne pogreške preciznosti automatske pipete prilikom pipetiranja. 2 μL mješavine enzima pipetirao sam u svaki PCR produkt i ploču stavio inkubirati u PCR uređaj uz protokol 60 minuta grijanja na 37°C tijekom kojih se odvijaju enzimске reakcije i 20 minuta grijanja na 80 °C na kojoj se uneseni enzimi denaturiraju. PCR ploča s pročišćenim amplikonima poslana je u tvrtku Macrogen Corporation (Amsterdam, Nizozemska) kako bi se odredio slijed nukleotidnih baza COI regije. Prema jačini signala na elektroforetogramu procijenjena je koncentracija DNA pojedinog uzorka. Sekvenciranje je provedeno s istim početnicama koje su korištene u PCR-u.

3.5. Analiza sekvenci

Datoteke sa sirovim podacima dobivenim nakon sekvenciranja u Macro genu obradio sam u programu SEQUENCHER (version 4.1.4.; Gene Codes Corp.). Izrezivao sam krajeve sekvenci te provjeravao i ispravljao kvalitetu pikova, odnosno ispravnost očitavanja nukleotida na elektroferogramu (slika 38). Sekvenciranje je obavljeno u dva smjera. Prednost takvog načina je u tome što se nukleotidi sekvenci međusobno poklapaju nakon sravnjivanja, što olakšava obradu, a istovremeno veličina COI sekvence je uvećana i daje više signala filogenetskoj analizi. Sve obrađene sekvence izveo sam u fasta (.fas) formatu i učitao u programski paket MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), gdje sam ih sravnio radi dorade i provjere. Završni set COI sekvenci sa svim metapodacima učitao je u bazu podataka Barcode of Life Database (BOLD; <http://www.boldsystems.org/>) od strane suvoditelja diplomskog rada te će nakon objave budućeg znanstvenog rada postati javno dostupni. U BOLD i GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) bazama pronašao sam i preuzeo sve javno dostupne COI sekvence rodova *Octodrilus* i *Octodriloides*, te ih ubacio u analizu zajedno s sekvencama ovog istraživanja kao referentna podrška u filogenetskim analizama. Kako bi položaji nukleotida svih sekvenci bili homologni, sve COI sekvence sravnio sam MUSCLE algoritmom, a valjanost provjerio simuliranim izgledom primarne strukture proteina.



Slika 38. Izgled elektroferograma COI sekvence uzorka **HREW204-09** u programu SEQUENCHER (4.1.4.), sekvenciranim LCO_1490 DNA-početnicom

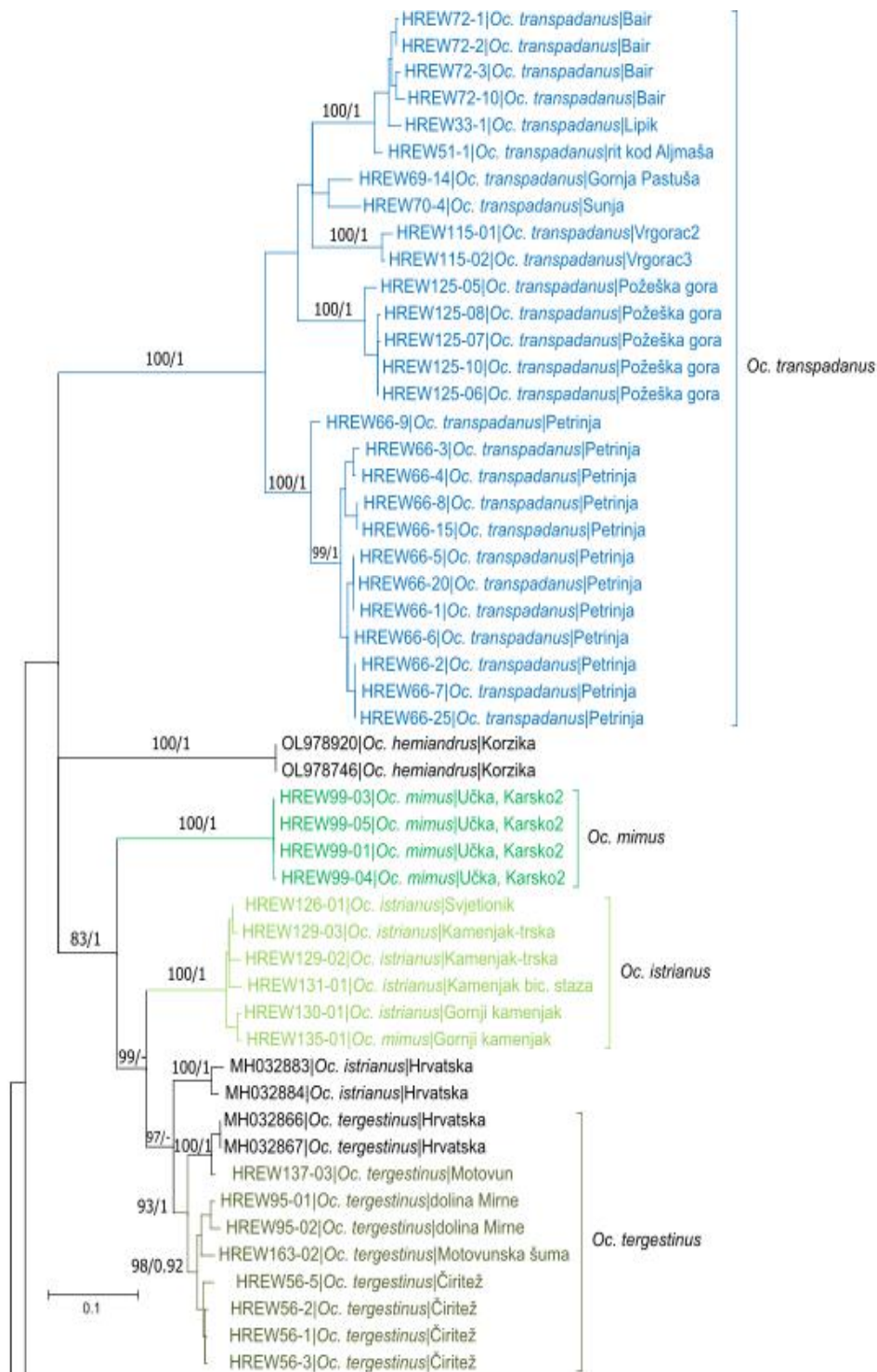
Prije pokretanja filogenetskih rekonstrukcija, pomoću jModeltest 2 programa (Darriba et al, 2012; Guindon i Gascuel, 2003) uz Akaike (AIC; Akaike 1973) i Bayesian (BIC; Schwarz, 1978) kriterije, odredio sam da je evolucijski model GTR+I+G najpodobniji za konstrukciju filogenetskih odnosa. U programskom paketu MEGA X izradio sam filogenetsko stablo COI regije rodova *Octodrilus* i *Octodriloides* uporabom statističke metode najveće vjerojatnosti (ML), testirano pomoću 1000 neparametrijskih replikata samoučitanja (engl. *bootstrap*) i Tamura 3-P evolucijskog modela (Tamura, 1992; Kumar, 2018).

Koristeći program MrBayes 3.2 (Ronquist i Huelsenbeck 2003) uz pomoć voditelja izrađeno je filogenetsko stablo Bayesovom metodom pomoću CIPRES Science Gateway V.3.3 servisa (Miller i sur., 2010). GTR+I+G model je izabran kao optimalan, parametri analize postavljeni su za 10 milijuna generacija, a 10 000 stabala je uzorkovano za svaku 1000. generaciju. Temperaturni parametar postavljen je na 0.2, a početnih 25% generacija/uzoraka uklonjeni su kao „burn-in“ period.

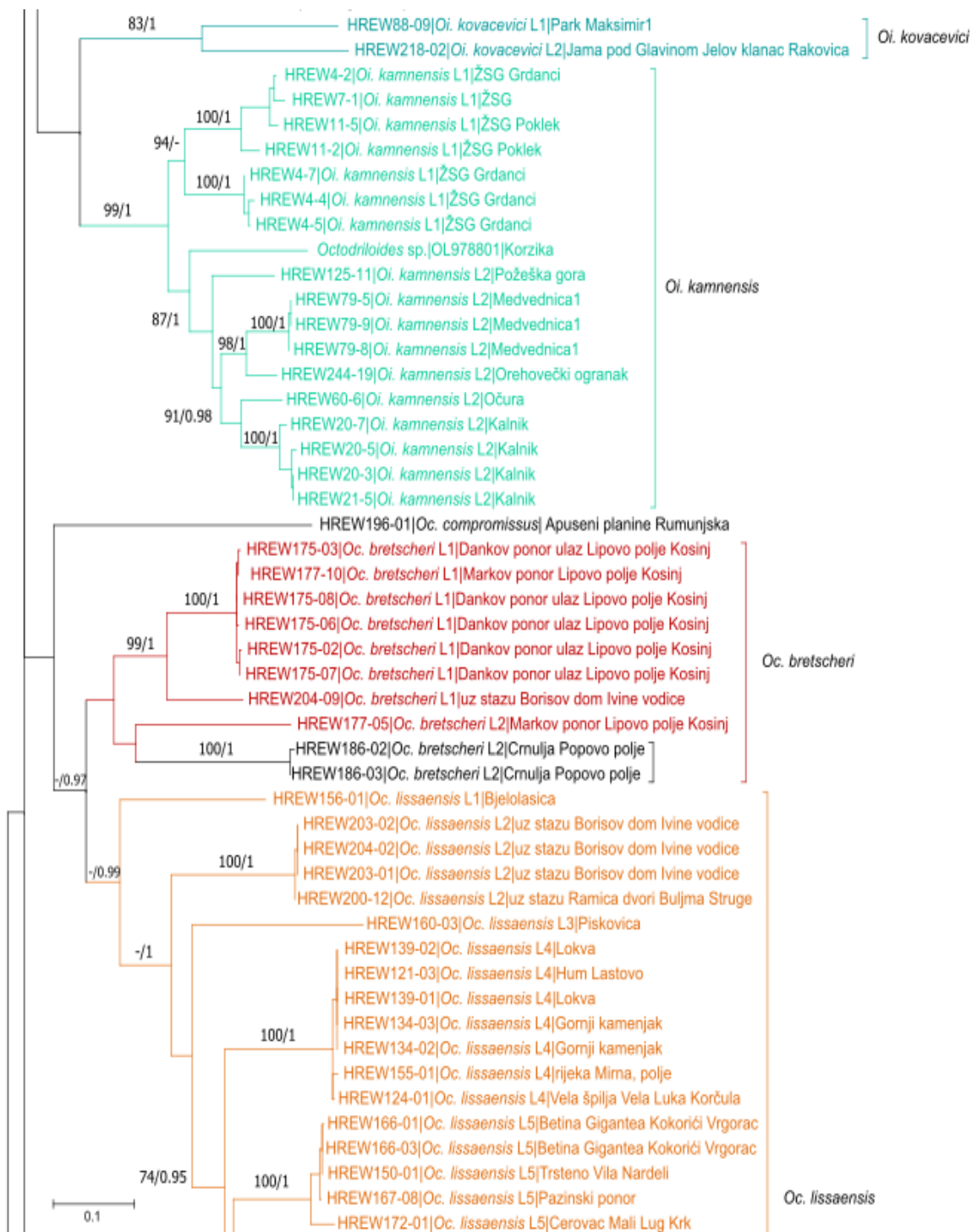
Kod filogenetskog stabla dobivenog metodom najveće vjerojatnosti (ML), podržano grananje je ono s vrijednosti samoučitanja (p) ≥ 70 i posteriorne vjerojatnosti (pp) ≥ 0.90 kod Bayesove metode. Dvije sekvence vrste *Octolasion lacteum* korištene su kao vanjska grupa (eng. *outgroup*), kako je rod *Octolasion* najbliža sestrinska grupa skupina kojeg čine rodovi *Octodrilus* i *Octodriloides* te vrsta *Octolasion montanum* (Domínguez i sur., 2015). Genska udaljenost grupiranih linija izračunata je u MEGA X programu koristeći Kimura 2-P model (Kimura 1980; Kumar i sur., 2018).

4. Rezultati

Za izradu filogenetskog stabla korištene su 177 eksperimentalno dobivenih sekvenci COI regije rodova *Octodrilus* i *Octodriloides* s ukupno 77 lokaliteta iz RH. Morfološke i anatomske karakteristike odraslih, spolno zrelih i neoštećenih primjeraka navedene su u prilogu 2. U izradu stabla ubačene su i dostupne sekvence s područja Europe preuzete iz BOLD baze (<http://www.boldsystems.org/>). Na slici 39. prikazano je stablo konstruirano pomoću metode najveće vjerojatnosti (ML), a na granama stabla prikazane su vrijednosti samoučitanja (bootstrap) čija je podržanost ≥ 70 (ML) i posteriorne vjerojatnosti Bayesove analize čija je podržanost ≥ 0.9 . Naziv svake završne grane stabla sastoji se od **I.** *sample ID* uzorka, **II.** naziva vrste i **III.** naziva lokaliteta ili države odakle je jedinka uzorkovana.



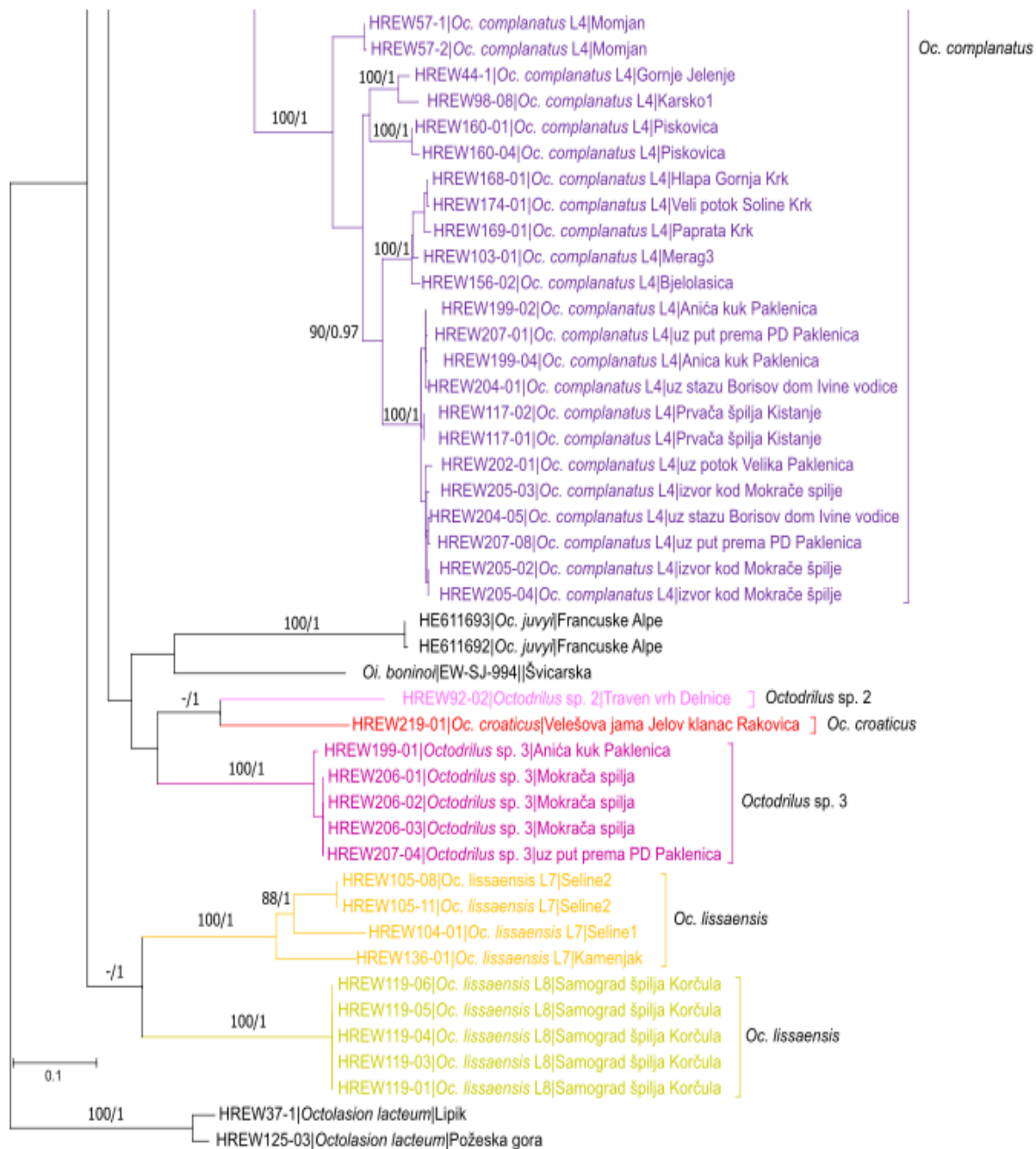
Slika 39a. Filogenetsko stablo najveće vjerojatnosti (ML) istraživanih rodova *Octodrilus* i *Octodriloides*. Prvi broj na granama odgovara vrijednosti samoučitanja (p), a drugi posteriornoj vrijednosti (pp) Bayesove metode.



Slika 39b. Filogenetsko stablo najveće vjerojatnosti (ML) istraživanih rodova *Octodrilus* i *Octodriloides*. Prvi broj na granama odgovara vrijednosti samoučitanja (p), a drugi posteriornoj vrijednosti (pp) Bayesove metode.



Slika 39c. Filogenetsko stablo najveće vjerojatnosti (ML) istraživanih rodova *Octodrilus* i *Octodriloides*. Prvi broj na granama odgovara vrijednosti samoučitanja (p), a drugi posteriornoj vrijednosti (pp) Bayesove metode.



Slika 39d. Filogenetsko stablo najveće vjerojatnosti (ML) istraživanih rodova *Octodrilus* i *Octodriloides*. Prvi broj na granama odgovara vrijednosti samoučitanja (p), a drugi posteriornoj vrijednosti (pp) Bayesove metode.

4.1. Filogenetska analiza i sistematika gujavica roda *Octodrilus* u Hrvatskoj

I) *Octodrilus transpadanus* Rosa, 1884

1884 *Allolobophora transpadana* Rosa, Lumbric. Piemonte, Torino, 45.

1991 *Octodrilus transpadanus*: Mršić Acad. Sci. Art. Slov. (Hist. Nat.), 31: 371.

2003 *Octodrilus transpadanus*: Csuzdi & Zicsi Pedozool. Hung., 1: 215.

Uzorci: (HREW51-1): rit kod Aljmaša, Erdut, 25.3.2017., leg. Davorka Hackenberger Kutuzović, Branimir Hackenberger; **(HREW66-1 – HREW 66-10, HREW66-15, HREW66-20, HREW66-25):** Kupa, Banovina, 18.10.2017., leg. Mišel Jelić; **(HREW69-14):** Gornja Pastuša, Banovina, 18.10.2017., leg. Mišel Jelić; **(HREW70-4):** Sunja, Banovina, 18.10.2017., leg. Mišel Jelić; **(HREW72-1 - HREW72-3, HREW72-10):** Bair, Novska, zapadna Slavonija, 19.10.2017., leg. Mišel Jelić, Bruno Schmidt; **(HREW115-01 – HREW 115-02):** Vrgorac, južna Dalmacija, 26.5.2019., leg. Göran Klobučar; **(HREW125-05 – HREW125-08, HREW125-10):** Požeška gora, 2020.g., leg. Tena Plavac.

Grada i anatomija odraslih, spolno zrelih jedinki: Male do srednje velike gujavice duljine 43-120 mm, širine 4.3-6.3 mm. Broj kolutića kreće se od 150 – 200 kolutića. Boja je sivkasta, sivo-smeđa do smeđa. Prostimij epiloban. Klitelum i stidna izbočina smješteni su na 30-37. M.s.o. na 15. kolutiću. 5 parova sjemenih spremišta su na položaju 6/7-10/11, 4 sjemene vrećice od 9.-12. kolutića. Dva para sjemenika zatvoreni su u periezofagealnim testikularnim vrećama na 10. i 11. kolutiću.

II) *Octodrilus mimus* Rosa, 1889

1889 *Allolobophora mima* Rosa, 1889 Boll. Mus. Torino, 4 (60): 1.

1954 *Octolasium mima f. marenzelleri*: Omodeo 1954 Atti Mus. Civ. St. Nat. Trieste, 19: 131.

1962 *Octolasium mima marenzelleri*: Omodeo 1962 Mem. Mus. Civ. St. Nat. Verona, 10: 80.

1986 *Octodrilus marenzelleri*: Zicsi 1986 Opusc. Zool. (Budapest), 22: 108.

1991 *Octodrilus mimus*: Mršić, Acad. Sci. Art. Slov. (Hist. Nat.), 31: 411.

2012 *Octodrilus mimus*: Csuzdi, Opusc. Zool. Budapest, 43: 97–99.

Uzorci: (HREW99-01, HREW99-03 – HREW99-04): Karsko, Učka, Istra, 3.11.2018., leg. Mišel Jelić.

Grada i anatomija odraslih, spolno zrelih jedinki: Dimenzijom velike gujavice duljine 150-216 mm, širine 8.3-10.2 mm. Broj kolutića kreće se od 204 – 305 kolutića. Boja je siva do sivo-smeđa. Prostomij epiloban. Klitelum se proteže od 28., 29.- 41., a stidna izbočina proteže se od 29.-41. kolutića. M.s.o. na 15. kolutiću. 7 parova sjemenih spremišta su na položaju 6/7-12/13, 4 sjemene vrećice od 9.-12. kolutića. Dva para sjemenika zatvoreni su u periezofagealnim testikularnim vrećama na 10. i 11. kolutiću.

III) *Octodrilus istrianus*, Mršić, 1991

1991 *Octodrilus istrianus* Mršić, Acad. Sci. Art. (His. Nat.), 31: 406.

2012 *Octodrilus istrianus*: Csuzdi, Opusc. Zool. Budapest, 43: 97–99.

Uzorci: (HREW126-01, HREW129-02 - HREW129-03, HREW130-01, HREW131-01, HREW135-01,): rt Kamenjak, Istra, 14.3.2020., leg. Davorka K. Hackenberger i Branimir Hackenberger.

Grada i anatomija odraslih, spolno zrelih jedinki: Dimenzijom velike gujavice duljine 140-230 mm, širine 10-11 mm. Broj kolutića kreće se od 307 – 340 kolutića. Boja je smeđa do sivo-smeđa. Prostomij epiloban. Klitelum je na 29- 42., a stidna izbočina na 29, 30- 42 kolutića. M.s.o. na 15. kolutiću. 7 parova sjemenih spremišta su na položaju 6/7-12/13, 4 sjemene vrećice od 9.-12. kolutića.

IV) *Octodrilus tergestinus*, Mršić, 1991

1910 *Octolasium mima* var. *tergestina* Michaelsen, Mitt. Naturhist. Mus. Hamburg, 27(2): 73.

1991 *Octodrilus tergestinus*: Mršić, Acad. Sci. Art. Slov. (Hist. Nat.), 31: 417.

2012 *Octodrilus tergestinus*: Csuzdi, Opusc. Zool. Budapest, 43: 97–99.

Uzorci: (HREW56-01 – HREW56-3, HREW56-05): Čiritež, Istra, 6.5.2017., leg. Mišel Jelić; **(HREW95-01, HREW95-02):** dolina Mirne, Buzet, Istra, 3.11.2018., leg. Mišel Jelić; **(HREW137-03):** Motovun, Istra, 1.11.2020., leg. Davorka K. Hackenberger i Branimir

Hackenberger; (**HREW163-02**): Motovunska šuma, Istra, 5.6.2021., leg. Roman Ozimec i Ines Vuković.

Građa i anatomija odraslih, spolno zrelih jedinki: Dimenzijom velike gujavice, duljine veće od 150 mm, širine 8-10 mm. Broj kolutića kreće se od 255 – 284. Boja je sivkasta do sivo-smeđa. Prostomij epiloban. Klitelum je smješten na 29-43, a stidna izbočina na 30-44. M.s.o. na 15. kolutiću. 7 parova sjemenih spremišta su na položajima 6/7-12/13, 4 sjemene vrećice od 9.-12. kolutića. Dva para sjemenika zatvoreni su u periezofagealnim testikularnim vrećama na 10. i 11. kolutiću.

V) *Octodriloides kovacevici*, Zicsi, 1970

1970 *Octolasium (Octodrilus) kovacevici* Zicsi, Opusc. Zool. Budapest, 10: 169.

1991 *Octodriloides kovacevici*: Mršić, Acad. Sci. Art. Slov. (Hist. Nat.), 31: 452.

2012 *Octodriloides kovacevici*: Csuzdi, Opusc. Zool. Budapest, 43: 97–99.

Uzorci:

Linija 1 (L1) – (**HREW88-09**): Maksimir, Zagreb, 25.5.2018., leg. Mišel Jelić

Linija 2 (L2) – (**HREW218-02**): Jelov klanac, Rakovac, Kordun, 11.6.2021., leg. Branko Jalžić.

Građa i anatomija odraslih, spolno zrelih jedinki: U obje linije grupirane su dimenzijom male gujavice duljine oko 40 mm, a širine oko 4 mm. Sastoje se od oko 100 kolutića. Boja crvenkasta, crvenija u anteriornom dorzalnom dijelu. Prostomij epiloban. Jedinke obje linije imaju 8 parova spermateka smještenih na 6/7-13/14, 4 sjemene vrećice smještenih unutar 9.-12. kolutića, a muški spolni otvor je na 27. kolutiću. Dva para sjemenika zatvoreni su u periezofagealnim testikularnim vrećama na 10. i 11. kolutiću. Klitelum kod L1 smješten je na 29-35, a stidna izbočina na 29-38, dok je klitelum kod L2 smješten na 28-35, a stidna izbočina 29-37.

VI) *Octodriloides kamnensis* (Baldasseroni, 1919)

1919 *Octolasium complanatus f. kamnensis* Baldasseroni, Ann. Mus. Civ. Genova, 8: 3

1969 *Octolasium (Octodrilus) karawankense* (syn.) Zicsi, Opusc. Zool. Budapest, 382, fig. 2

1991 *Octodriloides kamnensis*: Mršić, Acad. Sci. Art. Slov. (Hist. Nat.), 31: 458.

2012 *Octodriloides kamnensis*: Csuzdi, Opusc. Zool. Budapest, 43: 97–99.

Uzorci:

Linija 1 (L1) – (**HREW4-2, HREW4-4, HREW4-5, HREW4-7, HREW7-1, HREW11-2, HREW11-5**): Žumberak-Samoborsko gorje, 12.5.2016., leg. Mišel Jelić.

Linija 2 (L2) – (**HREW20-3, HREW20-5, HREW20-7, HREW21-5**): Kalnik, Varaždinska županija, 14.5.2016., leg. Mišel Jelić; (HREW60-6): Očura, Hrvatsko zagorje, 5.10.2017, leg. Mišel Jelić, Goran Klobučar, Lucija Hodak; (HREW79-5, HREW79-8, HREW79-9): Medvednica, Zagreb, 25.10.2017., leg. Mišel Jelić, Goran Klobučar, Lucija Hodak; (HREW125-11): Požeška gora, 2020. godina, leg. Tena Plavac; (HREW244-19): Medvednica, Zagreb, 15.5.2021., leg. Roman Ozimec.

Grada i anatomija odraslih, spolno zrelih jedinki: Obje linije gujavica imaju položaj kliteluma na 30-37, a stidnu izbočinu na 30-40. Unutar tijela nalazi se 7 parova sjemenih spremišta na 6/7-12/13 i 4 sjemene vrećice od 9.-12. kolutića, od kojih 3. po redu sjemena vrećica nije reducirana. Nepigmentirane su, imaju m.s.o na 26. kolutiću, a prva leđna pora je na 12/13 ili 13/14. Prostimij je epiloban. Dva para sjemenika zatvoreni su u periezofagealnim testikularnim vrećama na 10. i 11. kolutiću. Linije se razlikuju veličinom i brojem kolutića, pa tako su uzorci linije 1 (L1) duljine 56-126 mm, širine 5-7.5 mm i sastoje se od 88-217 kolutića. Uzorci L2 manji su dimenzijom, duljine 50-60 mm, širine 3.5-5.75 mm, a sastoje se od 98-160 kolutića.

VII) *Octodrilus bretscheri* Zicsi, 1969

1900 *Allolobophora nivalis* (part.) Bretscher, Rev. Suisse. Zool., 8: 442.

1965 *Octolasion croaticum* var. *nivalis* (part.): Zicsi, Opusc. Zool. Budapest, 5: 258.

1969 *Octodrilus bretscheri* (comb. n.) Zicsi, Nat. Jb. Stadt Linz, 72–75.

1991 *Octodrilus bretscheri*: Mršić, Acad. Sci. Art. Slov. (Hist. Nat.), 31: 369.

2012 *Octodrilus bretscheri*: Csuzdi, Opusc. Zool. Budapest, 43: 97–99.

Uzorci:

Linija 1 (L1) – (**HREW175-02, HREW175-03, HREW175-06 - HREW175-08**): Dankov ponor, Lipovo polje, Kosinjski jezero, 20.10.2021., leg. Roman Ozimec; (**HREW177-10**): Markov ponor, Lipovo polje, Kosinjski jezero, 13.9.2021., leg. Roman Ozimec; (**HREW204-09**): Paklenica, južni Velebit, 8.5.2021., leg. Roman Ozimec, Ivica Pakrac.

Linija 2 (L2) – **(HREW177-05)**: Markov ponor, Lipovo polje, Kosinj, 13.9.2021., leg. Stipe Tutiš.

Grada i anatomija odraslih, spolno zrelih jedinki: Gujavice obje linije male su veličinom, duljine 37-70 mm, širine 4-6 mm i sastoje se od 112-157 kolutića. Položaj kliteluma je na 28,29-36, a stidna izbočina je na 29-36. Prostimij je epiloban ili taniloban. Prva leđna pora je na 6/7, 7/8 i 13/14. M.s.o. je na 15. kolutiću. 6 parova spermateka nalaze se na 5/6-10/11, a 4 sjemenne vrećice smještene su na 9-12. Treća sjemenne vrećica u 11. kolutiću je nešto reducirana. Dva para sjemenika zatvoreni su u periezofagealnim testikularnim vrećama na 10. i 11. kolutiću. Linije se razlikuju prije svega po boji. Gujavice L1 su crveno-ljubičaste do crveno-sive boje, dok su gujavice L2 crveno-smeđe do smeđe.

VIII) *Octodrilus lissaensis* Michaelsen, 1891

1891 *Allolobophora lissaensis* Michaelsen, Jb. Hamb. Wiss, 8: 18.

1991 *Octodrilus lissaensis*: Mršić, Acad. Sci. Art. Slov. (Hist.Nat.), 31: 381.

2012 *Octodrilus lissaensis*: Csuzdi, Opusc. Zool. Budapest, 43: 97–99.

Uzorci:

Linija 1 (L1) – **(HREW156-01)**: Bjelolasica, Gorski kotar, 5.6.2019., leg. Olga Jovanović Glavaš

Linija 2 (L2) – **(HREW200-12, HREW203-01, HREW203-02, HREW204-02)**: Paklenica, južni Velebit, 8.5.2021., leg. Damir Basara, Ines Vuković, Roman Ozimec, Ivica Pakrac.

Linija 3 (L3) – **(HREW160-03)**: Piskovica, Cerovlje, Istra, 3.6.2021., leg. Roman Ozimec, Ines Vuković.

Linija 4 (L4) – **(HREW121-03)**: Hum, otok Lastovo, 26.2.2021., leg. Roman Ozimec; **(HREW124-01)**: Vela spilja, Vela luka, otok Korčula, 19.3.2021., leg. Roman Ozimec; **HREW134-02, HREW134-03**: Gornji Kamenjak, Istra, 2021. g.; leg. Davorka K. Hackenberger i Branimir Hackenberger; **(HREW139-01, HREW139-02)**: plaža Lokva, rt Kamenjak, 13.3.2020., Davorka K. Hackenberger i Branimir Hackenberger; **(HREW155-01)**: polje uz rijeku Mirnu, Istra, studeni 2020., leg. Davorka Hachenberger Kutuzović.

Linija 5 (L5) – **(HREW150-01)**: Trsteno, Vila Nardeli, Dubrovačko primorje, 22.12.2020., leg. Roman Ozimec; **(HREW166-01, HREW166-03)**: Betina velika, Kokorići, Vrgorac, 9.10.2020., leg. Roman Ozimec; **(HREW167-08)**: Pazinski ponor, Pazin, Istra, 6.6.2021., leg. Roman Ozimec, Ines Vuković; **(HREW172-01)**: Cerovac, Njivice, otok Krk, 6.6.2021., leg. Roman Ozimec

Linija 6 (L6) – (**HREW94-19, HREW94-34, HREW94-36, HREW94-38, HREW94-38, HREW94-41, HREW94-46 - HREW94-48, HREW94-59, HREW94-63, HREW94-68, HREW94-77 - HREW94-79, HREW94-89**): Bela vodica, Risnjak, Gorski kotar, 2.11.2018., leg. Mišel Jelić

Linija 7 (L7) – (**HREW104-01, HREW105-08, HREW105-11**): Seline, Paklenica, južni Velebit, 4.11.2018., leg. Mišel Jelić; (**HREW136-01**): rt Kamenjak, Istra, 1.11.2021., Davorka K. Hackenberger i Branimir Hackenberger.

Linija 8 (L8) – (**HREW119-02, HREW119-03 – HREW119-06**): Samograd spilja, Račišće, otok Korčula, 16.12.2020., leg. Roman Ozimec.

Grada i anatomija odraslih, spolno zrelih jedinki: Gujavice su raznolike veličinom, pigmentacijom, brojem kolutića i položajem kliteluma i stidne izbočine. Dimenzijom su to male do srednje velike gujavice, kod svih linija. Duljina se kreće od 30-155mm, širina od 3.6-8 mm. Broj kolutića kreće se od 100-196. Smještaj prve leđne pore varira i može se pronaći od 5/6-13/14. Prostomij je epiloban. M.s.o. je kod svih na 15. kolutiću. Stidna izbočina prati klitelum, a nalaze se na 28,29-36. Šest parova spermateka protežu se od 5/6 do 10/11, a 4 sjemenne vrećice su od 9.-12. kolutića. Dva para sjemenika zatvoreni su u periezofoagealnim testikularnim vrećama na 10. i 11. kolutiću.

IX) *Octodrilus* sp. 1

Uzorci: (**HREW100-01**): rt Kamenjak, Istra, 3.11.2018., leg. Mišel Jelić; (**HREW132-01 - HREW132-03**): rt Kamenjak, Istra, 13.3.2020., Davorka K. Hackenberger i Branimir Hackenberger; (**HREW133-01 - HREW133-03**): rt Kamenjak, Istra, Davorka K. Hackenberger i Branimir Hackenberger; (**HREW134-04**): rt Kamenjak, Istra, 2021. g., Davorka K. Hackenberger i Branimir Hackenberger

Grada i anatomija odraslih, spolno zrelih jedinki: Dimenzijom su male gujavice duljine 27-50 mm, širine 3.5-4.8 mm. Broj kolutića se kreće od 126-150. Sivkasto-crvenkaste su pigmentacije. Prostomij je epiloban. M.s.o. je na 15. kolutiću. Klitelum i stidna izbočina protežu se od 29. do 37. kolutića. 6 parova spermateka smješteno je od 5/6 do 10/11, a treća od ukupno 4 sjemenih vrećica je reducirana.

X) *Octodriloides janetscheki*, Zicsi, 1970

1970 *Octolasium (Octodrilus) janetscheki* Zicsi, Opusc. Zool. Budapest, 10(1): 171.

1991 *Octodriloides janetscheki*: Mršić, Acad. Sci. Art. Slov. (Hist. Nat.), 31: 450.

2012 *Octodriloides janetscheki*: Csuzdi, Opusc. Zool. Budapest, 43: 97–99.

Uzorci: (**HREW4-8, HREW4-11, HREW4-12**): Žumberak-Samoborsko gorje, 12.5.2016., leg. Mišel Jelić; (**HREW67-3, HREW67-12**): Petrinjčica, Petrinja, Banovina, 18.10.2017., leg. Mišel Jelić.

Grada i anatomija odraslih, spolno zrelih jedinki: Gujavice su duljine 47-60 mm, širine 2.5-3.5 mm. Broj kolutića je 137-151. Gujavice su nepigmentirane, epilobnog prostomija, s leđnom porom na 4/5. M.s.o. je na 27. kolutiću. Klitelum je smješten na 28,29-36, a stidna izbočina na 28,29-39. Osam parova spermateka smješteno je na 6/7-13/14. Četiri sjemene vrećice smještene su na 9-12, treća po redu je reducirana. Dva para sjemenika zatvoreni su u periezofoagealnim testikularnim vrećama na 10. i 11. kolutiću.

XI) *Octodrilus slovenicus*, Zicsi, 1970

1972 *Octolasium mima* var. *slovenica* Karaman, Biol. Vestn., 20: 102.

1991 *Octodrilus slovenicus*: Mršić, Acad. Sci. Art. Slov. (Hist. Nat.), 31: 428.

2012 *Octodrilus slovenicus*: Csuzdi, Opusc. Zool. Budapest, 43: 97–99.

Uzorci: (**HREW6-1, HREW12-1, HREW12-2, HREW14-1 – HREW14-3**): Žumberak-Samoborsko gorje, 12.5.2016., leg. Mišel Jelić.

Grada i anatomija odraslih, spolno zrelih jedinki: Dimenzijom velike gujavice duljine 160-190 mm, širine 11-12 mm. Broj kolutića kreće se oko 260. Gujavice su smečkaste boje, epilobnog prostomija, s leđnom porom na 13/14. M.s.o. je na 15. kolutiću. Klitelum je smješten na 28-39,40, a stidna izbočina na 29,30-39. Pet parova spermateka smješteno je na 6/7-10/11, a četiri sjemene vrećice na 9-12. Dva para sjemenika zatvoreni su u periezofoagealnim testikularnim vrećama na 10. i 11. kolutiću.

XII) *Octodrilus complanatus*, Dugès, 1828

1828 *Lumbricus complanatus* Dugès, Ann. Sci. Nat., 15: 289.

1972 *Octodrilus complanatus*: Bouché, Nat. Inst. Rech. Agron., 311.

1991 *Octodrilus complanatus*: Mršić, Acad. Sci. Art. Slov. (Hist. Nat.), 31: 398.

2012 *Octodrilus complanatus*: Csuzdi, Opusc. Zool. Budapest, 43: 97–99.

Uzorci:

Linija 1 (L1) – **(HREW100-01)**: rt Kamenjak, Istra, 3.11.2018., leg. Mišel Jelić ; **(HREW128-01)**: rt Kamenjak, Istra, 2021.g., Davorka K. Hackenberger i Branimir Hackenberger; **(HREW138-01)**: rt Kamenjak, Istra, 13.3.2020., Davorka K. Hackenberger i Branimir Hackenberger; **(HREW160-02)**: Piškovica, Cerovlje, Istra, 3.6.2021., leg. Roman Ozimec, Ines Vuković; **(HREW179-01)**: Stari grad Pag, otok Pag, kolovoz 2021., leg. Göran Klobučar.

Linija 2 (L2) – **(HREW105-01)**: Seline, Paklenica, južni Velebit, 4.11.2018., leg. Mišel Jelić.

Linija 3 (L3) – **(HREW118-01)**: Istruga kanjon, Brna-Smokvica, otok Korčula, 16.12.2020., leg. Roman Ozimec; **(HREW105-02 – HREW105-07, HREW105-09, HREW105-10)**: Seline, Paklenica, južni Velebit, 4.11.2018., leg. Mišel Jelić.

Linija 4 (L4) – **(HREW44-1)**: Gornje Jelenje, Risnjak, Gorski kotar, 2016. g., leg. Davorka Hackenberger Kutuzović; **(HREW57-1, HREW57-2)**: Momjan, Buje, Istra, 7.5.2017., leg. Mišel Jelić; **(HREW98-08)**: Karsko, Učka, Istra, 3.11.2018., leg. Mišel Jelić; **(HREW103-01)**: Merag, otok Cres, 4.11.2018., leg. Mišel Jelić; **(HREW117-01, HREW117-02)**: Prvača špilja, Kolašac, Kistanje, Dalmatinska zagora, (19.7.2018., 23.6.2019.), leg. Roman Ozimec; **(HREW156-02)**: Bjelolasica, Gorski kotar, 5.6.2019., Olga Jovanović Glavaš; **(HREW160-01, HREW160-04)**: Piškovica, Cerovlje, Istra, 3.6.2021., Roman Ozimec, Ines Vuković; **(HREW168-01, HREW169-01, HREW174-01)**: otok Krk, 6.6.2021., leg. Roman Ozimec; **(HREW199-02, HREW199-04)**: Anića kuk, Paklenica, južni Velebit, 7.5.2021., leg. Damir Basara, Ines Vuković; **(HREW202-01)**: uz potok Velika Paklenica, Paklenica, južni Velebit, 9.5.2021., leg. Damir Basara, Ines Vuković; **(HREW204-01, HREW204-05, HREW205-02 - HREW205-04)**: Paklenica, južni Velebit, 8.5.2021., leg. Roman Ozimec, Ivica Pakrac; **(HREW207-01, HREW207-08)**: Paklenica, južni Velebit, 14.7.2021., leg. Mišel Jelić, Ivica Pakrac, Marko Stančin, Dino De Bona.

Grada i anatomija odraslih, spolno zrelih jedinki: Raznolika skupina gujavica po svim obilježjima osim po broju i smještaju spermateka i sjemenih vrećica, položaju muškog spolnog

otvora, oblika prostomija i tipu testikularnih vreća. Dimenzijom su srednje i velike gujavice duljine 87-220 mm, širine 8.5-13 mm. Broj kolutića kreće se od 182-296. Prostomij je epiloban, muški spolni otvor otvara se na 15. kolutiću. Leđna pora je na 12/13 ili na 13/14. Pigmentacija je siva, sivo-smeđa, smeđa i ljubičasto-smeđa. Klitelum je smješten na 28,29-38,39,40, a stidna izbočina na 29,30-39,40,41. Sedam parova spermateka smješteno je od 6/7-12/13, četiri sjemenne vrećice nalaze se od 9.-12 kolutića. Dva para sjemenika zatvorena su u ezofagealnim testikularnim vrećama na 10. i 11. kolutiću.

XIII) *Octodrilus sp. 2*

Uzorci: (HREW92-02): Traven vrh, Delnice, Gorski kotar, 2.11.2018., leg. Mišel Jelić.

Grada i anatomija odraslih, spolno zrelih jedinki: Uzorak je juvenilni, pa smještaj kliteluma, stidne izbočine, muškog spolnog otvora i broj sjemenih mjehurića nije vidljiv. Gujavica je 111 mm veličine, 7 mm širine i široko sparenih četina. Sivkaste je pigmentacije. Prva leđna pora otvara se na 13/14. Prostomij je epiloban. Šest nerazvijenih parova spermateka smješteno je na 5/6-10/11.

XIV) *Octodrilus croaticus*, Rosa, 1895

1895 *Allolobophora lissaensis var. croatica* (part.) Rosa, Boll. Mus. Torino, 10(21): 5.

1991 *Octodrilus croaticus*: Mršić, Acad. Sci. Art. Slov. (Hist. Nat.) 31: 393.

2012 *Octodrilus croaticus*: Csuzdi, Opusc. Zool. Budapest, 43: 97–99.

Uzorci: (HREW219-01): Velesova jama, Jelov klanac, Rakovica, Kordun, 12.6.2021., leg. Branko Jalžić.

Grada i anatomija odraslih, spolno zrelih jedinki: Dimenzijom mala gujavica duljine 35 mm, širine 4 mm. Broj kolutića je 96. Prostomij je taniloban, prva leđna pora je na 5/6. Crveno-ljubičaste je boje. Položaj kliteluma i stidne izbočine je 28-35. Šest parova spermateka smješteno je na 5/6-10/11, a četiri sjemenne spremišta na 9-12.

XV) *Octodrilus sp. 3*

Uzorci: (HREW199-01): Anića kuk, Paklenica, južni Velebit, 7.5.2021., leg. Damir Basara, Ines Vuković; **(HREW206-01 – HREW206-03):** Mokraća špilja, Paklenica, južni Velebit, 8.5.2021.,

leg. Roman Ozimec, Ivica Pakrac; (HREW207-04): Paklenica, južni Velebit, 14.7.2021., leg. Mišel Jelić, Ivica Pakrac, Marko Stančin, Dino De Bona

Grada i anatomija odraslih, spolno zrelih jedinki: Dimenzijom male gujavice veličine 38-56 mm, širine 3-6 mm. Broj kolutića kreće se od 68-146. Prva leđna pora je na 5/6, prostomij je taniloban, a m.s.o. se otvara na 15. kolutiću. Pigmentacija je crveno-ljubičasta. Položaj kliteluma je 28,29-36, a stidna izbočina 29-37. Šest parova spermateka smješteno je na 5/6-10/11.

4.2. Genska udaljenost izdvojenih linija

Analizom filogenetskog stabla prema stupnju podržanosti i genskoj udaljenosti grana, izdvojeno je 28 linija: 5 koje pripadaju rodu *Octodriloides* i 23 koje pripadaju rodu *Octodrilus*. Izdvojenim grupiranim linijama izračunate su međusobne genske udaljenosti prema Kimura-2-parametar (K2P) modelu (tablica 4).

Tablica 4. K2P genska udaljenost grupiranih linija iz eksperimentalno određenih sekvenci.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
1 Octodriloides_kamnensis_L1																											
2 Octodriloides_janetscheki	0.229																										
3 Octodrilus_slovenicus	0.253	0.245																									
4 Octodriloides_kamnensis_L2	0.153	0.229	0.259																								
5 Octodrilus_transpadanus	0.267	0.267	0.264	0.259																							
6 Octodrilus_complanatus_L4	0.243	0.202	0.229	0.252	0.269																						
7 Octodrilus_tergestinus	0.238	0.217	0.252	0.217	0.226	0.229																					
8 Octodriloides_kovacevici_L1	0.223	0.230	0.272	0.244	0.273	0.252	0.244																				
9 Octodrilus_sp_2	0.239	0.245	0.297	0.239	0.273	0.253	0.226	0.196																			
10 Octodrilus_lissaensis_L6	0.245	0.220	0.253	0.234	0.240	0.254	0.234	0.247	0.231																		
11 Octodrilus_mimus	0.233	0.236	0.289	0.228	0.244	0.229	0.167	0.269	0.261	0.225																	
12 Octodrilus_complanatus_L1	0.244	0.186	0.212	0.232	0.227	0.149	0.205	0.236	0.234	0.207	0.216																
13 Octodrilus_sp_1	0.263	0.230	0.257	0.232	0.269	0.224	0.211	0.266	0.243	0.217	0.243	0.218															
14 Octodrilus_lissaensis_L7	0.244	0.260	0.240	0.248	0.285	0.263	0.236	0.251	0.250	0.245	0.258	0.235	0.240														
15 Octodrilus_complanatus_L2	0.265	0.226	0.210	0.229	0.255	0.172	0.204	0.293	0.261	0.261	0.249	0.134	0.211	0.264													
16 Octodrilus_complanatus_L3	0.258	0.219	0.239	0.247	0.241	0.182	0.217	0.273	0.260	0.227	0.222	0.138	0.236	0.263	0.182												
17 Octodrilus_istrianus	0.233	0.224	0.253	0.216	0.242	0.246	0.128	0.254	0.253	0.254	0.185	0.209	0.243	0.232	0.238	0.214											
18 Octodrilus_lissaensis_L4	0.243	0.229	0.248	0.231	0.254	0.233	0.230	0.300	0.283	0.138	0.245	0.242	0.259	0.250	0.251	0.264	0.246										
19 Octodrilus_lissaensis_L5	0.251	0.229	0.243	0.245	0.262	0.266	0.232	0.262	0.224	0.130	0.256	0.218	0.235	0.247	0.230	0.242	0.246	0.167									
20 Octodrilus_lissaensis_L1	0.257	0.263	0.247	0.229	0.257	0.262	0.234	0.279	0.246	0.213	0.227	0.221	0.236	0.262	0.237	0.239	0.214	0.199	0.199								
21 Octodrilus_lissaensis_L3	0.273	0.235	0.233	0.254	0.284	0.262	0.272	0.248	0.217	0.185	0.274	0.226	0.248	0.251	0.258	0.244	0.257	0.230	0.173	0.259							
22 Octodrilus_bretscheri_L1	0.227	0.228	0.248	0.227	0.272	0.224	0.252	0.263	0.271	0.215	0.233	0.239	0.224	0.253	0.231	0.232	0.266	0.220	0.239	0.242	0.240						
23 Octodrilus_bretscheri_L2	0.228	0.246	0.236	0.254	0.292	0.248	0.267	0.291	0.270	0.255	0.265	0.243	0.253	0.260	0.258	0.261	0.237	0.239	0.264	0.248	0.274	0.210					
24 Octodrilus_sp_3	0.224	0.243	0.242	0.248	0.244	0.226	0.216	0.267	0.218	0.249	0.254	0.217	0.231	0.246	0.244	0.258	0.234	0.266	0.242	0.244	0.273	0.231	0.257				
25 Octodrilus_lissaensis_L2	0.215	0.231	0.250	0.217	0.259	0.246	0.232	0.240	0.239	0.199	0.249	0.232	0.238	0.233	0.260	0.248	0.248	0.211	0.194	0.229	0.203	0.216	0.256	0.228			
26 Octodrilus_kovacevici_L2	0.227	0.235	0.271	0.236	0.254	0.282	0.250	0.197	0.265	0.239	0.306	0.240	0.281	0.275	0.272	0.249	0.278	0.268	0.260	0.278	0.302	0.268	0.308	0.300	0.240		
27 Octodrilus_croaticus	0.243	0.222	0.257	0.261	0.263	0.236	0.256	0.216	0.184	0.222	0.244	0.222	0.255	0.233	0.252	0.264	0.254	0.247	0.242	0.214	0.223	0.241	0.265	0.212	0.238	0.293	
28 Octodrilus_lissaensis_L8	0.270	0.250	0.252	0.247	0.282	0.259	0.240	0.267	0.246	0.250	0.261	0.268	0.239	0.234	0.257	0.247	0.244	0.245	0.230	0.237	0.242	0.229	0.260	0.250	0.265	0.295	0.262

5. Rasprava

Metoda DNA barkodiranja neophodna je u ovom istraživanju gdje je determinacija vrsta gujavica prema građi onemogućena ili otežana zbog: **a.** juvenilnih primjeraka kojima je nemoguće odrediti vrstu zbog izostanka spolnih obilježja ključnih za identifikaciju; **b.** oštećenih i/ili loše očuvanih primjeraka i njihovih ostataka; **c.** primjeraka iste vrste s izuzetnim genetičkim divergencijama čije se morfološke osobine preklapaju, zbog čega se ne mogu razdvojiti u dvije zasebne (pod)vrste (tzv. kriptične vrste) (Chang i sur., 2009; Porco i sur., 2013).

Na temelju dosadašnjih analiza može se zaključiti da je fauna Hrvatske vrlo bogata vrstama gujavica (Mršić, 1991; Hackenberger K. i Hackenberger K., 2013). U Hrvatskoj do sada nije provedena nijedna filogenetska analiza raznolikosti gujavica rodova *Octodrilus* i *Octodriloides*. Potrebno je naglasiti da u bazama sekvenci poput BOLD i GenBank baze, javno dostupnih DNA sekvenci rodova *Octodrilus* i *Octodriloides* s područja Hrvatske gotovo i nema, zbog čega je ovo molekularno istraživanje prvo takve vrste na spomenutim rodovima u Hrvatskoj.

Na filogenetskom stablu (slika 39.) izdvojeno je 28 linija koje predstavljaju potencijalne vrste i/ili podvrste rodova *Octodrilus* i *Octodriloides*. 25 linija uvršteno je u 12 dosadašnjih opisanih vrsta, od kojih 5 čine komplekse najmanje dviju linija. Primjerci triju izdvojenih linija nisu svrstani u opisane vrste zbog toga što su jedinstveni ili po građi, jer uporabom determinacijskih ključeva ne vode do opisanih vrsta (**IX** i **XV**), ili zbog juvenilnog stadija primjerka u kojemu je determinacija vrste nemoguća (**XIII**). 25 linija s genski značajnim udaljenostima (12.8%-30.8%, tablica 4) uvršteno je u samo 12 opisanih vrsta, što dokazuje tvrdnju studija na gujavicama da je genska raznolikost unutar istraživanih rodova puno veća nego što bi se to na temelju građe moglo dokazati (Chahartaghi 2007; King i sur. 2008; Pérez-Losada i sur., 2009; James i sur., 2010; Porco i sur., 2013).

Prilična genetička raznolikost rodova *Octodrilus* i *Octodriloides* na području Dinarida, koje obuhvaća i teritorij Hrvatske, posljedica je očuvanosti tla koje nije bilo zahvaćeno oledbom tijekom posljednjeg ledenog doba (Hewitt, 2000) te je postalo jedan od centara divergencije spomenutih rodova (Mršić, 1991; Csuzdi i sur., 2003). Zanimljivo je kako se najveći broj vrsta i linija roda *Octodrilus* nalazi se na području rta Kamenjaka i Paklenice, gdje su gujavice pronađene na izoliranim mikrostaništima s malo tla. Staništa na Karpatima i južnim Alpama, tj. na preostalim

centrima divergencije roda *Octodrilus*, ne razlikuju se previše od staništa Dinaridskih Alpa s obzirom da imaju slične vegetacijske pojaseve (Condé i Richard, 2002). Apomorfija vrsta rodova *Octodrilus* i *Octodriloides* je veliki broj spermateka (5 parova i više). Kako spomenuti rodovi čine monofiletsku skupinu (Dominguez, 2015), velik broj spermateka vjerojatno je ekološka adaptacija gujavica te skupine na izolirana staništa s malo tla i dugim nepovoljnim vremenskim razdobljima (oštre zime i/ili suha ljeta), pa veliki broj spermateka i sjemenih vrećica (4) osigurava dovoljnu pohranu i proizvodnju sjemena za kopulacije tijekom vremenski kratkih razdoblja, povoljnih za izlazak gujavica.

S obzirom na ključnu ulogu gujavica u ekosustavu tla, potrebno je bolje razumijevanje kriptične raznolikosti kako bi se istražio ekološki značaj divergentnih linija unutar ekosustava (Sechi, 2013). Potrebno je napomenuti da je u ovom istraživanju korišten samo jedan molekularni biljeg (COI) i pomoću njega se ne mogu pouzdano utvrditi hijerarhijski odnosi vrsta rodova *Octodrilus* i *Octodriloides*, kao niti monofiletsko podrijetlo pojedinog roda. Molekularno istraživanje na markerima 16S i COI koje su proveli Pop i sur. (2008) na skupini „*Octolasion* sensu lato” koja uključuje rodove *Octodrilus*, *Octodriloides* i *Octolasion*., pokazala je odvojenost rodova *Octodrilus* i *Octodriloides* od roda *Octolasion*. Međutim, vrste roda *Octodriloides* raspršene su po filogenetskom stablu, tj. ne formiraju jedinstvenu podržanu grupu, slično kao i u ovom istraživanju koji je izveden na jednom molekularnom biljegu. Zbog toga je promjena položaja muškog spolnog otvora kod roda *Octodriloides* vjerojatno rezultat homoplazije tijekom evolucije, a ne jedinstvena sinapomorfija roda (Pop i Wink 2004; Pop i sur. 2008). Za jasniju sliku o filogenetskim odnosima u slučaju velikih genetskih divergencija potrebno je koristiti kombinirane tj. spojene (eng. *concatenated*) sekvence veće od 2000 parova baza (Chang 2011). Kombinirane sekvence uključuju gene s različitim evolucijskim stopama mutacija (Martin i sur., 2000) kao što su nuklearne 18S i 28S rRNA, mitohondrijske 16S i 12S rRNA, te mitohondrijske citokrom oksidaza podjedinice 1 (COI) i 2 (COII), NADH podjedinica 1 (ND1) i tRNA geni.

Konsenzus među publiciranim radovima implicira da se dva primjerka gujavica mogu smatrati odvojenim vrstama ako im je genska distanca izračunata Kimura 2-parametrom veća od 15%, i ako postoje morfološke razlike između sestrinskih linija kada je vrijednost genske distance 9-15% (Chang, 2011). Najveća genska distanca između linija u ovom istraživanju iznosi 30.8%, dok je najmanja 12.8% (tablica 4).

Eksperimentalno dobivene sekvence roda *Octodrilus* grupirane su u 9 opisanih vrsta (**I, II, III, IV, VII, VIII, XI, XII, XIV**), od kojih 3 čine komplekse potencijalnih vrsta (**VII, VIII, XII**), i 3 neodređenih vrsta (**IX, XIII, XV**).

Vrsta *Oc. transpadanus* (Rosa, 1884) široko je rasprostranjena po južnoj, središnjoj i jugoistočnoj Europi. Jedinke te vrste variraju dimenzijama i brojem kolutića. Morfološke i anatomske osobine primjeraka iz ovog istraživanja po svim kriterijima slažu se s opisom vrste i grupiraju se u jedinstvenu skupinu vrijednosti samoučitanja 100.

Primjerci determinirani kao *Oc. mimus* (Rosa 1889) uzorkovani na Učki čine jedinstvenu podržanu skupinu ($p=100$) koja je sestrinska skupina primjercima vrste *Oc. istrianus* i *Oc. tergestinus*. Po determinacijskom ključu ErIK, odrasli spolno zreli primjerci odgovaraju vrsti *Oc. mimus*, a distinktivni su po manjim dimenzijama te velikom broju kolutića koji kod nekih doseže broj 305. Primjerci s Učke grupiraju se na drugom mjestu na filogenetskom stablu, i ne čine podržanu grupu s primjercima iz istraživanja Csuzdi i sur. (2018) koji su uzorkovani u okolici Udina, u blizini tipskog lokaliteta vrste *Oc. mimus*. Osobine poput položaja kliteluma i stidne izbočine te broja spermateka variraju unutar vrste *Oc. mimus*. Mršić (1991) je u svojoj monografiji vrste *Oc. mimus* i *Oc. marenzelleri* sinonimizirao u vrstu *Oc. mimus* jer nije mogao pronaći jasnu karakteristiku u vanjskoj građi i anatomiji koja bi odvajala te dvije vrste, ali je u monografiji upotrijebio podatke drugih autora o vrsti *Oc. marenzelleri*. Pa je tako Učka jedan od lokaliteta na kojem je rasprostranjena jedna od „podvrsta“ *Oc. marenzelleri* (slika 33., dolje desno), a karakteristike te vrste po položaju kliteluma, stidne izbočine i broju spermateka potpuno odgovaraju uzorcima s Učke iz ovog istraživanja (**HREW99-01 – HREW99-05**). Prema tome, ne samo da je ovom analizom dokazana prisutnost vrste *Oc. marenzelleri* u Hrvatskoj, već je i filogenetski dokazana razdvojenost vrsta *Oc. mimus*, čiji su primjerci uzorkovani u blizini tipskog lokaliteta u Italiji, i *Oc. marenzelleri* čiji je tipski lokalitet u Sloveniji i čija distribucija pokriva teritorij Hrvatske. Prisutnost vrste *Oc. mimus* u Hrvatskoj je upitna dok se ne pronađu i barkodiraju primjerci u Hrvatskoj koji će se filogenetski grupirati s talijanskim primjercima vrste *Oc. mimus*.

Svi primjerci vrste *Oc. istrianus* (Mršić, 1991) koji se grupiraju u ovu skupinu uzorkovani su na tipskom lokalitetu vrste *Oc. istrianus* i po položaju kliteluma, stidne izbočine, broju spermateka i pigmentaciji odgovaraju opisu vrste. Kao i kod *Oc. mimus*, primjerci su distinktivni po tome što su dimenzijom manji, a imaju veći broj kolutića (307-340) nego što stoji u opisu (240-

275) (Mršić, 1991). Potrebno je izvršiti provjeru oblika testikularnih vreća na primjercima. Mršić (1991) navodi da jedinke ove vrste imaju ezofagealni tip testikularnih vreća, pa ako je tip testikularne vreće genetski uvjetovan, očekivali bismo da se primjerci grupiraju s vrstom *Oc. complanatus*, čiji primjerci također posjeduju ezofagealni tip testikularnih vreća. Međutim, vrste *Oc. tergestinus* i *Oc. mimus* grupiraju se s *Oc. istrianus* i čine podržanu grupu ($p=83$), a imaju periezofagealni tip testikularnih vreća.

Primjerci vrste *Oc. tergestinus* (Michaelsen, 1910) uzorkovani su na nekoliko lokaliteta u Istri. Korektna determinacija ove vrste može biti izvedena samo na potpuno odraslim jedinkama čiji su se klitelum i spolna izbočina razvili do kraja (Zicsi 1981). Spolnu izbočinu i djelomično klitelum do 44. kolutića pokazuje primjerak **HREW95-01**. Primjerci s ovog istraživanja grupiraju se s primjercima iz istraživanja Csuzdi i sur. (2018) koji su determinirani kao *Oc. tergestinus*, ali i s primjercima uzorkovanih na Brijunima i Žlepčarima koji su u radu Csuzdi i sur. (2018) determinirani kao *Oc. istrianus*. Iako spomenuti uzorci s Brijuna i Žlepčara čine odvojeni i podržani ogranak, on je i dalje unutar skupine *Oc. tergestinus* i odvojen je od skupine *Oc. istrianus* koju čine primjerci uzorkovani na rtu Kamenjaku - tipskom lokalitetu vrste *Oc. istrianus*.

Nekoliko primjeraka vrste *Oc. bretscheri* (Zicsi, 1969) pronađeno je u Lici na dva lokaliteta, a prema položaju kliteluma, stidne izbočine, broju i obliku sjemenih vrećica, obliku prostomija (epiloban i taniloban), pigmentaciji i dužini odgovaraju opisu vrste. Razlikuju se po tome što imaju nešto veći broj kolutića i varijabilan smještaj prve leđne pore. Broj spermateka u literaturi je nejasan jer se u Mršićevoj (1991) monografiji na nekoliko mjesta govori o drugačijem broju (5 ili 6 parova). Primjerci ovog istraživanja imaju 6 parova spermateka na položaju 5/6-10/11. Grupaciju čini nepodržani kompleks od dvije linije, u kojem se jedna linija grupira s uzorcima iz Hercegovine (BiH). Kako bi se dobio bolji uvid u vrstu, potrebno je sekvencirati holotip ili neotip s tipskog lokaliteta (Jochpass, Švicarska) i usporediti ga s primjercima iz ovog istraživanja.

S obzrom na broj linija, vrsta *Oc. lissaensis* (Michaelsen, 1891) je najkompleksnija. Korištenjem determinacijskog ključa, primjerci svih linija (L1-L8) odgovaraju vrsti *Oc. lissaensis*. Linije unutar kompleksa međusobno imaju malu ili srednju vrijednost samoučitanja (24-74). Linije 7 i 8 (L7 i L8) odvojene su od ostalih linija (L1-L6) na filogenetskom stablu i po genskoj distanci (22%-26%), a distinktivne su i po boji (smeđa, siva i smeđe-siva), položaju prve leđne pore (11/12,

12/13 i 13/14), većem broju kolutića i nešto većim dimenzijama. Gujavice prvih 6 linija su crvenkaste, smeđe-crvene ili crveno-ljubičaste pigmentacije, položaj prve leđne pore kreće se od 5/6 – 9/10, manje su dimenzijom s manjim brojem kolutića. Svi primjerci svih linija imaju isti broj i položaj spermateka i sjemenih vrećica. Tipiski lokalitet vrste je na otoku Visu (Michaelsen, 1903). DNA barkodiranjem primjeraka vrste *Oc. lissaensis* uzorkovanih na Visu i usporedbom s rezultatima ovog istraživanja potvrdili bi postojeću ili novoutvrđenu liniju kao originalnu, tj. pripadajuću za spornu vrstu, pri čemu bi ostale linije unutar kompleksa vjerojatno dobile status podvrste ili vrste.

Primjerci skupine *Octodrilus* sp. 1 uzorkovani su na rtu Kamenjaku i prema vanjskim obilježjima (položaj kliteluma i stidne izbočine) odgovaraju opisu vrste *Oc. transpadanus*. Međutim, sekcijom je otkriveno da primjerci imaju 5 ili 6 parova sjemenih spremišta, umjesto isključivo 5 parova kao kod vrste *Oc. transpadanus*. Gujavice su crvenkaste pigmentacije i nešto su manjih dimenzija (27-50 mm), naspram 40-450 mm kod vrste *Oc. transpadanus*. Skupina bi mogla pripadati vrsti *Oc. transpandanoides* jer pigmentacijom, dimenzijama, brojem kolutića, smještajem kliteluma i stidne izbočine odgovara opisu te vrste. Primjerci *Octodrilus* sp. 1 imaju reduciranu treću sjemenu vrećicu, dok kod *Oc. transpandanoides* ona nedostaje. *Oc. transpandanoides* nije zabilježena u Hrvatskoj prema Hackenberger K. i Hackenberger K. (2013), tipiski lokalitet joj je u Italiji (S. Bortolo Setto), a nekoliko nalaza zabilježeno je u susjednoj Sloveniji.

Primjerci vrste *Oc. slovenicus* (Karaman, 1972) uzorkovani su na Žumberak-Samoborskom gorju, 20-40 kilometara udaljeno od sva tri tipska lokaliteta (Dolenjska, Slovenija). Sve morfološke i anatomske karakteristike odgovaraju autorskom opisu vrste koju navodi Mršić (1991) u svojoj monografiji. U istraživanju koje su proveli Csuzdi i sur. (2018), primjerci klasificirani kao vrsta *Oc. slovenicus* uzorkovani su u okolici grada Vicenze (Italija), što je 300-tinjak kilometara udaljeno od tipskih lokaliteta spomenute vrste. Zajedno s vrstom *Oc. pseudocomplanatus*, *Oc. slovenicus* na filogenetskom stablu u istraživanju Csuzdi i sur. (2018) tvori sestrinsku skupinu s grupom kojeg čine vrste *Oc. istrianus* i *Oc. tergestinus* ($p=0.69$). Na filogenetskom stablu ovog istraživanja, sestrinska skupina vrste *Oc. slovenicus* je *Oc. mimus* ($p=0.55$), čiji su primjerci uzorkovani u blizini njegovog tipskog lokaliteta (Udine, Italija) pa je filogenetski položaj vrste *Oc. slovenicus* sporan.

Kompleks vrste *Oc. complanatus* (Dugès, 1828) u ovom istraživanju čini podržanu grupu ($p=74$) četiriju linija, u koju su svrstani i primjerci iz francuske Korzike. Svim primjercima zajednička je smeđa i smeđe-siva boja, ezofagealni tip testikularnih vreća, stidna izbočina koja se kod većine nastavlja na nekoliko kolutića nakon kliteluma, položaj prve leđne pore na 12/13 ili 13/14 i sedam parova spermateka od 6/7-12/13. Među linijama ne postoji jasna osobina u građi gujavica koja će izdvojiti pojedinu liniju od ostalih. Pa tako položaj kliteluma i stidne izbočine, koji su jedni od ključnih osobina za diferencijaciju vrsta, varira od jedinke do jedinke unutar linija. Mršić (1991) je opisao vrstu *Oc. velebiticus* prema točno određenom položaju kliteluma (29-39) i stidne izbočine (30-39). Iako među uzorcima postoje jedinke koje odgovaraju opisu vrste *Oc. velebiticus*, poput **HREW-179-01**, one se ne grupiraju u zasebnu monofiletsku grupu unutar *Oc. complanatus* kompleksa.

Izdvojenu liniju *Octodrilus* sp. 2 čini jedan juvenilni primjerak (**HREW92-02**) uzorkovan na Risnjaku. Nisu mu razvijena spolna obilježja. Sekcijom se mogu izbrojiti šest nerazvijenih parova spermateka na 5/6-10/11, koliko ih na tom položaju imaju vrste *Oc. lissaensis*, *Oc. croaticus* i *Oc. bretscheri*. Kako je dužina jedinke 111 mm, a još nije spolno zrela, mogla bi pripadati vrsti *Oc. oesophagus*, koja ima isti broj i položaj spermateka, većih je dimenzija, a tipski lokalitet na Snežniku u Sloveniji (slika 32) udaljen je 30-ak kilometara od mjesta uzorkovanja primjerka **HREW92-02**.

Izdvojenu liniju *Oc. croaticus* (Rosa, 1895) također čini jedan primjerak, ali odrasli. Uzorkovan je na ulazu u jamu pokraj naselja Rakovica, 10-ak kilometara od Plitvica za koje se smatra da je tipsko stanište vrste. Male dimenzije, crvena pigmentacija, široko sparene četine i m.s.o. na 15. kolutiću karakteristične su za neke vrste roda *Dendrobaena*, no posjedovanje 6 parova sjemenih spremišta nedvojbeno svrstava ovaj primjerak u rod *Octodrilus*. Klitelum i stidna izbočina primjerka smješteni su od 28. pa do tek 35. kolutića, što je osim dimenzija i crvenoljubičaste pigmentacije, karakteristično samo za ovu vrstu.

Primjerci grupe *Octodrilus* sp. 3 uzorkovani su u Paklenici (južni Velebit) i dimenzijama, pigmentaciji, broju i položaju spermateka i sjemenih vrećica, tanilobnom obliku prostomija te smještaju prve leđne pore nalikuju vrsti *Oc. croaticus*. Međutim, položaj kliteluma (28,29-36) i stidne izbočine (29-36,37) razlučuje ih od te vrste, a u determinacijskim ključevima njihov opis ne odgovara niti jednoj opisanoj vrsti za Hrvatsku.

Eksperimentalno dobivene sekvence roda *Octodriloides* grupirane su u 3 zabilježene vrste (V, VI, X), od kojih dvije čine komplekse potencijalnih vrsta (V, VI) roda *Octodriloides*.

Dva primjerka determinirani kao *Oi. kovacevici* (Zicsi, 1970) grupirali su se u relativno podržanu grupu ($p=83$), K2P genske udaljenosti 21.6%. Uzorkovani su na međusobno udaljenim lokalitetima: Zagreb i Rakovica (Kordun). Primjerci obje linije malih su dimenzija, posjeduju 8 parova spermateka, a m.s.p. im se otvara na 27. kolutiću. Ono u čemu se razlikuju jest položaj kliteluma (29-36 kod jedne i 28-35 kod druge linije), položaj stidne izbočine (28-35 kod jedne i 29-37 kod druge linije) i otvora prve leđne pore (10/11 kod prve i 4/5 kod druge linije).

Slično kao kod vrste *Oi. kovacevici*, samo s više uzoraka, primjerci determinirani kao *Oi. kamnensis* (Baldasseroni, 1919) grupirali su se u dvije linije koje su podržane kao monofiletska skupina ($p=99$). Prva linija obuhvaća primjerke uzorkovane na području Žumberačko-Samoborskog gorja. Druga linija obuhvaća područje Hrvatskog zagorja, Medvednice i Požeške gore ($p=87$), a sestrińska je skupina uzorku s Korzike ($p=61$) kojoj je determiniran samo rod. Položaj stidne izbočine (30-40), kliteluma (30-37), prve leđne pore, m.s.o. (26), te broj i položaj spermateka identični su kod oba roda. Gujavice prve linije većim dimenzijama i brojem kolutića odstupaju od opisa vrste *Oi. kamnensis*. Mršić (1991) je dotadašnju vrstu *Oi. karawankensis* (Zicsi, 1986) u svojoj monografiji objedinio pod *Oi. kamnensis*. Međutim, stidna izbočina vrste *Oi. kamnensis* seže do 39. kolutića, a kod *Oi. karawankensis* do 40, što ukazuje da primjerci iz ovog istraživanja više odgovaraju opisu vrste *Oi. karawankensis*. Treća sjemena vrećica nije reducirana, što isključuje mogućnost da primjerci pripadaju vrsti *Oi. bolei*.

Primjerci vrste *Oi. janetscheki* (Zicsi, 1986) uzorkovani su na području Žumberak-Samoborskog gorja i Banovine te su grupirani u jedinstvenu podržanu grupu ($p=100$). Gotovo sve morfološke i anatomske karakteristike primjeraka poklapaju se s opisom vrste. Varira jedino pigmentacija u manjem dijelu i broj kolutića koji je povećan kod primjeraka s Banovine.

6. Zaključak

Metodom DNA barkodiranja i filogenetskom analizom 177 uzoraka gujavica koje pripadaju rodovima *Octodrilus* i *Octodriloides* s područja cijele Hrvatske dokazana je velika genska bioraznolikost vrsta i linija. Najmanja genska udaljenost između izdvojenih linija iznosi 12.8%. Postojanje više linija sa značajnim genskim divergencijama unutar vrste pokazuju prednost upotrebe molekularnih metoda i molekularno-filogenetskih analiza pri identifikaciji vrsta, posebice na kompleksima kriptičnih vrsta koje se na temelju građe tijela ne mogu klasificirati u zasebne vrste.

Od 15 zabilježenih vrsta roda *Octodrilus* u Hrvatskoj, DNA barkodiranjem potvrđeno je i klasificirano njih 9, od kojih su mnoge prve za tu vrstu uopće. Gujavice 3 linije roda *Octodrilus* jedinstvene su po svojoj građi ili juvenilnom stadiju primjerka. One ili pripadaju drugim vrstama nezabilježenim u Hrvatskoj, ili se radi o novim vrstama za znanost uopće. 3 vrste čine kompleks od najmanje dvije linije sa značajnim genskim udaljenostima. Od 5 zabilježenih vrsta roda *Octodriloides* u Hrvatskoj, DNA barkodiranjem potvrđeno je njih 3, od kojih dvije čine kompleks od najmanje dvije linije sa značajnim genskim udaljenostima, a sekvence su prve za determinirane vrste roda *Octodriloides* uopće.

Potrebno je provesti istraživanja na daleko većem broju uzoraka kako bi se molekularno-filogenetskim metodama detektirale preostale opisane vrste na području Hrvatske i kako bi se usporedbom s rezultatima ovog istraživanja odredio njihov filogenetski položaj. Prioritet bi trebali biti tipski lokaliteti vrsta kako bi se, u slučaju nedostatka holotipa, uzorkovao neotip, a DNA barkodiranjem njegova bi sekvenca označavala originalnu liniju opisane vrste.

7. Literatura:

Akaike, H. (1973): Maximum likelihood identification of Gaussian autoregressive moving average models. *Biometrika*, **60**: 255–265.

Barrett, T. J. (1948): Harnessing the earthworm: a practical inquiry into soil-building, soil-conditioning and plant nutrition through the action of earthworms. IX: Breeding Habits of the Earthworm, str. 96-101.

Blakemore, R. (2007): An updated list of valid, invalid and synonymous names of Criodrilioidea and Lumbricoidea (Annelida: Oligochaeta: Criodrilidae, Sparganophilidae, Ailoscolecidae, Hormogastridae, Lumbricidae, Lutodrilidae). A series of searchable texts on earthworm biodiversity, ecology and systematics from various regions of the world: str. 1-68.

Blakemore, R.J. (2009). *Cosmopolitan Earthworms - A Global and Historical Perspective* In *Annelids in Modern Biology*, D.H. Shain (Ed.).

Bleidorn C., Helm C., Weigert A., Aguado M.T. (2015): Annelida. In: Wanninger A. (eds) *Evolutionary Developmental Biology of Invertebrates 2*. Springer, Vienna.

Bouché M. B. (1977): Ecologie et paraécologie : peut-on estimer la contribution de la faune aux cycles des éléments biogènes ? In "Soil organisms as components of ecosystems", by Lohm, U. and Persson, T. (eds.), Proc. Vith int. coll. soil zool., Ecol. bull. (Stockholm), **25**: 157-163.

Cernosvitov L. (1935): Monographie der tschechoslowa-kischen Lumbriciden. — Arch. Prir. Vyzk. Cech. **19**: 1–86.

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

Chang C-H., James S. (2011): A critique of earthworm molecular phylogenetics, *Pedobiologia*, Volume **54**, Supplement, str. 3-9.

Conde S., Richard D., Liamine N. (2002): Biogeographical regions in Europe - The Alpine region - mountains of Europe; European Environment Agency, Copenhagen.

Csuzdi, C., Zicsi, A (2003): Earthworms of Hungary; Hungarian Natural History Museum.

Csuzdi, C., Szederjesi, T., Fernandez M., Daniel, de Sosa, I., Gavinelli, F., Dorigo, L., Pamio, A., Dreon, A., Fusaro, S., Moretto, E., Paoletti, M. (2018): DNA barcoding of the Italian anecic *Octodrilus* species in rural (vineyard) and forested areas with description of *Octodrilus zicsiniello* sp. nov. (Clitellata, Megadrili).

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. (2012): jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* **9**(8), 772.

- Darwin, C.R. (1881): The formation of vegetable mould through the action of worms, with observations on their habits, 1st ed. (4th Impression, 1966). London, U.K.: John Murray, str. 328.
- Domínguez J., Velando A., Ferreiro A. (2004). Are *Eidemia fetida* (Savigny, 1826) and *Eidemia andrei* Bouché (1972) (Oligochaeta, Lumbricidae) different biological species?, *Pedobiologia* **49**: 81-87.
- Domínguez J, Aira M, Breinholt JW, Stojanovic M, James SW, Pérez-Losada M. (2015): Underground evolution: new roots for the old tree of lumbricid earthworms. *Mol Phylogenet Evol.* 2015 Feb; **83**:7-19.
- Domínguez J., Aira M., Porto P. G., Díaz Cosín D. J., Pérez-Losada M. (2018): Multigene phylogeny reveals two isolated and relic earthworm genera (Oligochaeta: Lumbricidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* **18**: 258-274.
- Edwards C. A., Bohlen P. J. (1996): *Biology and ecology of earthworms* (3th Ed.). Chapman & Hall, London.
- Erséus, C, Williams, B.W., Horn, K.M., et al. (2020): Phylogenomic analyses reveal a Palaeozoic radiation and support a freshwater origin for clitellate annelids. *Zool Scr.*; **49**: 614–640.
- Felsenstein J. (1973): Maximum likelihood and minimum-steps methods for estimating evolutionary trees from data on discrete characters. *Systematic Biology* **22**: 240-249.
- Felsenstein J. (1981): Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* **17**: 368-376.
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. (1994): DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **3(5)**: 294-299.
- Fründ, H.-C., Graefe, U., Tischer, S. (2010): *Earthworms as Bioindicators of Soil Quality, Biology of Earthworms*, **16**.
- Guindon S., Gascuel O. (2003): A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology* **52**: 696-704.
- Habdija I., Primc Habdija B., Radanović I., Špoljar M., Matoničkin Kepčija R., Vujčić Karlo S., Miliša M., Ostojić A., Sertić Perić M. (2011): *Protista-Protozoa, Metazoa-Imnvertebrata; Strukture i funkcije*. Alfa, Zagreb.
- Hackenberger Kutuzović D. (2012): *Struktura i prostorno-vremenska raspodjela populacija gujavica (Oligochaeta: Lumbricidae) duž visinskoga transekta Ogulin-Novi Vinodolski*. Doktorska disertacija, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.

- Hackenberger Kutuzović D., Hackenberger Kutuzović B. (2013): Checklist of the earthworm fauna of Croatia (Oligochaeta: Lumbricidae). *Zootaxa* **3710**: 1-30.
- Hackenberger Kutuzović D., Hackenberger Kutuzović B., Hackenberger Kutuzović D. (2015): Ključ za određivanje gujavica Hrvatske (Erik). Osijek: Bioquant (software).
- Halavuk T. (2013): Zoogeografska analiza rasprostranjenosti gujavica (Lumbricidae) na području Hrvatske. Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek.
- Hewitt G.M. (1999): Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society*, **68**: 87-112.
- Hewitt G. (2000): The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* **405(6789)**: 907-913.
- Hilz H., Wieggers U., Adamietz P. (1975): Stimulation of Proteinase K Action by Denaturing Agents: Application to the Isolation of Nucleic Acids and the Degradation of 'Masked' Proteins. *European Journal of Biochemistry*, **56**: 103-108.
- Hodak, L. (2018): Genska raznolikost gujavica rodova *Aporrectodea* Orley, 1885 i *Lumbricus* Linnaeus, 1758 (Oligochaeta, Annelida) u kontinentalnoj Hrvatskoj. Diplomski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet.
- Hwang U. W., Kim W. (1999): General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *The Korean Journal of Parasitology* **37**: 215-228.
- James S. W., Porco D., Decaëns T., Richard B., Rougerie R., Erséus C. (2010): DNA barcoding reveals cryptic diversity in *Lumbricus terrestris* L., 1758 (*Clitellata*): resurrection of *L. herculeus* (Savigny, 1826). *PloS ONE*. **5**, e15629.
- Jamieson B., Tillier S., Tillier A., Justine J.-L., Ling E, James S., McDonald K., Hugall A.. (2002): Phylogeny of the Megascolecidae and Crassiclitellata (Annelida, Oligochaeta): combined versus partitioned analysis using nuclear (28S) and mitochondrial (12S, 16S) rDNA. *Zoosystema*. **24**.
- Jouquet P., Dauber J., Lagerlöf J., Lavelle P., Lepage M. (2006): Soil invertebrates as ecosystem engineers: Intended and accidental effects on soil and feedback loops, *Applied Soil Ecology* **32(2)**, str. 153-164.
- King R. A., Tibble A. L., Symondson W. O. (2008): Opening a can of worms: unprecedented sympatric cryptic diversity within British lumbricid earthworms. *Molecular Ecology* **17**: 4684-4698.
- Klarica J., Kloss-Brandstätter A., Traugott M., Juen A. (2011): Comparing four mitochondrial genes in earthworms - Implications for identification, phylogenetics, and discovery of cryptic species. *Soil Biology & Biochemistry* **45**: 23-30.

- Kimura M. (1980): A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, **16**, 111–120.
- Klein A., Eisenhauer N., Schaefer I. (2019): Invasive lumbricid earthworms in North America—Different life histories but common dispersal? *Journal of Biogeography*, **47**(3), 674–685.
- Kobayashi H., Ohtomi M., Sekizawa Y., Ohta N. (2001): Toxicity of coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida* to vertebrates but not invertebrates: probable role of sphingomyelin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, **128**(3), 401–411.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. (2018): MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* **35**: 1547-1549.
- Laforest B., Winegardner A., Zaheer O., Jeffery N., Boyle E., Adamowicz, S. (2013): Insights into biodiversity sampling strategies for freshwater microinvertebrate faunas through bioblitz campaigns and DNA barcoding. *BMC ecology*.
- Lavelle, Patrick. (1988): Lavelle P.. Earthworm activities and the soil system. *Biol Fertil Soils* **6**: 237-251. *Biology and Fertility of Soils*. **6**. 237-251.
- Lavelle P., Spain A.V. (2001): *Soil Ecology*. Kluwer Academic Publishers, New York.
- Lee K. E. (1985): *Earthworms their Ecology and Relationships with Soils and Land Use*. Academic Press, Sydney.
- Lee B-T., Shin K-H., Kim J-Y., Kim K-W. (2008): Progress in Earthworm Ecotoxicology. In: Kim Y.J., Platt U. (eds) *Advanced Environmental Monitoring*. Springer, Dordrecht: 248-258.
- Lemey P., Salemi M., Vandamme A. (2009): *The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing* (2nd ed.). Cambridge: Cambridge University Press: str. 3-28.
- Martin P., Kaygorodova I., Sherbakov D.Y., Verheyen E., (2000): Rapid evolving lineages impede the resolution of phylogenetic relationships among Clitellata (Annelida). *Mol. Phylogenet. Evol.* **15**, 355–368.
- Matoničkin I., Klobučar G., Kučinić M. (2010): *Opća zoologija. Školska knjiga*, Zagreb.
- Mau B., Newton M., Larget B. (1999): Bayesian phylogenetic inference via Markov chain Monte Carlo methods. *Biometrics* **55**: 1-12.
- Michaelsen W., (1903): *Die geographische Verbreitung der Oligochaeten*, Friedlander and Sohn, Berlin.

- Miller M. A., Pfeiffer W., Schwartz T. (2010): Creating the CIPRES science gateway for inference of large phylogenetic trees, Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE): 1–8.
- Monroy F., Aira M., Gago J. Á., Domínguez J. (2007): Life cycle of the earthworm *Octodrilus complanatus* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Comptes Rendus Biologies*: **330(5)**, 389–391.
- Mršić N. (1991): Monograph on Earthworms (Lumbricidae) of the Balkans. Slovenian Academy of Sciences and Arts, Ljubljana.
- Omodeo P. (1956): Contributo a lla revisione dei Lumbricidae. *Archivio Zoologico Italiano*, **41**: 129-212.
- Pérez-Losada M., Ricoy M., Marshall J. C., Domínguez J. (2009): Phylogenetic assessment of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* species complex (Oligochaeta: Lumbricidae) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **52**: 293-302.
- Pérez-Losada M., Bloch R., Breinholt J.W., Pfenninger M., Domínguez J. (2011): Taxonomic assessment of Lumbricidae (Oligochaeta) earthworm genera using DNA barcodes. *European Journal of Soil Biology* **48**: 41-47.
- Pop V.V. (1987): Density and biomass of earthworm synusia in forest ecosystems of the Romanian Carpathians, in Bonvicini Pagliai, A.N. and P. Omodeo, Eds., *On Earthworms. Selected Symposia and Monographs*, Muchi, Modena, Italy, str. 183-190.
- Pop V.V. (1991): Studies on the genus *Octodrilus* Omodeo, 1956 (Oligochaeta, Lumbricidae) from the Apuseni Mountains (the Carpathians, Romania). II. Variability of characters, *Travaux du Museum d'Histoire naturelle Grigore Antipa*, Bucharest, Romania, **31**, 397-414.
- Pop V.V. (1997): Earthworm-Vegetation-Soil Relationships in the Romanian Carpathians, *Soil Biol. Biochem.*, **29(3/4)**, 223-229.
- Pop V.V. (1998): Earthworm biology and ecology—a case study: the genus *Octodrilus* Omodeo, 1956 (Oligochaeta, Lumbricidae), from the Carpathians. In: *Earthworm Ecology* (ed. C.A. Edwards), str. 65–100.
- Pop A.A., Wink M., (2004): Molecular taxonomy and phylogeny of earthworms: 16 S rDNA and COI gene corroborate numerical taxonomy in the genus *Octodrilus* Omodeo, 1956: str. 347-359.
- Pop A. A., Csuzdi C., Wink M. and Pop V. V. (2008): Molecular taxonomy and phylogeny of the genera *Octolasion* Örley, 1885, *Octodrilus* Omodeo, 1956 and *Octodriloides* Zicsi, 1986 (Oligochaeta, Lumbricidae) based on nucleotide sequences of mitochondrial 16S rDNA and COI genes.

- Porco D., Decaëns T., Deharveng L., James S. W., Skarzynski D., Erséus C., Butt K. R., Richard B., Hebert P. D. N. (2013): Biological invasions in soil: DNA barcoding as a monitoring tool in a multiple taxa survey targeting European earthworms and springtails in North America. *Biological Invasions* **15(4)**: 899-910.
- Ratnasingham S., Hebert, P. D. N. (2013): A DNA-Based Registry for All Animal Species: The Barcode Index Number (BIN) System. *PLoS ONE*, **8(7)**, e66213.
- Ronquist F., Huelsenbeck J. P. (2003): MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models, *Bioinformatics*, **19(12)**, str. 1572–1574
- Ronquist F., Sanmartin I. (2011): Phylogenetic Methods in Biogeography. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*. **42**. 441-464.
- Rouse G., Pleijel F. (2006): Annelid phylogeny and systematics. *Reproductive Biology and Phylogeny of Annelida*.
- Schmelz R. M., Erséus C., Martin P., Haaren T. V., Timm T. (2021): A proposed order-level classification in Oligochaeta (Annelida, Clitellata). *Zootaxa*, **5040(4)**, 589–591.
- Schulman A. H., Flavell A. J., Ellis T. H. N. (2004): The application of LTR retrotransposons as molecular markers in plants. *Methods in Molecular Biology* **260**: 145-173.
- Schwarz, G.E. (1978): Estimating the dimension of a model. *Annals of Statistics*, 6, 461–464.
- Sechi P. (2013): An evolutionary history of the peregrine epigeic earthworm *Lumbricus rubellus*. Doctoral dissertation, Cardiff University.
- Sambrook J., Russell D.W. (2001): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, Vol. 1.
- Stojanović M., Milutinović T., Karaman S. (2008): Earthworm (Lumbricidae) diversity in the Central Balkans: An evaluation of their conservation status. *European Journal of Soil Biology* **44**: 57-64.
- Tamura K. (1992): Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Molecular Biology and Evolution* **9**:678-687.
- Walsh P.S., Metzger D.A., Higuchi R. (1991): Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. *BioTechniques*. **10(4)**: 506–513.
- Xiong J. (2006): *Essential Bioinformatics*. Cambridge University Press, Published in the United States of America by Cambridge University Press, New York. The Edinburgh Building, Cambridge, UK, str.: 127-169.
- Zicsi A. (1981): Weitere Angaben zur Lumbricidenfauna Italiens (Oligochaeta: Lumbricidae). *Opuscula Zoologica, Budapest*, **17–18**, 157–180.

Zicsi A., (1986): Über die taxonomische Probleme der Gattung *Octodrilus* Omodeo, 1956 und *Octodriloides* gen. n. (Oligochaeta: Lumbricidae). Opuscula Zoologica Budapest, **21**: 137-139.

Zuckermandl E., Pauling L. (1965): Molecules as documents of evolutionary history. J Theor Biol.; **8(2)**:357-66.

Internetski izvori:

<https://www.earthwormsoc.org.uk/index.php/earthworm-biology> (21.1.2022.)

<http://www.boldsystems.org/> (14.1.2022)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (14.1.2022.)

Prilozi:

Prilog 1: Područja uzorkovanja s geografskim koordinatama

<i>Site Code</i>	Legatori / skupljači	Datum	Lokalitet	Geografske koordinate
HREW4	Mišel Jelić	12.5.2016.	Grdanci, Žumberačko-Samoborsko gorje	N45.830527, E15.632532
HREW6	Mišel Jelić	12.5.2016.	Žumberačko-Samoborsko gorje	N45.838962, E15.598972
HREW7	Mišel Jelić	12.5.2016.	Žumberačko-Samoborsko gorje	N45.837769, E15.590487
HREW11	Mišel Jelić	12.5.2016.	Poklek, Žumberačko-Samoborsko gorje	N45.818890, E15.530837
HREW12	Mišel Jelić	12.5.2016.	Žumberačko-Samoborsko gorje	N45.819806, E15.522201
HREW14	Mišel Jelić	12.5.2016.	Žumberačko-Samoborsko gorje	N45.784468, E15.485212
HREW16	Mišel Jelić	12.5.2016.	Žumberačko-Samoborsko gorje	N45.762675, E15.428750
HREW20	Mišel Jelić	14.5.2016.	Kalnik, Varaždin	N46.128405, E16.438962
HREW21	Mišel Jelić	14.5.2016.	Kalnik, Varaždin	N46.125931, E16.436554
HREW33	D. K. Hackenberger, B. Hackenberger	2016. g.	Lipik	N45.422824, E17.1061
HREW44	D. K. Hackenberger, B. Hackenberger	2016. g.	Gornje Jelenje	N45.367563, E14.61745
HREW51	D. K. Hackenberger, B. Hackenberger	25.3.2017.	rit kod Aljmaša	N45.532469N, E18.941986
HREW56	Mišel Jelić	6.5.2017.	Čiritež	N45.39788N, E14.024908
HREW57	Mišel Jelić	7.5.2017.	Momjan	N45.440368, E13.702777
HREW60	M. Jelić, G. Klobučar, L. Hodak	5.10.2017.	Očura, Lepoglava	N46.196461, E15.997803
HREW66	Mišel Jelić	18.10.2017.	uz Kupu, Petrinja	N45.445133, E16.266424
HREW67	Mišel Jelić	18.10.2017.	uz Petrinjčicu, Petrinja	N45.381512, E16.286875
HREW69	Mišel Jelić	18.10.2017.	Gornja Pastuša, Petrinja	N45.321796, E16.319834
HREW70	Mišel Jelić	18.10.2017.	Komogovina, Petrinja	N45.304308, E16.367138
HREW72	Mišel Jelić, Bruno Schmidt	19.10.2017.	Bair, Novska	N45.379234, E17.025095
HREW79	D. K. Hackenberger, B. Hackenberger	25.10.2017.	Medvednica, Zagreb	N45.879223, E15.973108
HREW88	Mišel Jelić	25.5.2018.	Park Maksimir, Zagreb	N45.82442, E16.026954
HREW92	Mišel Jelić	2.11.2018.	Traven vrh, Delnice	N45.408657, E14.751281
HREW94	Mišel Jelić	2.11.2018.	Bela Vodica, Delnice	N45.417747, E14.690992
HREW95	Mišel Jelić	3.11.2018.	dolina rijeke Mirne, Buzet	N45.388062, E13.925694
HREW98	Mišel Jelić	3.11.2018.	Karsko, Učka	N45.316521, E14.231272
HREW99	Mišel Jelić	3.11.2018.	Karsko, Učka	N45.309769, E14.221114
HREW100	Mišel Jelić	3.11.2018.	rt Kamenjak	N44.770969, E13.907938
HREW103	Mišel Jelić	4.11.2018.	Merag, Cres	N44.975735, E14.439384
HREW104	Mišel Jelić	4.11.2018.	Seline, Paklenica	N44.282494, E15.492753
HREW105	Mišel Jelić	4.11.2018.	Seline, Paklenica	N44.281506, E15.490015

Site Code	Legatori / skupljači	Datum	Lokalitet	Geografske koordinate
HREW115	Goran Klobučar	26.5.2019.	Vrgorac	N43.202472, E17.404764
HREW115	Goran Klobučar	26.5.2019.	Vrgorac	N43.207072, E17.399636
HREW117	Roman Ozimec	19.7.2018.	Prvača špilja, Kistanje	N44.023374, E15.930163
HREW118	Roman Ozimec	16.12.2020.	Istruga kanjon, Korčula	N42.914384; E16.865551
HREW119	Roman Ozimec	16.12.2020.	Samograd špilja, Korčula	N42.970386, E16.993692
HREW121	Roman Ozimec	26.2.2021.	Hum, Lastovo	N42.751416; E16.860588
HREW124	Roman Ozimec	19.3.2021.	Vela spilja, Korčula	N42.969673; E16.718312
HREW125-05	Tena Plavac	2020. g	Požeška gora, Požega	N45.290744, E17.761088
HREW125-08,10,11	Tena Plavac	2020. g	Požeška gora, Požega	N45.280372, E17.709583
HREW126	D. K. Hackenberger, B. Hackenberger	13.3.2020.	Svjetionik, rt Kamenjak	N44.769542, E13.905962
HREW128	D. K. Hackenberger, B. Hackenberger	2021. g	Gornji kamenjak	N44.81365, E13.89618
HREW129	D. K. Hackenberger, B. Hackenberger	14.3.2020.	Trska, rt Kamenjak	N44.780918, E13.913525
HREW130	D. K. Hackenberger, B. Hackenberger		Gornji kamenjak	N44.81379, E13.8792
HREW131	D. K. Hackenberger, B. Hackenberger	14.3.2020.	biciklistička staza, rt Kamenjak	N44.786380, E13.907345
HREW132	D. K. Hackenberger, B. Hackenberger	13.3.2020.	Svjetionik, rt Kamenjak	N44.781835, E13.911191
HREW133	D. K. Hackenberger, B. Hackenberger		L3, rt Kamenjak	N44.769118, E13.919967
HREW134	D. K. Hackenberger, B. Hackenberger	2021.g.	Gornji kamenjak	N44.81224, E13.90587
HREW136	D. K. Hackenberger, B. Hackenberger	1.11.2021.	rt Kamenjak	N44.777036, E13.910634
HREW137	D. K. Hackenberger, B. Hackenberger	1.11.2021.	Motovun	N45.355211, E13.864221
HREW138	D. K. Hackenberger, B. Hackenberger	13.3.2020.	Apartman, rt Kamenjak	N44.825186, E13.878086
HREW139	D. K. Hackenberger, B. Hackenberger	13.3.2020.	Lokva	N44.794121, E13.911927
HREW150	Roman Ozimec	22.12.2020.	Trsteno, Dubrovnik	N42.709994, E17.976618
HREW155	Davorka K. Hackenberger	studen 2020.	rijeka Mirna, Istra	N45.323073, E13.609302
HREW156	Olga Jovanović Glavaš	5.6.2019.	Bjelolasica	N45.273208, E14.956446
HREW160	R. Ozimec, I. Vuković	3.6.2021.	Piskovica, Motovun	N45.262035, E14.036959
HREW163	R. Ozimec, I. Vuković	5.6.2021.	Motovunska šuma, Motovun	N45.369893, E13.879627
HREW166	Roman Ozimec	9.10.2020.	Kokorići, Vrgorac	N43.194895, E17.322575
HREW167	R. Ozimec, I. Vuković, M. Jelić	6.6.2021.	Pazinski ponor, Pazin	N45.239809, E13.929829
HREW168	Roman Ozimec	6.6.2021.	Hlapa Gornja, Krk	N45.133292, E14.619150
HREW169	Roman Ozimec	6.6.2021.	Paprata, Krk	N45.098689; E14.632479
HREW172	Roman Ozimec	6.6.2021.	Mali Lug, Krk	N45.165872, E14.588683
HREW174	Roman Ozimec	6.6.2021.	Veli potok, Krk	N45.135766, E14.594711
HREW175	Roman Ozimec	20.10.2021.	Dankov ponor, Kosinj	N45.900830, E16.002270
HREW177	Stipe Tutiš	13.9.2021.	Markov ponor, Kosinj	N44.765317, E15.176873

<i>Site Code</i>	<i>Legatori / skupljači</i>	<i>Datum</i>	<i>Lokalitet</i>	<i>Geografske koordinate</i>
HREW179	Goran Klobučar	kolovoz 2021.	Pag	N44.431184, E15.061896
HREW199	D. Basara, R. Ozimec, I. Pakrac, I. Vuković	7.5.2021.	Anića kuk, Paklenica	N44.306935; E15.474822
HREW200	Damir Basara, Ines Vuković	8.5.2021.	Paklenica	N44.373334, E15.465713
HREW202	D. Basara, R. Ozimec, I. Pakrac, I. Vuković	9.5.2021.	uz potok Velika Paklenica, Paklenica	N44.311339, E15.479954
HREW203	Roman Ozimec, Ivica Pakrac	8.5.2021.	Paklenica	N44.343258, E15.487534
HREW204	Roman Ozimec, Ivica Pakrac	8.5.2021.	Paklenica	N44.342779, E15.489929
HREW205	Roman Ozimec, Ivica Pakrac	8.5.2021.	izvor kod Mokraće špilje, Paklenica	N44.336605, E15.508053
HREW206	Roman Ozimec, Ivica Pakrac	8.5.2021.	Mokraća špilja, Paklenica	N44.339935, E15.507418
HREW207	M. Jelić, Ivica Pakrac, M. Stančin, D. De Bona	14.7.2021.	Anića luka, Paklenica	N44.314864, E15.480886
HREW218	Branko Jalžić	11.6.2021.	Jama pod Glavinom, Rakovica	N44.987437, E15.594861
HREW219	Branko Jalžić	12.6.2021.	Velesova jama, Rakovica	N44.954174, E15.572413
HREW244	Roman Ozimec	15.5.2021.	Medvednica	N45.864971, E16.024842

Prilog 2. Morfološke i anatomske osobine odraslih, spolno zrelih i neoštećenih gujavica

Sample ID	Naziv vrste	Kl.	T.p.	Prva ledna pora	Prost.	duljina / mm	širina / mm	broj kol.	tip četina	m.s.o.	broj sjem. sprem.	sjemene vrećice	Oblik test. vreće	Pigmentacija
HREW115-01	<i>Octodrilus transpadanus</i>	30-37	30-37		epiloban	120	6		š.s.č.	15	5 6/7-10/11	4, 9-12	P	smečkasta
HREW115-02	<i>Octodrilus transpadanus</i>	30-37	30-37		epiloban	110	6.1		š.s.č.	15				smečkasta
HREW125-05	<i>Octodrilus transpadanus</i>	30-37	30-37		epiloban	105	6.1		š.s.č.	15				smečkasta
HREW125-06	<i>Octodrilus transpadanus</i>	30-37	30-37		epiloban	82	5.5		š.s.č.	15				smečkasta
HREW125-07	<i>Octodrilus transpadanus</i>	29-36	29-36		epiloban	43	3.5		š.s.č.	15				smečkasta
HREW51-1	<i>Octodrilus transpadanus</i>	30-37	30-37	12/13	epiloban	52	4.5	170	š.s.č.					smeđe-siva
HREW66-1	<i>Octodrilus transpadanus</i>	30-37	30-37	12/13	epiloban	61	53	168	š.s.č.					smeđe-siva
HREW66-4	<i>Octodrilus transpadanus</i>	30-37	30-37		epiloban	110	4.5		š.s.č.	15				smeđa
HREW66-5	<i>Octodrilus transpadanus</i>	30-37	30-37		epiloban	90	4.6		š.s.č.	15				smeđa
HREW66-6	<i>Octodrilus transpadanus</i>	30-37	30-37		epiloban	85	4.3		š.s.č.	15				smeđa
HREW66-7	<i>Octodrilus transpadanus</i>	30-37	30-37		epiloban	105	4.5		š.s.č.	15				smeđa
HREW66-8	<i>Octodrilus transpadanus</i>	30-37	30-37		epiloban	80	4.4		š.s.č.	15				smeđa
HREW66-9	<i>Octodrilus transpadanus</i>	30-37	30-37		epiloban	65	4.4		š.s.č.	15				smeđa
HREW69-14	<i>Octodrilus transpadanus</i>	30-37	30-37		epiloban	82	4.3		š.s.č.	15				smeđa
HREW70-4	<i>Octodrilus transpadanus</i>	30-37	30-37		epiloban	70	4.4		š.s.č.	15				smeđa
HREW72-1	<i>Octodrilus transpadanus</i>	30-37	30-37		epiloban	85	4.3		š.s.č.	15	5 6/7-10/11	4, 9-12	P	smeđa
HREW72-10	<i>Octodrilus transpadanus</i>	30-37	30-37		epiloban	80	4.5		š.s.č.	15				smeđa
HREW72-2	<i>Octodrilus transpadanus</i>	30-37	30-37		epiloban	70	4.1		š.s.č.	15				smeđa
HREW99-01	<i>Octodrilus mimus</i>	29-41	29-41	12/13	epiloban	210	9.3	263	š.s.č.	15				sivo-smeđa
HREW99-03	<i>Octodrilus mimus</i>	28-41	29-41	12/13	proloban	216	10.2	305	š.s.č.	15	7 6/7-12/13	4, 9-12	P	sivo-smeđa
HREW99-04	<i>Octodrilus mimus</i>	28-41	29-41	12/13	epiloban	150	9.7	204	š.s.č.	15	7 6/7-12/13	4, 9-12	P	siva
HREW129-02	<i>Octodrilus istrianus</i>	29-42	29-42	12/13	epiloban	144	11.9	332	š.s.č.	15				smeđa
HREW129-03	<i>Octodrilus istrianus</i>	29-42	29-42	12/13	epiloban	228	11.1	340	š.s.č.	15				smeđa
HREW130-01	<i>Octodrilus istrianus</i>	29-42	30-42	12/13	proloban	210	11.6		š.s.č.	15				smeđa
HREW131-01	<i>Octodrilus istrianus</i>	29-42	30-42	13/14	epiloban	174	10.6	307	š.s.č.	15				smeđe-siva
HREW135-01	<i>Octodrilus istrianus</i>	29-42	30-42	13/14	epiloban				š.s.č.	15				siva
HREW56-1	<i>Octodrilus tergestinus</i>	29-42	30-43	12/13	epiloban		10	>150	š.s.č.	15				sivkasta
HREW95-01	<i>Octodrilus tergestinus</i>	29-43	30-44		epiloban	147	9.7	255	š.s.č.	15				sivo-smeđa
HREW95-02	<i>Octodrilus tergestinus</i>	29-42	30-42						š.s.č.		7 6/7-12/13	4 9-12	P	

Sample ID	Naziv vrste	Kl.	T.p.	Prva ledna pora	Prost.	duljina / mm	širina / mm	broj kol.	tip četina	m.s.o.	broj sjem. sprem.	sjemene vrećice	Oblik test. vreće	Pigmentacija
HREW88-09	<i>Octodriloides kovacevici L1</i>	29-35	29-38	10/11	epiloban	45	3.5	94	razdvojene	27	8 6/7-13/14	4 9-12	P	crvena anteriorno
HREW218-02	<i>Octodriloides kovacevici L2</i>	28-35	29-37	4/5	epiloban	38	4.5	108	razdvojene	27	8 6/7-13/14	4 9-12	P	crvenkasta
HREW7-1	<i>Octodriloides kammensis L1</i>	30-37	30-40	13/14	epiloban	96	7.5	217	razdvojene	26	7 6/7-12/13	4 9-12	P	nepigmentirana
HREW11-5	<i>Octodriloides kammensis L1</i>	30-37	30-40	13/14	epiloban	95	6		razdvojene					nepigmentirana
HREW11-2	<i>Octodriloides kammensis L1</i>	30-37	30-40	13/14	epiloban	126	6		razdvojene		7 6/7-12/13	4 9-12	P	nepigmentirana
HREW4-5	<i>Octodriloides kammensis L1</i>	30-37	30-40	13/14	epiloban	56	5	88	razdvojene	26				nepigmentirana
HREW79-8	<i>Octodriloides kammensis L2</i>	30-37	30-40		epiloban	50	3.5	148	razdvojene	26	7 6/7-12/13	4 9-12	P	nepigmentirana
HREW79-9	<i>Octodriloides kammensis L2</i>	30-37	30-40	12/13	epiloban	60	4.4	134	razdvojene					nepigmentirana
HREW20-3	<i>Octodriloides kammensis L2</i>	30-37	30-40	13/14	epiloban				razdvojene					nepigmentirana
HREW20-5	<i>Octodriloides kammensis L2</i>	30-37	30-40	12/13	epiloban	58	5	160	razdvojene	26	7 6/7-12/13	4 9-12	P	nepigmentirana
HREW21-5	<i>Octodriloides kammensis L2</i>	30-37	30-40	12/13	epiloban	55	5	98	razdvojene	26	7 6/7-12/13	4 9-12	P	nepigmentirana
HREW60-6	<i>Octodriloides kammensis L2</i>	30-37	29-40	13/14	epiloban		5.75		razdvojene					nepigmentirana
HREW175-02	<i>Octodrilus bretscheri L1</i>	29-36	29-36	nema	epiloban	55	6	157	š.s.č.	15	6 5/6-10/11	4 9-12		crveno-smeđa
HREW175-03	<i>Octodrilus bretscheri L1</i>	29-36	29-36	7/8	epiloban	37	5.5	112	š.s.č.	15				crveno-smeđa
HREW175-06	<i>Octodrilus bretscheri L1</i>	29-36	30-36	6/7	epiloban	50	5.5	128	š.s.č.	15				tarnosivo-smeđa
HREW175-07	<i>Octodrilus bretscheri L1</i>	29-36	29-36		epiloban	50	5	133	š.s.č.	15				tarnosivo-smeđa
HREW175-08	<i>Octodrilus bretscheri L1</i>	28-36	29-36		epiloban	57	5	126	š.s.č.	15				tarnosivo-smeđa
HREW204-09	<i>Octodrilus bretscheri L1</i>	29-37	29-36	13/14	taniloban	70	5	120	š.s.č.	15				crveno-ljubičasta
HREW177-05	<i>Octodrilus bretscheri L2</i>	29-36	29-36	7/8	epiloban	65	4	126	š.s.č.	15	6 5/6-10/11	4 9-12		smeđa
HREW156-01	<i>Octodrilus lissaensis L1</i>	29-36	29-36		epiloban	155	8		š.s.č.	15				nepigmentirana
HREW200-12	<i>Octodrilus lissaensis L2</i>	29-36			epiloban				š.s.č.					
HREW203-01	<i>Octodrilus lissaensis L2</i>	29-36	29-36	5/6	epiloban	60	5	140	š.s.č.	15	6 5/6-10/11	4 9-12	P	crveno-ljubičasta
HREW203-02	<i>Octodrilus lissaensis L2</i>	29-36	29-36	5/6	epiloban	45	4	114	š.s.č.	15				crveno-ljubičasta
HREW160-03	<i>Octodrilus lissaensis L3</i>	29-36	29-36	6/7	epiloban	70	5	134	š.s.č.	15	6 5/6-10/11	4 9-12	P	smede-crvena
HREW121-03	<i>Octodrilus lissaensis L4</i>	29-36	29-36		epiloban	117	5	134	š.s.č.					smeđe-siva
HREW124-01	<i>Octodrilus lissaensis L4</i>	29-36	29-36	5/6	epiloban	67	3.6	145	š.s.č.	15	6 5/6-10/11	4 9-12	P	crvenkasta anteriorno
HREW134-02	<i>Octodrilus lissaensis L4</i>	28-36	28-36		epiloban	48	4	144	š.s.č.	15				smede-crvena
HREW134-03	<i>Octodrilus lissaensis L4</i>	29-37	29-36		epiloban	43	4	145	š.s.č.	15				smede-crvena
HREW139-01	<i>Octodrilus lissaensis L4</i>	29-36	29-36	7/8	epiloban	52	4	150	š.s.č.	15				smede-crvena
HREW139-02	<i>Octodrilus lissaensis L4</i>	29-36	29-36	7/8	epiloban	50	4	145	š.s.č.	15				smede-crvena

Sample ID	Naziv vrste	Kl.	T.p.	Prva ledna pora	Prost.	duljina / mm	širina / mm	broj kol.	tip četina	m.s.o.	broj sjem. sprem.	sjemene vrećice	Oblik test. vreće	Pigmentacija
HREW155-01	<i>Octodrilus lissaensis L4</i>	29-36	29-36		epiloban	43	3		š.s.č.					nepigmentirana
HREW172-01	<i>Octodrilus lissaensis L5</i>	29-36	30-36	9/10	epiloban	30	4	100	š.s.č.	15				crvenkasta
HREW167-08	<i>Octodrilus lissaensis L5</i>	29-36	29-36	8/9	epiloban	42	4	115	š.s.č.	15	6 5/6-10/11	4 9-12	P	crvenkasta
HREW94-19	<i>Octodrilus lissaensis L6</i>	29-36	29-36	6/7	epiloban	50	3.4	130	š.s.č.	15	6 5/6-10/11	4 9-12	P	crvenkasta
HREW94-34	<i>Octodrilus lissaensis L6</i>	29-36	29-36	6/7	epiloban	51	4	125	š.s.č.	15				crvenkasta
HREW94-36	<i>Octodrilus lissaensis L6</i>	29-36	29-36	5/6	epiloban	42	3.5	92	š.s.č.	15				crvenkasta
HREW94-38	<i>Octodrilus lissaensis L6</i>	29-36	29-36	7/8	epiloban	37	3	94	š.s.č.					crvenkasta
HREW94-41	<i>Octodrilus lissaensis L6</i>	28-36	29-36	6/7	epiloban	52	2.9	127	š.s.č.	15				crvenkasta
HREW94-46	<i>Octodrilus lissaensis L6</i>	29-36	29-36		epiloban	36	3	120	š.s.č.		6 5/6-10/11	4 9-12	P	crvenkasta
HREW94-47	<i>Octodrilus lissaensis L6</i>	30-37	30-37	6/7	epiloban	52	3	120	š.s.č.	15				
HREW94-48	<i>Octodrilus lissaensis L6</i>	28-36	29-36	5/6	epiloban	51	4	153	š.s.č.	15				crvenkasta
HREW94-59	<i>Octodrilus lissaensis L6</i>	29-36	29-36		epiloban	38	3.4	130	š.s.č.	15				crvenkasta
HREW94-63	<i>Octodrilus lissaensis L6</i>	28-36	29-36		epiloban	52	3	120	š.s.č.	15	7 6/7-12/12	4 9-12	P	crvenkasta
HREW94-68	<i>Octodrilus lissaensis L6</i>	29-36	29-36	5/6	epiloban	40	3.2	108	š.s.č.					crvenkasta
HREW94-77	<i>Octodrilus lissaensis L6</i>	29-36	29-36		epiloban				š.s.č.					crvenkasta
HREW94-78	<i>Octodrilus lissaensis L6</i>	28-36	29-36	5/6	epiloban	51	3.8	98	š.s.č.	15				crvenkasta
HREW136-01	<i>Octodrilus lissaensis L7</i>	29-36	29-36	12/13	epiloban	125	7.5	181	š.s.č.	15	6 5/6-10/11	4 9-12	P	smeđe-siva
HREW119-01	<i>Octodrilus lissaensis L8</i>	28-36	28-36	11/12	epiloban	80	6.7	158	š.s.č.	15				smečkasta
HREW119-03	<i>Octodrilus lissaensis L8</i>	28 1/2 - 36	28-36	12/13	epiloban	79	6.5	116	š.s.č.	15	6 5/6-10/11	4 9-12	P	smečkasta
HREW119-04	<i>Octodrilus lissaensis L8</i>	28-36	28-36		epiloban	71	6.6	160	š.s.č.	15				smečkasta
HREW119-05	<i>Octodrilus lissaensis L8</i>	28-36	28-36	11/12	epiloban	67	6.5	160	š.s.č.	15	6 5/6-10/11	4 9-12	P	smečkasta
HREW119-06	<i>Octodrilus lissaensis L8</i>			12/13	epiloban	77	6.6		š.s.č.	15				smečkasta
HREW100-02	<i>Octodrilus sp. 1</i>	29-37	29-37	8/9	epiloban	45	4.8	129	š.s.č.		6 5/6-10/11	4 9,10,R,12		crvenkasta
HREW132-01	<i>Octodrilus sp. 1</i>	29-37	29-37		epiloban	46	4.1	126	š.s.č.	15				crvenkasta
HREW132-02	<i>Octodrilus sp. 1</i>	29-37	29-37		epiloban	46	4	147	š.s.č.	15				crvenkasta
HREW132-03	<i>Octodrilus sp. 1</i>	29-37	29-37		epiloban	50	4.1	130	š.s.č.	15				crvenkasta
HREW133-01	<i>Octodrilus sp. 1</i>	29-37	29-37		epiloban	30	3.6	147	š.s.č.	15				sivo-crvenkasta
HREW133-02	<i>Octodrilus sp. 1</i>	29-37	29-37		epiloban	27	3.5	144	š.s.č.	15				sivo-crvenkasta
HREW133-03	<i>Octodrilus sp. 1</i>	29-37	29-37		epiloban	29	3.5	136	š.s.č.	15				sivo-crvenkasta
HREW134-04	<i>Octodrilus sp. 1</i>	29-37	29-37		epiloban	37	3.5	150	š.s.č.	15				sivo-crvenkasta
HREW4-8	<i>Octodriloides janetscheki</i>	29-36	28-39	4/5	epiloban	60	3.5	137	razdvojene	27				nepigmentirana

Sample ID	Naziv vrste	Kl.	T.p.	Prva ledna pora	Prost.	duljina / mm	širina / mm	broj kol.	tip četina	m.s.o.	broj sjem. sprem.	sjemene vrećice	Oblik test. vreće	Pigmentacija
HREW4-11	<i>Octodriloides janetscheki</i>	28-36	28-39	4/5	epiloban	47	2		razdvojene	27				nepigmentirana
HREW67-3	<i>Octodriloides janetscheki</i>	29-36	29-39		epiloban			151	razdvojene	27	8 6/7-13/14	4 9,10,R,12	P	
HREW6-1	<i>Octodrilus slovenicus</i>	1/2 28-1/2 40	29-39		epiloban	180	11		š.s.č.	16				smečkasta
HREW12-2	<i>Octodrilus slovenicus</i>	28-40	30-39	13/14	epiloban	186	11.5	259	š.s.č.	15	5 6/7-10/11	4 9-12	P	smečkasta
HREW14-1	<i>Octodrilus slovenicus</i>	28-39	29-39		epiloban	175	12		š.s.č.	15				smečkasta
HREW14-2	<i>Octodrilus slovenicus</i>	28-39	29-39		epiloban	165	12		š.s.č.	15				smečkasta
HREW14-3	<i>Octodrilus slovenicus</i>	28-39	29-39		epiloban	160	12		š.s.č.	15				smečkasta
HREW128-01	<i>Octodrilus complanatus L1</i>	29-38	30-40	13/14	epiloban	94	8.9	205	š.s.č.	15				
HREW138-01	<i>Octodrilus complanatus L1</i>	29-38	30-39	12/13	epiloban	138	9	209	š.s.č.	15				
HREW179-01	<i>Octodrilus complanatus L1</i>	29-39	30-39	12/13	epiloban	87	5	203	š.s.č.	15				
HREW105-01	<i>Octodrilus complanatus L2</i>			13/14	epiloban	115	8.8	234	š.s.č.	15	7 6/7-12/13	4 9-12	E	siva
HREW118-01	<i>Octodrilus complanatus L3</i>	28-38	29-38	12/13	epiloban	106	9.7	182	š.s.č.	15	7 6/7-12/13	4 9-12	E	
HREW105-03	<i>Octodrilus complanatus L3</i>	29-39	30-40	13/14	epiloban	94	8.5		š.s.č.	15				
HREW105-04	<i>Octodrilus complanatus L3</i>		29-39	13/14	epiloban	125	8.6	250	š.s.č.	15				
HREW105-05	<i>Octodrilus complanatus L3</i>		30-39	12/13	epiloban		7.6	230	š.s.č.	15				
HREW57-1	<i>Octodrilus complanatus L4</i>	29 1/2-37	29 1/2 -39	13/14	epiloban	145	9	190	š.s.č.	15	7 6/7-12/13	4 9-12	E	nepigmentirana
HREW44-1	<i>Octodrilus complanatus L4</i>	29-38	29-40	13-14	epiloban				š.s.č.	15				smeđa
HREW160-01	<i>Octodrilus complanatus L4</i>	29-40	30-39	12/13	epiloban	90	9	206	š.s.č.	15	7 6/7-12/13	4 9-12	E	smeđa
HREW168-01	<i>Octodrilus complanatus L4</i>	29-38	30-40	13/14	epiloban	140	13	238	š.s.č.	15				smeđe-siva
HREW169-01	<i>Octodrilus complanatus L4</i>	29-38	30-40	13/14	epiloban	150	11	150	š.s.č.	15	7 6/7-12/13	4 9-12	E	smeđe-siva
HREW156-02	<i>Octodrilus complanatus L4</i>	29-39	29-41		epiloban	172	9		š.s.č.	15				smečkasta
HREW103-01	<i>Octodrilus complanatus L4</i>	30-38	29-41	13/14	epiloban	184	10.4	190	š.s.č.	15	7 6/7-12/13	4 9-12	E	sivo-smeđa
HREW117-01	<i>Octodrilus complanatus L4</i>	30-38	29-41	12/13	epiloban	180	13	204	š.s.č.	15	7 6/7-12/13	4 9-12	E	smeđe-siva
HREW117-02	<i>Octodrilus complanatus L4</i>	28-38	30-40	12/13	epiloban	133	7.7	186	š.s.č.	15				smeđe-siva
HREW199-02	<i>Octodrilus complanatus L4</i>	29-38	29-41	12/13	epiloban	220	10	296	š.s.č.	15				ljubičasto-smeđa
HREW199-04	<i>Octodrilus complanatus L4</i>	29 1/2 -38	30-41	12/13	epiloban	195	13	288	š.s.č.	15				
HREW204-01	<i>Octodrilus complanatus L4</i>		29-40	12/13	epiloban	130	8	266	š.s.č.	15				smečkasta
HREW92-02	<i>Octodrilus sp. 2</i>			13/14	epiloban	111	7	136	š.s.č.	15	6 5/6-10/11	4 9-12		sivkasta
HREW219-01	<i>Octodrilus croaticus</i>	28-35	28-35	5/6	taniloban	35	4	96	š.s.č.	15	6 5/6-10/11	4 9-12		crveno-ljubičasta
HREW199-01	<i>Octodrilus sp. 3</i>	28-36		5/6	taniloban	45	3	146	š.s.č.	15	6 5/6-10/11	4 9-12		crveno-ljubičasta

Sample ID	Naziv vrste	Kl.	T.p.	Prva ledna pora	Prost.	duljina/ mm	širina/ mm	broj kol.	Tip četina	m.s.o.	Broj sjem. sprem.	Sjemene vrećice	Oblik test. vreće	Pigmentacija
HREW206-01	<i>Octodrilus</i> sp. 3	29-36	29-37		taniloban	56	6	163	š.s.č.	15				crveno-ljubičasta
HREW206-02	<i>Octodrilus</i> sp. 3	29-36	29-36		taniloban	40	6	68	š.s.č.	15	6 5/6-10/11	4 9-12		crveno-ljubičasta
HREW206-03	<i>Octodrilus</i> sp. 3	28-36	29-37	5/6	taniloban	38	6	85	š.s.č.	15				crveno-ljubičasta

8. Životopis

Moje ime je Dino De Bona. Rođen sam 12. rujna 1994. godine u Zagrebu. Živim u gradu Kutini, gdje sam pohađao osnovnu školu i opću gimnaziju SŠ Tin Ujević od 2009.-2013. Maturirao sam 2013. godine hrvatski jezik, matematiku i engleski jezik na A razini, te biologiju i kemiju.

Studirao sam farmaciju na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu (2013.-2016.), nakon čega sam promijenio studij i 2016. godine prešao na nastavnički smjer biologije i kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu.

Izradio sam dvije videolekcije „Osjetilo vida“ i „Osjetilo vida kod životinja“ za biologiju za 3. razrede srednjih škola kao doprinos nastavi na daljinu u sklopu projekta „Škola za život“ Ministarstva znanosti i obrazovanja tijekom epidemiološkog lockdowna (16.3.-10.6. 2020.). Radio sam na mjestu nastavnika biologije od 14.9.2021. - 12.11.2021. na zamjeni u SŠ Tin Ujević u Kutini u punom radnom vremenu, odnosno 40 sati redovitog rada tjedno. Krajem 2020. i tijekom 2021. na Prirodoslovnom odjelu Gradskog muzeja Varaždin odrađivao sam poslove vezane uz muzej poput projektnih istraživanja na terenima i inventarizacije muzejske građe. Terenska istraživanja uključuju projekt „Istraživanje i inventarizacija faune vretenaca (Odonata) i gujavica (Lumbricidae) na prostoru Nacionalnog parka Paklenica u 2021. godini“ na kojem sam i koautor završnog elaborata, projekt „Istraživanje riba - lokacija Drava u Varaždinskoj županiji u sklopu projekta Riverside“ i terenski rad na „Stručna podloga za potrebe postupka glavne ocjene prihvatljivosti ekološke mreže za zahvat izgradnje Akumulacije Krumpirište na Sljemenu u Općini Bistra za ciljnu vrstu područja ekološke mreže potočnog raka“.

24.11.2021. odlikovan sam medaljom Kemijskog odsjeka PMF-a za izvrstan uspjeh na studiju.