# Molekularna identifikacija vrsta roda Hydrochara (Coleoptera: Hydrophilidae)

**Lesjak, Maja**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:536160

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-28**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

*Repository / Repozitorij:*

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
ODJEL ZA BIOLOGIJU

Diplomski sveučilišni studij Biologija i kemija; smjer: nastavnički

**Maja Lesjak**

# Molekularna identifikacija vrsta roda *Hydrochara* (Coleoptera: Hydrophilidae)

Diplomski rad

OSIJEK, 2018.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku** **Diplomski rad**
**Odjel za biologiju**
**Diplomski sveučilišni studij Biologija i kemija; smjer: nastavnički**

**Znanstveno područje:** Prirodne znanosti
**Znanstveno polje:** Biologija

# MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA VRSTA RODA *HYDROCHARA* (COLEOPTERA: HYDROPHILIDAE)

**Maja Lesjak**

**Rad je izrađen:** Laboratorij za entomologiju, Odjel za biologiju, Osijek
**Mentor:** Dr. sc. Goran Vignjević, docent
**Komentor:** Dr. sc. Nataša Turić, docent

Vodeni kornjaši su sastavni dio biotičke komponente vodenih sustava te predstavljaju raznoliku skupinu koja ima niz karakteristika koje ih čine dobrim biološkim indikatorima. Unutar reda Coleoptera porodica Hydrophilidae ima velik broj vrsta čije predstavnike karakterizira velika raznolikost i prilagođenost na različite tipove vodenih staništa. Rod *Hydrochara* je zastupljen s 23 vrste, a Hrvatska je područje rasprostranjenosti dvije vrste *H. caraboides* i *H. flavipes*. Kako su razlike u morfologiji jedinki roda *Hydrochara* primijećene samo u veličini jedinki, pristupilo se molekularnom istraživanju upotrebom dva mitohondrijska markera: geni za citokrom oksidazu podjedinica I (COI) i za manju podjedinicu ribosomalne RNA (16S rRNA). Cilj ovog istraživanja je molekularnom identifikacijom i analizom COI i 16S rRNA gena odrediti vrste unutar roda *Hydrochara* te utvrditi raznolikost i rasprostranjenost kornjaša roda *Hydrochara* na području kontinentalne Hrvatske. Dobiveni rezultati se podudaraju s opće prihvaćenom sistematikom baze podataka Fauna Europaea prema kojoj je Hrvatska područje rasprostranjenosti dvije vrste iz roda *Hydrochara*, vrste *H. caraboides* i vrste *H. flavipes.* Različitost uzorka s otoka Virje (OV) u filogenetskim analizama ukazuje na prisutnost nove vrste unutar roda *Hydrochara* na području Hrvatske što se mora dodatno potvrditi budućim istraživanjima.

**Broj stranica:** 65
**Broj slika:** 19
**Broj tablica:** 7
**Broj literaturnih navoda:** 66
**Broj priloga:** 1
**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** vodeni kornjaši, *Hydrochara*, molekularni markeri COI i 16S rRNA, filogenetski odnosi

**Datum obrane:** 24. siječnja 2018.

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. Doc. dr. sc. **Nataša Turić**, komentor i predsjednik povjerenstva
2. Doc. dr. sc. **Goran Vignjević**, mentor i član
3. Prof. dr. sc. **Enrih Merdić**, redoviti profesor, član
4. Prof. dr. sc. **Stjepan Krčmar**, redoviti profesor, zamjenik člana

**Rad je pohranjen u:** knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, u elektroničkom obliku, te je objavljen na web stranici Odjela za biologiju.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek** **MS thesis**
**Department of Biology**
**Graduate university study programme in Biology and Chemistry Education**

**Scientific Area:** Natural science
**Scientific Field:** Biology

# MOLECULAR IDENTIFICATION OF A SPECIES IN GENUS *HYDROCHARA* (COLEOPTERA: HYDROPHILIDAE)

**Maja Lesjak**

**Thesis performed at**: Laboratory of entomology, Department of Biology, Osijek
**Supervisor**: Goran Vignjević, PhD, Assistant Professor
**Cosupervisor**: Nataša Turić, PhD, Assistant Professor

Water beetles are an integral part of biotic component of water systems and they represent a diverse group with features that make them good biological indicators. Within the order Coleoptera Hydrophilidae is family of water beetles with morphologically diverse representatives that live in various habitats. The genus *Hydrochara* comprises 23 species that occur in Europe and there are 2 species known in the Croatia, *H. caraboides* and *H. flavipes.* Differences in the morphology of the *Hydrochara* were observed only in the size and this is the reason why we approached to molecular research using two mitochondrial markers: genes for cytochrome oxidase subunit 1 (COI) and for smaller subunit of ribosomal RNA (16S rRNA). The main objective of this study was to determine the species within the *Hydrochara* genus and to determine the diversity and distribution of the *Hydrochara* genus in the continental Croatia. The results of research match with the systematics of Fauna Europaea database according to which Croatia is area with two species of *Hydrochara* genus, *H. caraboides* and *H. flavipes*. The diversity of samples from the island of Virje (OV) in the phylogenetic analyzes indicates the presence of a new species within the genus *Hydrochara* in Croatia, which must be confirmed in future research.

**Number of pages:** 65
**Number of figures:** 19
**Number of tables:** 7
**Number of references:** 66
**Number of appendices**: 1
**Original in:** Croatian

**Key words:** water beetles, *Hydrochara*, molecular markers COI and 16S rRNA, phylogenetic relationship

**Date of the thesis defence:** 24th January 2018.

**Reviewers:**

1. **Nataša Turić**, Ph. D. Assistant Professor, cosupervisor and commission president
2. **Goran Vignjević**, Ph. D. Assistant Professor, supervisor and member
3. **Enrih Merdić**, Ph. D. Full Professor, member
4. **Stjepan Krčmar**, Ph. D. Full Professor, substitute

**Thesis deposited in** Library of Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek and in National university library in Zagreb in electronic form and on the web site of Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek.

# SADRŽAJ


**1. UVOD ..... 1**

1.1. Sistematika vodenih kornjaša ..... 1

1.2. Značajke vodenih kornjaša iz podreda Polyphaga (Hydrophilidae) ..... 3

1.2.1. Vanjska građa ..... 3

1.2.2. Unutrašnja građa ..... 6

1.2.3. Disanje ..... 7

1.2.4. Prehrana ..... 9

1.2.5. Životni ciklus ..... 10

1.3. Ekologija i stanište vodenih kornjaša iz podreda Polyphaga (Hydrophilidae) ..... 12

1.4. Pregled povijesnih istraživanja vodenih kornjaša iz podreda Polyphaga (Hydrophilidae) u Hrvatskoj ..... 15

1.5. Ciljevi istraživanja ..... 16

**2. MATERIJALI I METODE ..... 17**

2.1. Područje istraživanja ..... 17

2.2. Metode uzorkovanja vodenih kornjaša ..... 17

2.3. Izolacija DNA ..... 18

2.4. Određivanje koncentracije DNA ..... 19

2.5. Umnožavanje DNA lančanom reakcijom polimeraze (PCR) ..... 19

2.5.1. Početnice ..... 20

2.5.2. Reakcijske smjese PCR-a i uvjeti reakcija za markere COI i 16S rRNA ..... 20

2.6. Elektroforetsko razdvajanje odsječaka DNA u agaroznom gelu ..... 22

2.7. Određivanje nukleotidnih sljedova PCR produkata i bioinformatička analiza nukleotidnih sljedova ..... 23

**3. REZULTATI ..... 24**

3.1. Vrsta *Hydrochara caraboides* Linnaeus, 1758 ..... 28

3.2. Vrsta *Hydrochara flavipes* Steven, 1808 ..... 30

3.3. Usporedba sekvenci vrsta *Hydrochara caraboides* i *Hydrochara flavipes* ..... 32

3.4. Filogenetsko stablo dobiveno „Neighbor joining“ (NJ) metodom za grupu COI gena ..... 34

**4. RASPRAVA ..... 36**

**5. METODIČKI DIO ..... 39**

**6. ZAKLJUČAK ..... 49**

**7. LITERATURA ..... 50**

**8. PRILOZI ..... 56**

Prilog 1. PowerPoint prezentacija Razred kukci (Insecta)“ ..... 56

*Veliku zahvalnost dugujem mentoru docentu dr. sc. Goranu Vignjeviću i komentorici docentici dr. sc. Nataši Turić na stručnoj pomoći, savjetima i vodstvu tijekom izrade diplomskog rada.*

*Također se zahvaljujem docentici dr. sc. Rosemary Vuković na pomoći i stručnim savjetima prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada.*

*Hvala kolegama s fakulteta na potpori, konstruktivnoj kritici i odličnim vremenima provedenim u njihovom društvu.*

*Hvala dragim prijateljicama Anji i Magdaleni na ljubavi, motivaciji, podršci te na mnogobrojnim zabavnim trenucima. Hvala vam na prijateljstvu bez kojeg ništa ne bi imalo smisla!*

*Hvala Toniju što vjeruje u mene.*

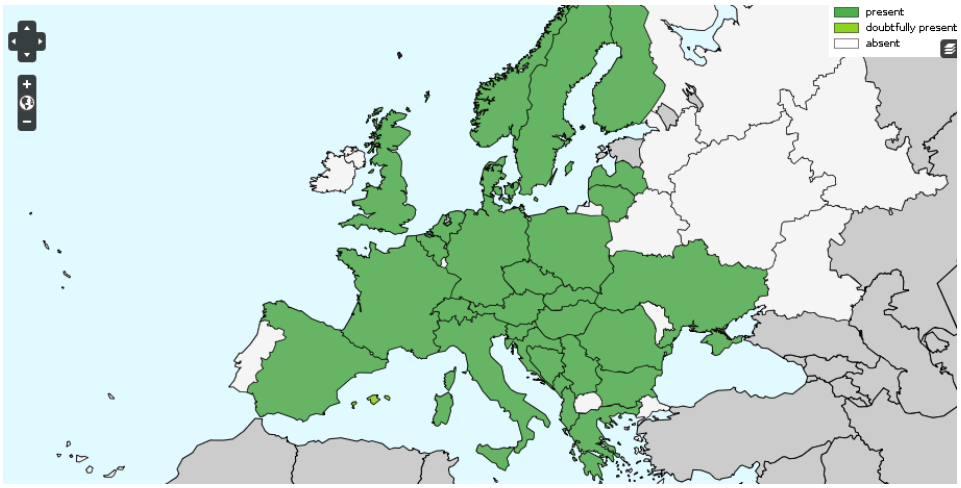
*I za kraj, veliko hvala mojoj obitelji na neizmjernom razumijevanju, podršci, na svim odricanjima i trudu kojeg su uložili u moje akademsko obrazovanje. Hvala što ste uvijek tu!*

# 1. UVOD

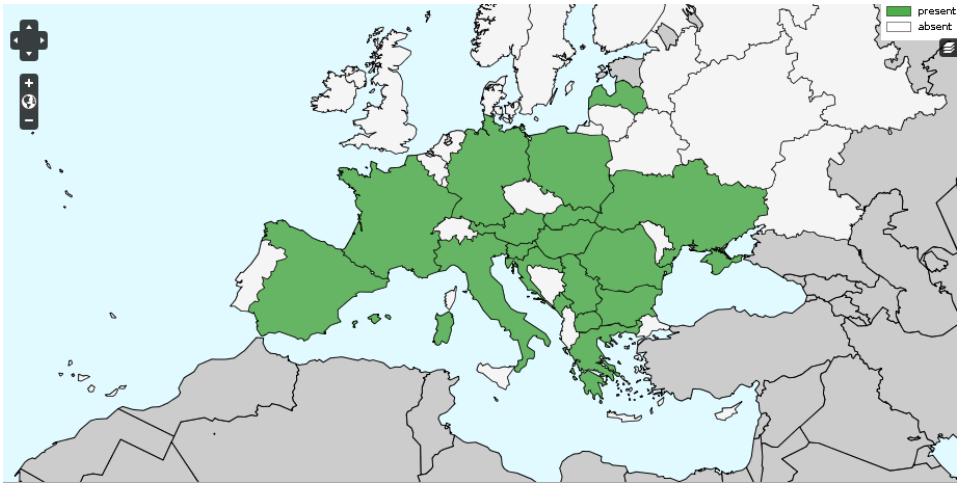
## 1.1. Sistematika vodenih kornjaša

Red Coleoptera pripada velikom koljenu člankonožaca te predstavlja najveći red unutar razreda Insecta s više od 400 000 opisanih vrsta (Jäch i Balke, 2008). Smatra se najbrojnijom skupinom u životinjskom carstvu i čine ga četiri podreda: Adephaga (grabežljivci), Polyphaga (raznojedi), Myxophaga i Archostemata (White, 2009). Podred Polyphaga ima oko 370 000 opisanih vrsta (1,25% su vodene vrste) što ga čini najbrojnijim podredom u redu Coleoptera (Jäch i Balke, 2008). Hydrophiloidea je nadporodica sa svjetskom distribucijom koja sadrži oko 475 rodova i 6600 opisanih vrsta grupiranih u 3 kopnene porodice: Synteliidae, Sphaeritidae, Histeridae i jednu primarno vodenu porodicu Hydrophilidae (Bernhard i sur., 2009). Porodica Hydrophilidae (vodoljupci) sadrži oko 2652 opisanih vrsta svrstanih u 174 roda te je zastupljena na svim kontinentima osim Antarktike zahvaljujući njihovoj sposobnosti leta i brzoj prilagodbi na različite promjene u staništu (Jäch i Balke, 2008). Porodica se dijeli u četiri potporodice: Horelophopsinae, Horelophinae, Hydrophilinae i Sphaeridiinae, od kojih su samo Hydrophilinae i Sphaeridiinae široko rasprostranjene (Boukal i sur., 2007). Hydrophilinae su najveća potporodica koja se sastoji od 66 rodova s oko 1740 opisanih vrsta (Jäch i Balke, 2008).

Rod *Hydrochara* zastupljen je s 23 vrste koje prema zoogeografskoj podjeli kopnene faune nalazimo u neoarktičkoj (Sjeverna Amerika), paleartičkoj (Euroazija), etiopskoj (veći dio Afrike) i orijentalnoj (Indija i JI Azija) regiji (Short i Fikáček, 2011). Prema Alonso-Zarazaga (2013) na području Europe zabilježene su četiri vrste koje pripadaju rodu *Hydrochara*, a to su: *Hydrochara caraboides* (Linnaeus, 1758), *Hydrochara dichroma* (Fairmaire, 1892), *Hydrochara flavipes* (Steven, 1808) i *Hydrochara semenovi* (Zaitzev, 1908). Vrsta *H. caraboides* ima najveći areal rasprostranjenosti na području Europe, dok ju slijedi vrsta *H. flavipes*. Prema bazi podataka Fauna Europaea (web 1), Hrvatska je područje rasprostranjenosti dvije vrste iz roda, a to su *H. caraboides* (Slika 1.) i *H. flavipes* (Slika 2.). Recentna istraživanja Hydrophilidae navode samo prisustvo vrste *H. caraboides* na području kontinentalne Hrvatske (Turić, 2013).




**Slika 1.** Areal rasprostranjenosti vrste *Hydrochara caraboides* na području Europe (web 1)




**Slika 2.** Areal rasprostranjenosti vrste *Hydrochara flavipes* na području Europe (web 1)

**SISTEMATIKA RODA:**

CARSTVO**: Animalia**

KOLJENO**: Arthropoda**

POTKOLJENO**: Hexapoda**

RAZRED**: Insecta**

RED**: Coleoptera**

PODRED: **Polyphaga**

NADPORODICA: **Hydrophiloidea**

PORODICA**: Hydrophilidae**

POTPORODICA: **Hydrophilinae**

ROD**: *Hydrochara***

## 1.2. Značajke vodenih kornjaša iz podreda Polyphaga (Hydrophilidae)

### 1.2.1. Vanjska građa

Gotovo cijelo tijelo kornjaša pokrivaju tvrda pokrilja (elitrae) (Slika 3.) koja su nastala očvrsnućem prvog para krila. Ukoliko drugi par krila nije reduciran, on je opnast te pomoću njega kornjaši mogu letjeti (Habdija i sur., 2011). Tijelo je najčešće ovalnog oblika te je njegov obris slabo prekinut između pronotuma ili elitre. Leđna strana (Slika 5.) tijela ima specifičnu građu zbog prvog segmenta prsišta koji je s leđne strane jače hitiniziran te tvori nadvratni štit - pronotum. Gornja ploča prothoraxa (pronotum) je uvijek najširа u bazi ili jako blizu baze (Hansen, 1991). Heteronomno tijelo kukca čini 20 kolutića koji su raspoređeni u cjeline (tagme). Prvi tjelesni kolutić (akron) spaja se s pet kolutića te čini glavu, prsa čine 3 kolutića (prothorax, mesothorax i metathorax), dok zadnji tjelesni kolutić (telzon) zajedno s 10 kolutića čini zadak (Habdija i sur., 2011).

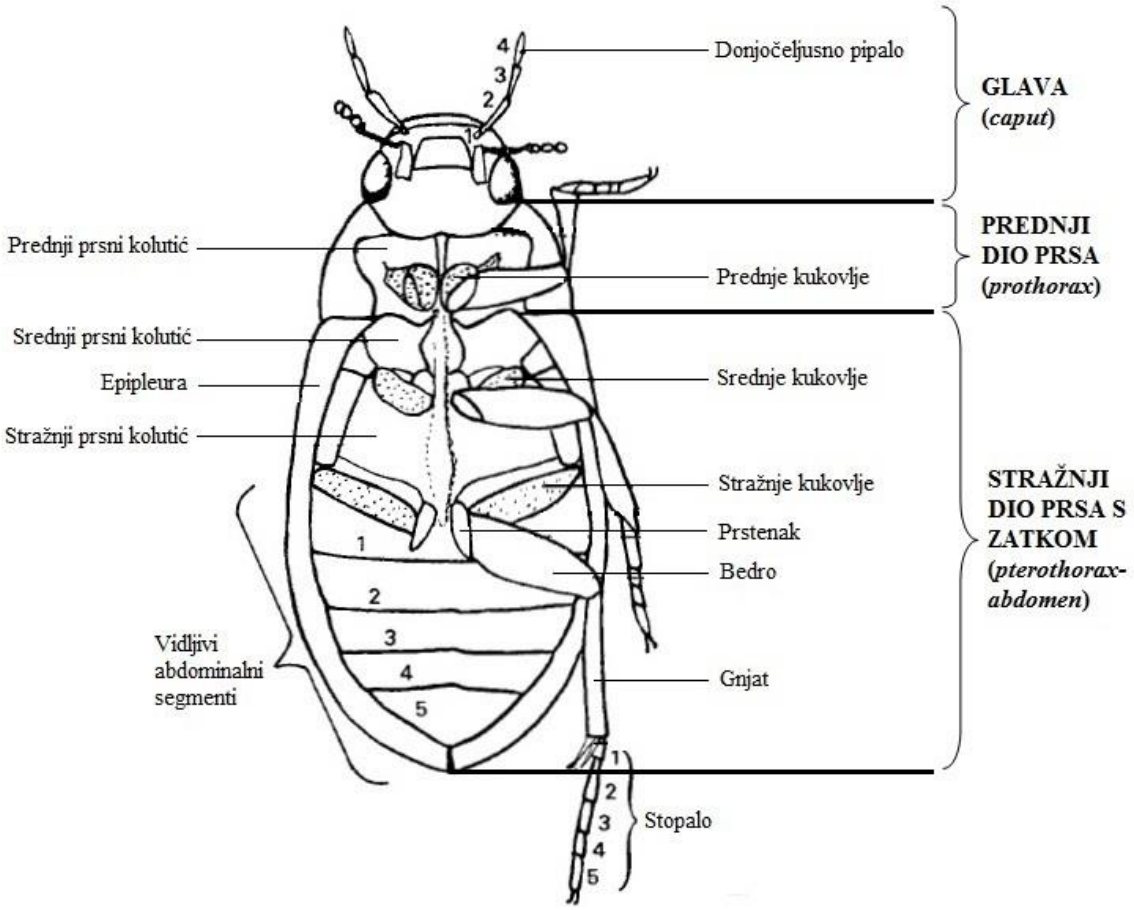



**Slika 3.** Tvrda pokrilja (elitrae) i letna krila vrste *Hydrochara caraboides* (web 2)

Odrasli stadij (imago) kornjaša karakterizira drugačija morfologija od ostalih kukaca, a morfološke značajke koje pridonose različitoj morfologiji jesu:

- sklerotizirano tijelo (Slika 3.) s prednjim parom krila koji je hitiniziran u pokrilje (elitrae) koje imaju funkciju zaštite stražnjeg opnastog para krila (potkrilje), kao i leđne površine stražnjeg dijela dva torakalna segmenta (pterotorax) i zadka (abdomen),

- prisustvo štitića (gula) koji se nalazi na donjoj strani tijela, točnije na spoju između prvog kolutića prsa i glave,
- stražnji par krila (potkrilje) koji ima primarnu funkciju letenja, dok se u fazi mirovanja nalazi sklopljen ispod pokrilja (elitrae),
- stražnji dio prsa (thorax) spojen je sa zatkom (abdomenom) u spoj naziva pterothorax-abdomen (Slika 4.),
- nekarakteristična podjela tijela na glavu (caput), prednji dio prsa (prothorax) i stražnji dio prsa sa zatkom (pterothorax-abdomen), umjesto podjele na glavu (caput), prsa (thorax) i zadak (abdomen),
- genitalije kornjaša koje se nalaze uvučene u zadak,
- ticala (antenna) koja su sastavljena od 11 članaka (Nilsson, 1996; Jäch i Balke 2008).




**Slika 4.** Vanjska građa vodenih kornjaša (porodica Hydrophilidae) (Preuzeto i prilagođeno iz Friday, 1988)

Glava kornjaša je cjelovita hitinska čahura različitih veličina i oblika na kojoj se nalaze složene oči, 1 par ticala koji je sastavljen od 11 manjih članaka i gornje usne (labrum). Usta okružuju 3 para člankovitih usnih organa koji se sastoje od gornje čeljusti (mandibulae), donje čeljusti (maxillae) i donje usne (labium) te su preoblikovani za grizenje (Habdija i sur., 2011).

Prsa čini prednji prsni kolutić (prothorax) koji je velik i on je pokretačka tagma u kukaca te se može pokretati neovisno o drugim dijelovima tijela. Za prsni kolutić straga je pričvršćen trouglasti štitić (Nilsson, 1996). Srednji prsni kolutić (mesothorax) i stražnji prsni kolutić (metathorax) zajedno sa zatkom čine pterothorax - abdomen. Jedan par člankovitih nogu nalazi se na svakom od tri prsna kolutića, a sastoje se od 6 članaka: kuk (coxa), prstenak (trochanter), bedro (femur), gnjat (tibia) i stopalo (tarsus). Neki predstavnici vodenih kornjaša imaju stražnje noge koje su prilagođene za plivanje na način da su spljoštene i krute te su na rubovima proširene duljim dlakama (Habdija i sur., 2011). Stopalo je sastavljeno od 5 članaka te se na zadnjem, petom članku nalaze parne pandžice (Nilsson, 1996). Krila se nalaze na gornjoj strani srednjeg i stražnjeg, ili samo srednjeg kolutića. Prednji par krila je hitiniziran i ne sadrži krilna rebra. On pokriva stražnja krila te je zbog toga dobio naziv pokrilje. Stražnji par krila, ukoliko postoji, ima letnu funkciju (Matoničkin, 1981).

Zadak čini 5 do 7 kolutića. Vodeni kornjaši nemaju začanih privjesaka, koji inače obavljaju osjetnu funkciju. Posljednji kolutići zatka obično se nalaze uvučeni u prednje kolutiće (Matoničkin, 1981).



a) b)

**Slika 5**. a) Leđna strana (dorzalna) i b) trbušna strana (ventralna) vanjskog hitinskog oklopa vrste *Hydrochara caraboides* (web 3)

### 1.2.2. Unutrašnja građa

Tjelesna šupljina kukaca koja je po podrijetlu hemocel i u kojoj se nalaze unutarnji organi naziva se miksocel.

Optjecajni sustav kod kukaca je otvoren i čini ga stežljiva leđna krvna žila koja je smještena na leđnoj strani te ima funkciju srca. Prednji dio krvne žile je aorta koja se pruža prema glavi. U leđnu krvnu žilu kroz postrane zaliske ulazi hemolimfa, tjelesna tekućina bezbojne ili žućkaste, zelenkaste ili smećkaste boje u kojoj se nalaze hemociti, kationi i anioni, a kod nekih kukaca i hemoglobin (Habdija i sur., 2011).

Probavni sustav kod kornjaša započinje ustima koja se nalaze na prvom kolutiću na koja se nastavlja ždrijelo, jednjak, volja i žvačni predželudac (Habdija i sur., 2011). U žvačnom predželucu nalazi se 4 nabora s nizovima hitinskih zubića i pločica koje služe za mrvljenje hrane. Uz nabore, u žvačnom predželucu nalaze se jaki kružni i uzdužni mišići. Dalje na predželudac nastavlja se crijevo koje se sastoji od prednjeg, srednjeg i stražnjeg dijela (Matoničkin, 1981).

Malpighijeve cjevčice su nerazgranati izvrati crijeva u hemocel (Habdija i sur., 2011) koje vrše ekskretornu ulogu te se nalaze na prijelazu iz srednjeg u stražnje crijevo (Matoničkin, 1981). Masna tijela, krpaste nakupine mezodermalnih stanica, koja se nalaze sa strane crijeva također imaju funkciju u metabolizmu kukaca. Ona sudjeluju u sintezi i metabolizmu masti, glikogena i bjelančevina te u sintezi mokraćne kiseline i deaminaciji dušikovih spojeva (Habdija i sur., 2011).

Živčani sustav ima ljestvičastu građu, te je u području prsa i zatka došlo do stapanja ganglija (Matoničkin, 1981) pa su se tako prva tri para živčanih ganglija stopila u nadždrijelni (cerebralni) ganglij („mozak“), a druga tri u podždrijelni ganglij (Habdija i sur., 2011).

Oplodnja kod kornjaša je unutarnja i parne gonade smještene su u zatku. Parni gonodukti (sjemenovodi i jajovodi) združuju se u neparnu cjevčicu koja se otvara neparnim spolnim otvorom (Habdija i sur., 2011). Na spolni otvor ženke priključena je cjevasta leglica za odlaganje jajašaca. Rasplodni organi sastavljeni su na isti način kod mužjaka i ženki: od parnih plodila (gonada), njihovih izvodnih cijevi i žljezdanih dodataka (Matoničkin, 1981).

### 1.2.3. Disanje

Čimbenik o kojem ovisi izmjena plinova kod kukaca jest difuzija kisika, koja je brza kroz zrak, spora kroz vodu te najsporija kroz kutikulu. Iako je kutikula kukaca nepropusna za plinove, difuzija kisika preko površine tijela može biti dovoljna za manje vodene kukce, odnosno ličinke vodenih kukaca. Kukci koji imaju trahealni sustav za disanje i žive u vodi imaju veće potrebe za kisikom te su morali razviti niz prilagodbi kako bi se suočili s nižim koncentracijama kisika u vodenim staništima. Tako su vrste koje nastanjuju stajaćice razvile prilagodbe za uzimanje kisika, budući da je tamo difuzija kisika iz atmosfere u vodu mala (Gullan i Cranston, 2010).

Vodeni kornjaši razvili su dva načina podvodnog disanja. Vrste iz porodice Hydrophilidae nose zrak u obliku zračnog sloja (plastrona) (Slika 6.) koji je smješten na dlačicama na trbušnoj strani tijela. Ove vrste vodenih kornjaša kisik mogu uzimati direktno iz vode i upravo zbog toga mogu ostati ispod površine vode duže vrijeme (Rockstein, 1973).

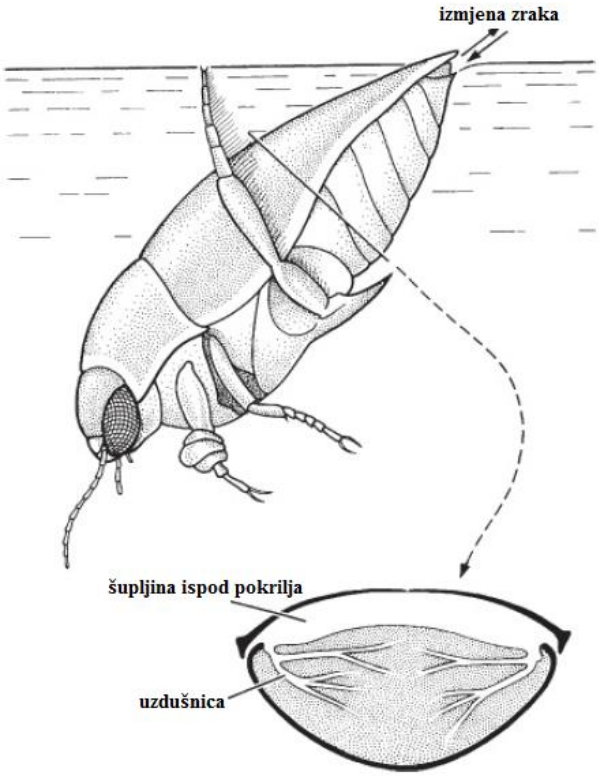
Plastron je poseban niz krutih, blisko raspoređenih hidrofobnih dlaka (setae) koje stvaraju "zračni prostor" na trbušnoj strani tijela. Zrak koji je zarobljen unutar plastrona djeluje kao škrge (baš kao i zrak u mjehuriću), ali taj se zračni prostor ne može smanjiti jer dlake sprječavaju ulazak okolne vode. Kad kukac troši kisik, dolazi do parcijalnog deficita kisika unutar plastrona. Taj je deficit "ispravljen" otopljenim kisikom koji difundira iz vode. Kako dušik postupno difundira iz mjehurića, on stvara sličan deficit parcijalnog tlaka. No, u vodi ima vrlo malo otopljenog dušika (ima niži potencijal topljivosti od kisika), tako da se parcijalni deficit dušika nadomješta kisikom. Zapravo, plastron izmjenjuje dio dušika za kisik te tako održava konstantan volumen plina koji se polako obogaćuje kisikom. Stalan volumen plinova u plastronu uklanja periodičnu potrebu za izranjanjem na površinu i punjenje mjehurića. Insekti koji ostaju trajno potopljeni ili nemaju mogućnost izranjanja na površinu vjerojatno će imati plastron. Ove strukture su često vidljive pod vodom kao tanki, srebrni filmovi koji se nalaze na trbušnoj strani tijela (web 8).




**Slika 6.** Kisik u obliku tankog sloja koji se nalazi na dlačicama na trbušnoj strani (web 4, web 5)

Druge vrste vodenih kornjaša imaju spremišta zraka u obliku zračnih mjehurića koji se nalaze u subelitralnom prostoru (Slika 7.). Kod vodenih kornjaša postoje dvije vrste dlačica, kratke i duge. Duge dlačice drže zračni mjehurić koji brzo smanjuje svoj volumen kad životinja uranja u vodu, dok manje dlačice drže plinoviti sloj koji je relativno trajan sve dok životinja ne uroni previše duboko (Rockstein, 1973).

Mjehurić obično pokriva jednu ili više uzdušnica tako da kukac može "udahnuti" zrak iz mjehurića dok je potopljen. Mjehurić zraka opskrbljuje kukca kisikom samo kratkotrajno, zahvaljujući svojim jedinstvenim fizičkim svojstvima, mjehurić može "skupiti" molekule kisika koje su otopljene u okolnoj vodi. U stvari, mjehur djeluje kao škrge - vrši opskrbu kisikom pasivnom difuzijom. Što je površina mjehurića veća, sustav funkcionira učinkovitije. Kukci mogu ostati pod vodom sve dok je volumen kisika koji se raspršuje u mjehuriću veći ili jednak volumenu kisika koji kukac troši. Nažalost, veličina mjehurića se tijekom vremena smanjuje kako dušik polako difundira u vodu. Kada se površina mjehurića smanji, njegova se brzina razmjene plinova također smanjuje. Na kraju, mjehur postaje premalen kako bi držao korak s metaboličkim zahtjevima, a kukac mora obnoviti zalihu kisika unutar mjehurića povratkom na površinu vode (web 8).




**Slika 7.** Zračni mjehurić i izmjena kisika kod porodice Dytiscidae (preuzeto i prilagođeno iz Gullan i Cranston, 2010)

Ličinke vodenih kornjaša nisu razvile nikakva vanjska spremišta za zrak, već imaju sustav trahealnih škrga, dok one koje ih nemaju koriste zrak koji je zarobljen unutar stabljika vodene vegetacije ili ga uzimaju direktno preko površine tijela s površine vode (Nilsson, 1996).

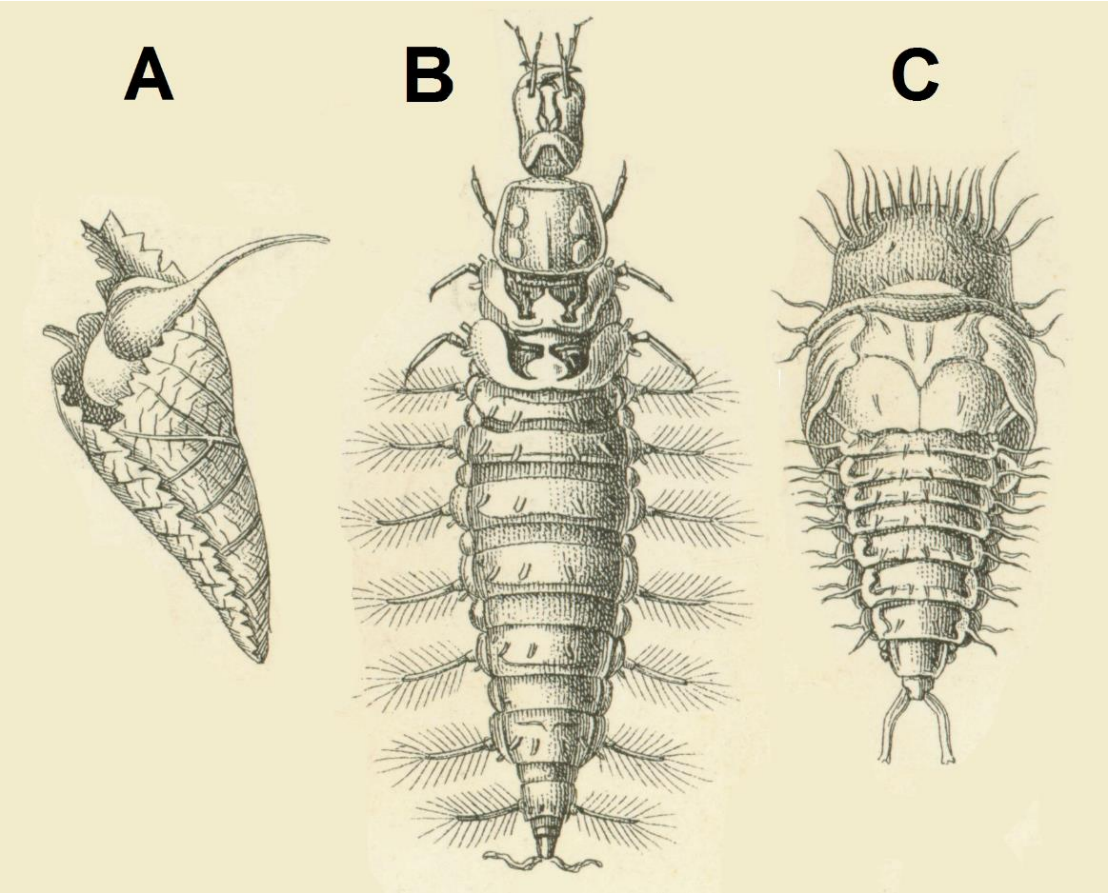
### 1.2.4. Prehrana

Iako vodeni kornjaši Coleoptera pokazuju različite prehrambene navike, i larve i odrasle jedinke većine vrsta su grabežljivci ili sakupljači (Gullan i Cranston, 2010). Predstavnici nadporodice Hydrophiloidea zastupljeni su s velikom brojnošću te imaju bitnu ekološku ulogu na staništima na kojima se pojavljuju. Ličinke nadporodice Hydrophiloidea hrane se algama i sporama, ali su i predatori ili povremeno strvinari. Hrane se sitnim beskralježnjacima i općenito nisu jako specijalizirani u pogledu izbora hrane. Odrasle jedinke su nespecijalizirani biljojedi koji se hrane živim i mrtvim biljnim materijalom. Nijedna vrsta nije pretežno predatorska vrsta, već neke mogu biti svejedi što označava povremeno hranjenje malim beskralježnjacima ili raznim vrstama raspadajućeg organskog materijala.

Nije poznato koja životinjska vrsta predstavlja najveću opasnost za vodene kornjaše, no mnoge jedinke predstavljaju plijen ostalim vodenim predatorima, kukcima poput porodice Dytiscidae. Osim većih jedinki, manje jedinke su rijetko izložene riziku da postanu plijen većim vodenim predatorima kao što su ribe i ptice. Nekoliko jedinki vodenih kornjaša pronađeno je kao domaćin parazitskim nematodama. Također vodene grinje se pojavljuju kao ektoparaziti na odraslim jedinkama vodenih kornjaša te se nalaze u prostoru ispunjenim zrakom ispod pokrilja (Nilsson, 1996).

### 1.2.5. Životni ciklus

Kornjaši su kukci koji prolaze kroz proces potpune preobrazbe nazvane holometabolija (Jäch i Balke, 2008). Neki od njih su se sekundarno prilagodili životu u vodi, u kojoj provode barem jedan dio životnog ciklusa koji se odvija kroz četiri stadija: jaje, ličinka, kukuljica (pupa) (Slika 8.) i odrasla jedinka (imago) (Nilsson, 1996).




**Slika 8.** *Hydrochara caraboides*: a) jajna čahura (ootheca) b) ličinka c) kukuljica (Fauna Germanica: Die Käfer des deutschen Reiches (vol. II, pl. 79) (web 7)

Jaja vodenih kornjaša su blijeda, izduženog oblika s malim izraštajem ili vlaknastim privjeskom na kraju. Odlaganje jaja vodenih kornjaša razlikuje se od porodice do porodice. Tako neke porodice odlažu jaja pojedinačno ili 2 i više jaja zajedno (Hydrophiloidea). Kod porodice Hydrophiloidea nakupina jaja se u potpunosti nalazi u svilenoj čahuri ili u labavoj mrežici te mogu biti pričvršćena za vodenu vegetaciju (iznad razine vode). Čahure mogu biti smještene u mulju uz rub vode ili mogu slobodno plivati u vodi prekrivena lišćem, barem na gornjoj strani kao što je slučaj kod većih vrsta (*Hydrochara*). Broj čahura s jajima koje ženka proizvede je normalno od 4 do 5, ovisno o vrsti, dok broj jaja koja se nalaze u čahuri varira od 5 do 20, ali nekad može preći broj 100. Vodeni kornjaši odlažu jaja u proljeće ili rano ljeto, koja se izlegu u razdoblju od jednog do dva tjedna.

Ličinke mnogih Hydrophiloidea (Slika 9.) su vodene i rastu velikom brzinom te u roku od dva do četiri tjedna dosegnu potpunu veličinu. Većina ličinki vodenih kornjaša ima 3 razvojna stadija (Nilsson, 1996). Ličinka ima izraženu sklerotiziranu glavu sa snažno razvijenim čeljustima i ticalima koja se sastoje od dva ili tri segmenta (Gullan i Cranston, 2010). Potpuno odrasla ličinka napušta vodu zbog procesa nastanka kukuljice, koji se događa u litoralnoj zoni (Nilsson, 1996).




**Slika 9.** Ličinke vrste *Hydrochara caraboides* (web 6)

Duljina stadija kukuljice traje do nekoliko tjedana, te nakon razvitka odraslog kukca, jedinke ostaju u skloništu još oko tjedan dana, sve dok im egzoskelet ne očvrsne i dok u potpunosti ne dobiju pigmentaciju (Nilsson, 1996). U stadiju kukuljice krila i noge kukca lako su vidljive te se takva kukuljica naziva exaratna. Stadij kukuljice karakterizira nedostatak

funkcionalnih čeljusti (Gullan i Cranston, 2010) stoga usni aparat ličinke i imaga služi većinom za grizenje (Jäch i Balke, 2008).

Odrasle jedinke mogu biti viđene sredinom ljeta ili u kasno ljeto, kada ulaze u period leta tijekom kojeg migriraju ili nastanjuju nova staništa. Neke vrste fiziološki su sposobne da se razmnožavaju u jesen, a da jaja polažu tek sljedeće proljeće. Mnoge vrste imaju i drugi period migracije u proljeće, prije početka polaganja jaja. Kada vladaju optimalni vremenski uvjeti – topli sunčani periodi praćeni olujama – oni mogu migrirati na velike udaljenosti, do nekoliko stotina kilometara. U takvim uvjetima često su pronađeni u velikom broju među ostalim kukcima u nanosima na obalama (Nilsson, 1996).

### 1.3. Ekologija i stanište vodenih kornjaša iz podreda Polyphaga (Hydrophilidae)

Jedan od bitnih bioloških elemenata za ocjenu ekološkog stanja slatkih voda predstavljaju makroskopski beskralježnjaci upravo zbog razloga jer posjeduju određene prednosti pred drugim vodenim organizmima (Barbour i sur., 1999). Promjene ekoloških uvjeta u okolišu poput promjene kemijskog sastava vode (količina otopljenih soli, kisika i ugljik (IV)-oksida), fizikalnih svojstava vode (svjetla, brzine, temperature), dnevne ili sezonske promjene režima protoka vode, dovode do promjena u strukturi i brojnosti zajednice. Sastav zajednice makrozoobentosa ovisiti će o ekološkim prilikama koje vladaju na nekom staništu, bile one pozitivne ili negativne, poput organskih i anorganskih onečišćenja, toksičnih tvari, kiselosti te morfoloških promjena vodotoka. Beskralježnjaci ne reagiraju jednako na različite biotičke i abiotičke čimbenike u okolišu. Stoga se kao pokazatelj kakvoće voda koristi prisustvo i odsustvo pojedinih vrsta te struktura zajednice vodenih beskralješnjaka (Rosenberg i Resh, 1993).

Vodeni kornjaši su sastavni dio biotičke komponente bilo kojeg vodenog sustava ili močvarnog područja. Predstavljaju veliku, raznoliku skupinu te su izvrsni pokazatelji kakvoće staništa, starosti i prirodne stabilnosti staništa. Oni su pokazatelji ekološke raznolikosti i karakteristika staništa, s obzirom da ispunjavaju većinu kriterija u izboru indikatorskih vrsta. Imaju niz karakteristika koje ih čine dobrim biološkim indikatorima te mogu poslužiti kao dobri pokazatelji stanja ekološkog sustava (Sharma i sur., 2013). Indikatorske vrste imaju specifične fizikalne i kemijske zahtjeve. Promjene u prisutnosti ili odsutnosti, broju, morfologiji, fiziologiji i ponašanju ovih organizama pokazatelji su da se fizikalni i kemijski čimbenici nalaze izvan optimalnih granica. Ukoliko raste brojnost porodice s izuzetno otpornim organizmima,

povećanje ukazuje na lošu kvalitetu vode (Rosenberg i Resh, 1993). Osobine bioloških indikatora jesu: bogatstvo i raznolikost vrsta, lako sakupljanje, poznata ekologija, otpornost na promjene u okolišu i dobri odgovori organizma (Sharma i sur., 2013). Vodeni kornjaši su idealni indikatori bioraznolikosti vodenih ekosustava zbog sljedećih razloga: taksonomski su dobro poznata skupina organizama, te je poznata njihova biologija i životni ciklus. Osim toga, populacije se lako uzorkuju/istražuju i prate. Nadalje, svaka se populacija specijalizira na užem staništu i na taj se način određeni obrasci koji su primijećeni kod indikatorskih vrsta očituju i na drugim srodnim ili ne srodnim vrstama (Noss, 1990; Pearson, 1994).

Slatkovodne močvare, primarna staništa vodenih kornjaša, imaju veliku biološku raznolikost. Mnoge od tih močvara trenutno su ugrožene ponovnim obnavljanjem staništa, degradacijom staništa koja uključuje sušenje, eutrofikaciju i zakiseljavanje (Verberek i sur., 2005). Mnoge vrste su pokazale značajne i dramatične promjene u brojnosti vrsta od sredine 20. stoljeća kao odgovor na različite čimbenike koji utječu na njih, osobito intenziviranje poljoprivrede, isušivanje močvarnih područja i povećano zagađenje koje dovodi do eutrofikacije. Broj vrsta i sama stabilnost nekog ekološkog sustava također se smanjuje smanjenjem površine na kojoj taj sustav postoji i stoga fragmentacija staništa danas predstavlja jednu od najvećih prijetnji biološkoj raznolikosti (Sharma i sur., 2013). Kako bi se mogli boriti protiv ovih prijetnji potrebno je dodatno istražiti o tome kako se organizmi ponašaju u svom okolišu (Verberek i sur., 2005).

Istraživanja vodenih beskralježnjaka usredotočena su na sva vodena staništa te povezuju prisutnost i brojnost beskralježnjaka s obzirom na varijable okoliša koje definiraju vodena staništa kao samostalnu jedinicu ili predstavljaju prosječnu vrijednost za cijelo vodeno stanište. Primjeri varijabli jesu: starost vodenog staništa, kiselost, površina, trajnost i slanost. Međutim, vodena staništa su rijetko homogena te se sastoje od različitih elemenata. Takva mikrostaništa razlikuju se u varijablama poput raspoloživosti hrane, zasićenosti kisikom, temperaturi, sastavu vegetacijske zajednice i interakcijama predator-plijen. Te razlike u pojedinim varijablama omogućavaju beskralježnjacima preživljavanje ili prebacivanje između mikrostaništa (Verberek i sur., 2005).

Otkriveno je da vodeni kornjaši žive u gotovo svim vrstama vodenih staništa, poput rijeka, jezera, lokvi, podzemnih voda, izvora, jaraka s vodom, „phytotelmata"[1]. Poznato je da vodeni

[1] Tekućina koja se nalazi unutar skliske lisnate strukture koju posjeduje biljka.

kornjaši mogu preživjeti zarobljeni u ledu. Salinitet također ne predstavlja ograničavajući faktor za neke vrste vodenih kornjaša, pa tako se vrsta *Ochthebius corrugatus* može nositi sa salinitetom do 250‰. Međutim, vodeni kornjaši ne nastanjuju oceane, iako brojne vrste žive na njihovim obalama, gdje ih možemo pronaći u hipersalinim vodama supralitorala. Za razliku od ostalih kukaca, vodeni kornjaši preferiraju male, vegetacijom bogate kanale. U većim jezerima, vole močvarne granice, kao što je na primjer pojas trske Srednjoeuropskog Niuzaljskog jezera (jezero na granici Austrije i Mađarske), gdje je biomasa vodenih kornjaša vjerojatno veća nego bilo gdje na Zemlji (Jäch i Balke, 2008).

Najvažnija varijabla koja određuje specifičnost staništa za vodene kornjaše je vodni režim (Turić i sur., 2010; Turić i sur., 2012). Osim navedene karakteristike koja utječe na sastav i brojnost vodenih kornjaša također i kemijski sastav vode, pH vode i sadržaj kisika i hranjivih tvari u vodi utječe na sastav i brojnost (Ribera i Vogler, 2000). Vodeni kornjaši mogu biti podijeljeni u dvije kategorije s obzirom na njihovo stanište, a to su vodeni kornjaši koji nastanjuju lentičke sustave (stajaće vode) i oni koji nastanjuju lotičke sustave (tekuća voda), s nekoliko iznimaka koje su u mogućnosti nastaniti oba staništa (Ribera i sur., 2003).

Razvoj i rasprostranjenost vodenih kornjaša ovisi i o prisutnosti i strukturi vegetacije (Molnár i sur., 2009). Vodeni kornjaši nastanjuju vodenu vegetaciju u određenim razvojnim stadijima životnog ciklusa te su na taj način vezani za vegetaciju. Kornjaši nose zrak u obliku zračnog sloja (plastrona) na trbušnoj strani tijela. Stoga je koncentracija kisika koji je otopljen u vodi bitna, a na nju utječe prisutnost vegetacije (Nilsson, 1996). Gusta vegetacija trske ima negativan utjecaj na sastav vodenih kornjaša budući da smanjuje temperaturu vode i sposobnost kolonizacije iz zraka (Molnár i sur., 2011).

## 1.4. Pregled povijesnih istraživanja vodenih kornjaša iz podreda Polyphaga (Hydrophilidae) u Hrvatskoj

Kornjaši u razredu kukaca predstavljaju jedan od redova koji imaju najveći broj vrsta koje su prilagođene na život u različitim tipovima staništa, no samo je mali postotak od tih vrsta determiniran. Stoga je potrebno što više stručnjaka koji će se posvetiti istraživanju faune kornjaša. U nastavku slijedi pregled istraživanja vodenih kornjaša kroz povijest.

Objavljeni podaci o vodenim kornjašima prvi put se javljaju u 19. stoljeću (Küster, 1842) te se u njima spominju vrste iz porodice Hydrophilidae koje su pronađene u Dalmaciji. Schlosser je u nedostatku uređene sistematike faune kornjaša 1877. godine objavio knjigu u tri sveska „Fauna kornjašah Trojedne Kraljevine“ gdje je opisao karakteristike, anatomiju i sistematiku kornjaša središnje Hrvatske, Slavonije i Dalmacije u kojima je obuhvatio i vodene kornjaše kojima je dao hrvatska imena. S obzirom na današnju sistematiku Schlosser je opisao sljedeće porodice: Dytiscidae (plovci), Haliplidae (plivači), Noteridae (vlagoljubi), Gyrinidae (vrtuljci), Hydrophilidae (povodnjaci), Hydraenidae (šavoljike), Hydrochidae (vodomili), Helophoridae (vorovci, micani, grbavci, rosani i trzini). Na početku 20. stoljeća istraživanjem cjelokupne faune kornjaša bavio se Koča Gjuro. Pronašao je nekoliko vrsta iz porodica Dytiscidae, Gyrinidae i Hydrophilidae na području Papuka (Koča, 1900) te 6 godina kasnije objavljuje „Popis tvrdokrilaca (kornjaša) Vinkovačke okoline“ u kojem se nalaze vrste vodenih kornjaša iz prije navedenih porodica (Koča, 1906). Proučavanju faune vodenih kornjaša na području Hrvatske posvetili su se i strani istraživači od kojih je bitno spomenuti Müllera (1909) koji je opisao porodice Haliplidae, Hygrobiidae, Dytiscidae, Hydrophilidae, Hydraenidae i Gyrinidae na području Dalmacije. Novijim istraživanjima posvetio se Novak (1952, 1970) na području Jadranskog primorja. Gueorguiev je u svojem katalogu 1971. godine opisao 350 vrsta unutar sljedećih porodica: Haliplidae, Hygrobiidae, Dytiscidae, Gyrinidae i Hydrophilidae te se taj popis smatra prvim sistematiziranim popisom vodenih kornjaša u Hrvatskoj.

Novija istraživanja pridonijela su poznavanju faune vodenih kornjaša u Hrvatskoj, posebno porodice Hydrophilidae zahvaljujući radovima sljedećih autora: Merdić i sur., (2005); Turić, (2007); Turić i sur., (2008); Turić i sur., (2010); Turić i sur., (2012). Park prirode Kopački rit do danas je najbolje istražen te je na njegovom području utvrđeno 52 vrste vodenih kornjaša (Merdić i sur., 2005; Turić, 2007; Turić i sur., 2008; Turić i sur., 2010; Turić i sur., 2012).

## 1.5. Ciljevi istraživanja

Hrvatska je područje rasprostranjenosti dvije vrste iz porodice Hydrophilidae, *Hydrochara caraboides* i *Hydrochara flavipes* (Alonso-Zarazaga, 2013), no recentna istraživanja navode samo prisustvo vrste *H. caraboides* na području kontinentalne Hrvatske, stoga su ciljevi ovog istraživanja:

- Potvrditi nastanjuje li vrsta *H. flavipes* prostore kontinentalne Hrvatske
- Utvrditi i dodatno pojasniti filogenetske odnose unutar roda *Hydrochara*
- Molekularnom identifikacijom i analizom COI i 16S rRNA gena odrediti vrste unutar roda *Hydrochara* te utvrditi raznolikost i rasprostranjenost kornjaša roda *Hydrochara* na području kontinentalne Hrvatske
- Pomoću morfometrijskih metoda analizirati eventualne razlike u veličini jedinki i korelirati ih s rezultatima molekularne identifikacije

# 2. MATERIJALI I METODE

## 2.1. Područje istraživanja

Područje istraživanja smješteno je u kontinentalnoj Hrvatskoj uz velike rijeke koje pripadaju Crnomorskom slivu. Dvije najveće tekućice u Hrvatskoj, rijeka Sava i Drava s veličinom sliva > 10.000 $km^2$ pripadaju Crnomorskom slivu. U hidrografiji Hrvatske, rijeka Sava ima središnji položaj i zauzima 11.65% ukupnog područja Dunava te je najveći pritok Dunava. Slivno porječje rijeke Save u Hrvatskoj zauzima površinu od 35.131,5 $km^2$. Lijevi pritoci rijeke Save u Hrvatskoj jesu: Krapina, Lonja, Trebež, Ilova, Pakra, Odra i Orljava. Drava je alpska rijeka čije porječje obuhvaća 40.360 $km^2$ te je to druga po veličini tekućica u Hrvatskoj. Njezin najveći pritok je rijeka Mura (web 9).

**Tablica 1.** Područja istraživanja podijeljena s obzirom na velike rijeke.

| SLIV | CRNOMORSKI SLIV | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| TEKUĆICA | SAVA | DRAVA | ODRA | MURA | DUNAV |
| MJESTO UZORKOVANJA | Jelas polje<br>Lonjsko polje (Čigoč, Poganovo, Osekovo, Pavlinov kljun, Svinjičko selo)<br>Paukovec<br>Sunjsko polje | Čepin<br>Dopsin<br>Josipovac<br>Karašica<br>Otok Virje<br>Viljevo<br>Višnjevac<br>Baranja | Odransko polje (Greda, Jezera, Stara Odra) | Donja-Dubrava<br>Peklenica | Kopački rit<br>Baranja |

## 2.2. Metode uzorkovanja vodenih kornjaša

Vodeni kornjaši uzorkovani su entomološkom mrežom i klopkama s atraktantom na lokacijama navedenim u Tablici 1. Uzorci vodenih kornjaša koji su uhvaćeni, usmrćeni su te pohranjeni u 95% etanolu (EtOH) kako bi se prikupljeni uzorci što bolje očuvali zbog daljnjih analiza genetskog materijala. Nakon uzorkovanja fotografirani su i izmjereni digitalnom foto opremom Olympus DP25 pomoću Olympus lupe SZX16. Prilikom toga korišten je softver Cell ^ D (Olympus, Japan) koji sadrži niz alata za prikupljanje slika, obradu slika i mjerenje uzoraka.

## 2.3. Izolacija DNA

Za izolaciju DNA iz nogu kukaca korišten je komplet za izolaciju DNA (engl. *DNeasy® Blood & Tissue Kit*) proizvođača Qiagen pomoću kojeg je izolirana genomska DNA, koja se nalazi u jezgrama stanica te mitohondrijima. Prije izolacije DNA sa svake jedinke odstranjene su 3 noge te su izvagane na analitičkoj vagi nakon čega je slijedila izolacija DNA.

Reagensi za izolaciju DNA:

- Lizirajući pufer ATL
- Lizirajući pufer AL
- Apsolutni etanol
- Pufer za ispiranje AW1
- Pufer za ispiranje AW2
- Pufer za eluciju AE
- Proteinaza K

Postupak izolacije DNA uključivao je sljedeće korake:

1) izvagano tkivo staviti u sterilnu tubicu od 1,5 mL gdje se mehanički usitnjava tkivo pomoću tekućeg dušika
2) dodati 180 µL pufera za razgradnju tkiva ATL (engl. *Animal Tissue Lysis*)
3) dodati 20 µL proteinaze K i vorteksirati 5-10 s
4) inkubacija tkiva u vodenoj kupelji 24 sata na 56°C uz povremeno miješanje te zatim vorteksirati 15 s
5) dodati 200 µL AL pufera (lizirajući pufer), vorteksirati i dodati 200 µL etanola (96-100%), a zatim vorteksirati pri čemu mora nastati homogena smjesa
6) dobiveni uzorak (≈600µL) prebaciti u kolonu za ispiranje. Zatvoriti kolonu i centrifugirati 1 min na 8000 rpm pri sobnoj temperaturi. Baciti kolekcijsku tubicu i staviti kolonu na novu sterilnu tubicu za prikupljanje eluata.
7) dodati 500 µL pufera za ispiranje AW1. Zatvoriti kolonu i centrifugirati 1 min na 8000 rpm pri sobnoj temperaturi. Baciti kolekcijsku tubicu i staviti kolonu na novu sterilnu tubicu za prikupljanje eluata.
8) dodati 500 µL pufera za ispiranje AW2, centrifugirati 3 min na 14000 rpm pri sobnoj temperaturi

9) baciti kolekcijsku tubicu i staviti kolonu u novu sterilnu tubicu od 1,5 mL
10) dodati 200 µL pufera AE (pufer za eluciju) i inkubirati 1 min na sobnoj temperaturi pa centrifugirati 1 min na 8000 rpm pri sobnoj temperaturi
11) kolonu izvaditi i baciti, a tubice u kojima se nalazi eluat spremiti i čuvati na +4°C

### 2.4. Određivanje koncentracije DNA

Pomoću uređaja Nanophotometer P330 (Implen, Njemačka) spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 260 nm određena je koncentracija DNA u uzorcima. Kao slijepa proba korištena je sterilna deionizirana voda, dok je koncentracija u uzorcima mjerena u 1 µL. Koncentracija DNA izražena je u jedinicama ng/µl.

### 2.5. Umnožavanje DNA lančanom reakcijom polimeraze (PCR)

Nakon izolacije DNA te određivanja količine DNA u uzorcima, geni za citokrom oksidazu podjedinica I (COI) i manju podjedinicu ribosomalne RNA (16S rRNA) umnoženi su u procesu lančane reakcije polimerazom (PCR) koristeći specifične početnice za ta dva gena. PCR (engl. *Polymerase Chain Reaction* – Lančana reakcija polimeraze) je biokemijska reakcija koja omogućava *in vitro* umnožavanje određene DNA sekvence te predstavlja najznačajnije otkriće na polju molekularne biologije i biokemije.

Osnovne komponente PCR reakcije su:

- Termostabilna DNA polimeraza (taq polimeraza),
- Par sintetskih oligonukleotidnih početnica,
- Deoksiribonukleozid-trifosfati (dNTP-ovi),
- Divalentni kationi – najčešće ioni magnezija ($Mg^{2+}$),
- DNA kao kalup za umnažanje.

PCR reakcija sastoji se od sljedećih faza:

1) FAZA DENATURACIJE - denaturacija dvolančane DNA u dva jednolančana lanca na temperaturi 94-96°C tijekom 3-5 min,
2) FAZA HIBRIDIZACIJE POČETNICA (engl. *annealing*) - specifično vezanje početnica na komplementarne fragmente DNA pri temperaturi 50-60°C,
3) FAZA ELONGACIJE POČETNICA - sinteza komplementarnog lanca, odnosno produljivanje DNA lanca na 70-80°C.

### 2.5.1. Početnice

U ovom istraživanju korištene su početnice za gene citokrom oksidaze podjedinice I (COI) i manje podjedinice ribosomalne RNA (16S rRNA). Oligonukleotidne početnice sintetizirane su u korisničkom servisu Macrogen (Južna Koreja). Nukleotidni sljedovi korištenih početnica navedeni su u Tablici 2.

**Tablica 2.** Parovi početnica korišteni pri umnažanju markera 16S rRNA i COI metodom PCR

| IME POČETNICE | NUKLEOTIDNI SLIJED POČETNICE |
|---|---|
| **16SA** | 5' – CGC CTG TTT AAC AAA AAC ATG T – 3' |
| **16SB** | 5' – CCG GTT TGA ACT CAG ATC ATG T – 3' |
| **LCO-1490** | 5' – GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G – 3' |
| **HCO-2198** | 5' – TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA – 3' |

### 2.5.2. Reakcijske smjese PCR-a i uvjeti reakcija za markere COI i 16S rRNA

Umnažanja DNA metodom PCR-a izvedena su u 0,2 mL PCR tubicama u uređaju GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems) u ukupnom volumenu reakcijske smjese od 25 µL. Kako bi postupak pripreme reakcijske smjese bio olakšan, korišten je EmeraldAmp® MAX PCR Master Mix (Takara Biotechnology, Japan), mješavina reagensa za PCR koja sadrži optimizirani pufer, PCR enzim, dNTP smjesu te boju. U reakcijsku smjesu bilo je potrebno dodati određen volumen početnica i uzorka. S obzirom da je koncentracija DNA u uzorcima bila različita, uzorci za marker COI podijeljeni su u 3 skupine te su pripremljene 3 različite reakcijske smjese od 25 µL prikazane u Tablici 3.

**Tablica 3.** Reakcijske smjese za marker COI za tri skupine uzoraka.

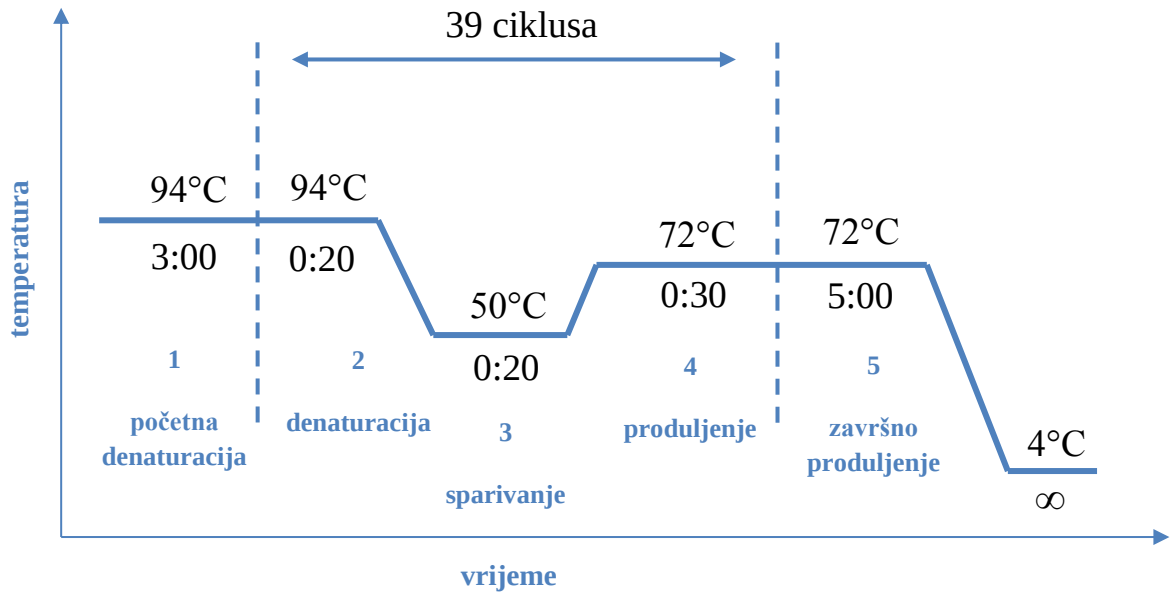
| | 1 skupina | 2 skupina | 3 skupina |
|---|---|---|---|
| mq $H_2O$ | 1,5 µL | 4,5 µL | 6,5 µL |
| Emerald | 12,5 µL | 12,5 µL | 12,5 µL |
| par početnica | 1 µL | 1 µL | 1 µL |
| uzorak | 10 µL | 7 µL | 5 µL |

Za marker 16S rRNA reakcijska smjesa za sve uzorke pripremljena je prema Tablici 4. Sterilizirana voda je korištena za negativnu kontrolu.

**Tablica 4.** Reakcijska smjesa za marker 16S rRNA.

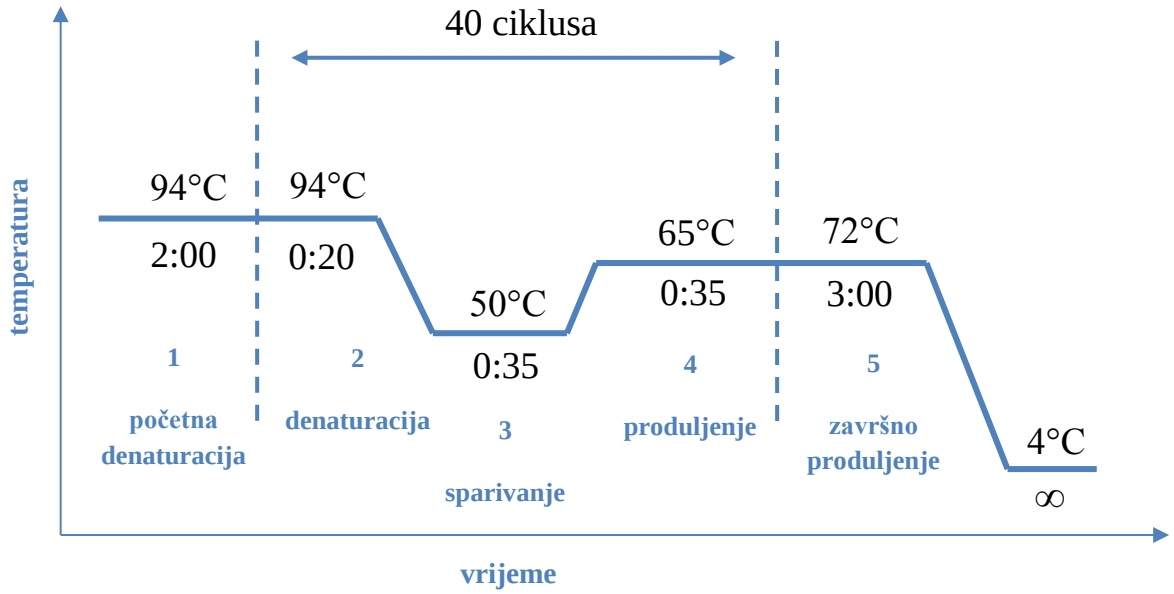
| reakcijska smjesa PCR-a | |
|---|---|
| mq $H_2O$ | 1,5 µL |
| Emerald | 12,5 µL |
| par početnica | 1 µL |
| uzorak | 10 µL |

Reakcijski ciklus za umnažanje odsječka COI (Slika 10.) uključivao je početnu denaturaciju na 94°C u trajanju od 3 min, zatim je slijedilo 39 ciklusa umnažanja koji se sastoje od denaturacije na 94°C 20 s, sparivanja početnica i kalupa DNA na 50°C 20 s i produljivanja lanca na 72°C 30 s. Završno produljivanje lanca odvijalo se na 72°C u trajanju od 5 min.




**Slika 10.** Program ciklusa umnažanja odsječaka COI metodom PCR

Reakcijski ciklus za umnažanje odsječka 16S rRNA (Slika 11.) uključivao je početnu denaturaciju na 94°C u trajanju od 2 min, zatim je slijedilo 40 ciklusa umnažanja koji se sastoje od denaturacije na 94°C 20 s, sparivanja početnica i kalupa DNA na 50°C 35 s i produljivanja lanca na 65°C 35 s. Završno produljivanje lanca odvijalo se na 72°C u trajanju od 3 min.



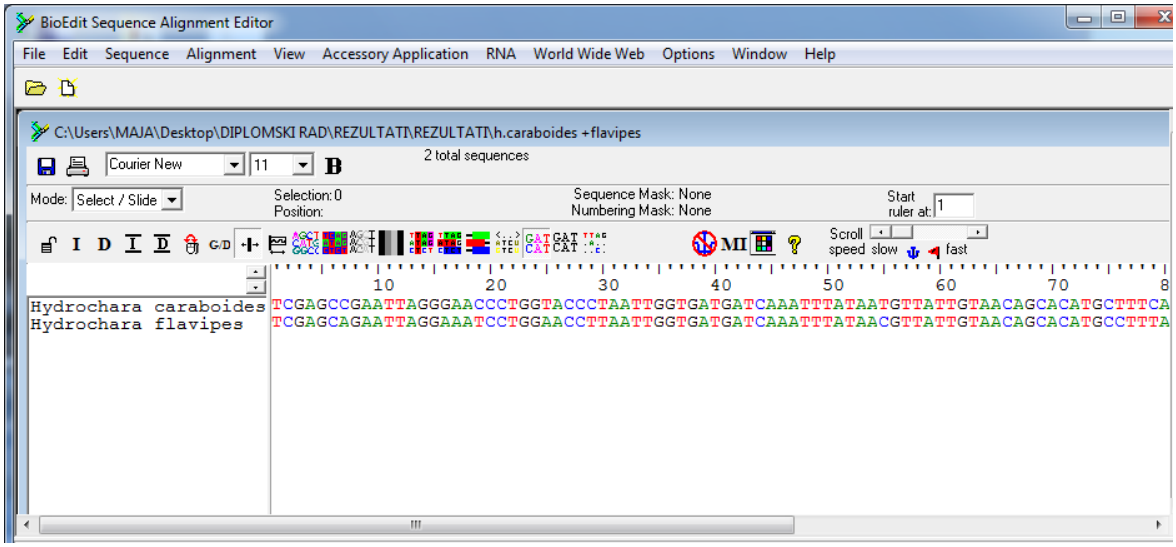

**Slika 11.** Program ciklusa umnažanja odsječaka 16S rRNA metodom PCR

## 2.6. Elektroforetsko razdvajanje odsječaka DNA u agaroznom gelu

Odsječci DNA nakon reakcije PCR razdvojeni su horizontalnom elektroforezom u 2%-tnom agaroznom gelu kako bi se bendovi jasnije vidjeli. Gel je pripremljen otapanjem agaroze u 0,5 x TBE puferu, pH 8 te je obojan SYBR® Safe bojom za gelove (LifeTechnologies, Termo Fisher Scientific, SAD). U jažice gela je nanošeno 10 µL PCR produkta i 5 µL markera koji služi za određivanje duljine odsječaka DNA. Marker koji je korišten je GenRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas, Termo Fisher Scientific, SAD). Elektroforeza se odvijala u 0,5 x TBE puferu pri sobnoj temperaturi pri naponu od 50V, koji se nakon što su produkti izašli iz jažica povećao na 100V. SYBR® Safe boja se veže za dvolančanu DNA, što osigurava fluorescentni signal koji odražava količinu dvolančanog DNA produkta koji nastaje tijekom PCR reakcije.

## 2.7. Određivanje nukleotidnih sljedova PCR produkata i bioinformatička analiza nukleotidnih sljedova

PCR produkti pripremljeni su za određivanje nukleotidnih sljedova na način da se 5 µL uzorka pomiješalo s 5 µL otopine početnice te su poslani u Macrogen Inc. (Južna Koreja) na sekvenciranje koje je bilo dvosmjerno kako bi dobivene sekvence imale veću pouzdanost. U reakcijama sekvenciranja korištene su početnice za 16S rRNA (16 SA i 16SB) i COI (LCO-1490 i HCO-2198). Za pregledavanje i sravnjivanje sekvenci korišten je program BioEdit (Hall, 1999). Uređivanje u BioEditu (Slika 12.) uključivalo je uklanjanje krajeva i loše očitanih podataka. Iz dvije dobivene sekvence napravila se jedna nova koncenzus sekvenca (engl. *consensus sequence)*, koja je predstavljala konačni slijed nukleotida pojedinog uzorka. Nakon toga, eksperimentalno dobivene sekvence sravnjene su pomoću ClustalW višestrukog sravnjivanja. Primijećene razlike u sekvencama provjerene su pregledavanjem kromatograma pojedine sekvence. Ukoliko su signali pogrešno očitani ili se preklapaju signali dviju baza ili je izostala neka od baza, pogreške su ručno ispravljene. Dobivene sekvence uspoređene su s podacima koji su pohranjeni u genskoj bazi GenBank institucije NCBI (engl. *National Center for Biotechnology Information*) pomoću *on-line* alata BLAST (engl. *Basic Local Alignment Search Tool*). Navedeni alat služi za pretraživanje po sličnosti prema algoritmu megablast, koji osigurava pretraživanje vrlo sličnih nukleotidnih sljedova. Genetičke udaljenosti između nukleotidnih sljedova izračunate su upotrebom programa MEGA6 v. 06 (engl. *Molecular Evolutionary Genetic Analysis*) (Tamura i sur. 2013). Programski paket MEGA omogućuje rekonstrukciju filogenetskog stabla metodom udruživanja susjeda (engl. *Neighbor joining).*



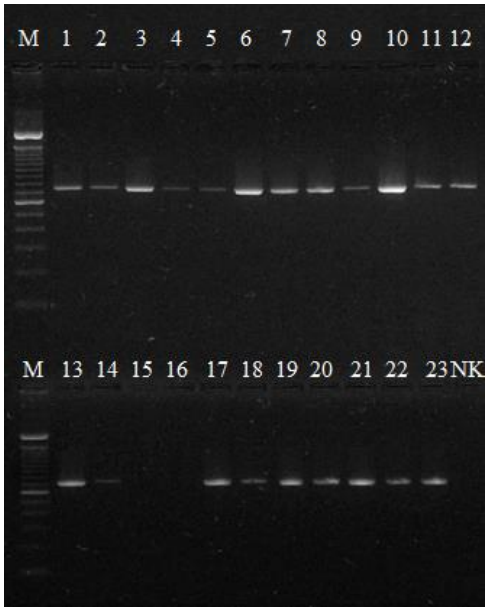

**Slika 12**. Izgled programa BioEdit Sequence Aligment Editor

# 3. REZULTATI

Prikupljenim uzorcima vodenih kornjaša roda *Hydrochara* izmjerene su sljedeće veličine: ukupna dužina tijela u mm i ukupna širina tijela u mm. Ukupna dužina tijela varira od 6,25 do 9,71 mm, dok ukupna širina tijela varira od 3,20 do 4,19 mm (Tablica 5). Kako su razlike u morfologiji jedinki roda *Hydrochara* primijećene samo u veličini jedinki, pristupilo se molekularnom istraživanju upotrebom molekularnih markera 16S rRNA i COI.

Postupak izolacije DNA izvršen je prema protokolu proizvođača uz prilagodbe koje su bile potrebne. Kako bi prinos DNA bio veći, produženo je vrijeme inkubacije tkiva u vodenoj kupelji na 24h. Koncentracija ukupne DNA u izoliranim uzorcima varirala je od 4,50 ng/µl do 79,50 ng/µl.

Nakon izolacije DNA slijedila je optimizacija uvjeta lančane reakcije polimerazom sve do utvrđivanja optimalne količine reagensa i uvjeta reakcije koji su potrebni kako bi se reakcija uspješno odvijala. Poslije procesa elektroforeze na agaroznom gelu napravljena je detekcija produkata lančane reakcije polimerazom pomoću UV-svjetla. Jačina obojenja ukazivala je na koncentraciju produkta. Nakon PCR reakcije i procesa elektroforeze na temelju elektroforetskih gelova uzorci su se slali na određivanje nukleotidnih sekvenci. Primjer agaroznog gela s produktima lančane reakcije polimerazom prikazan je na Slici 13.

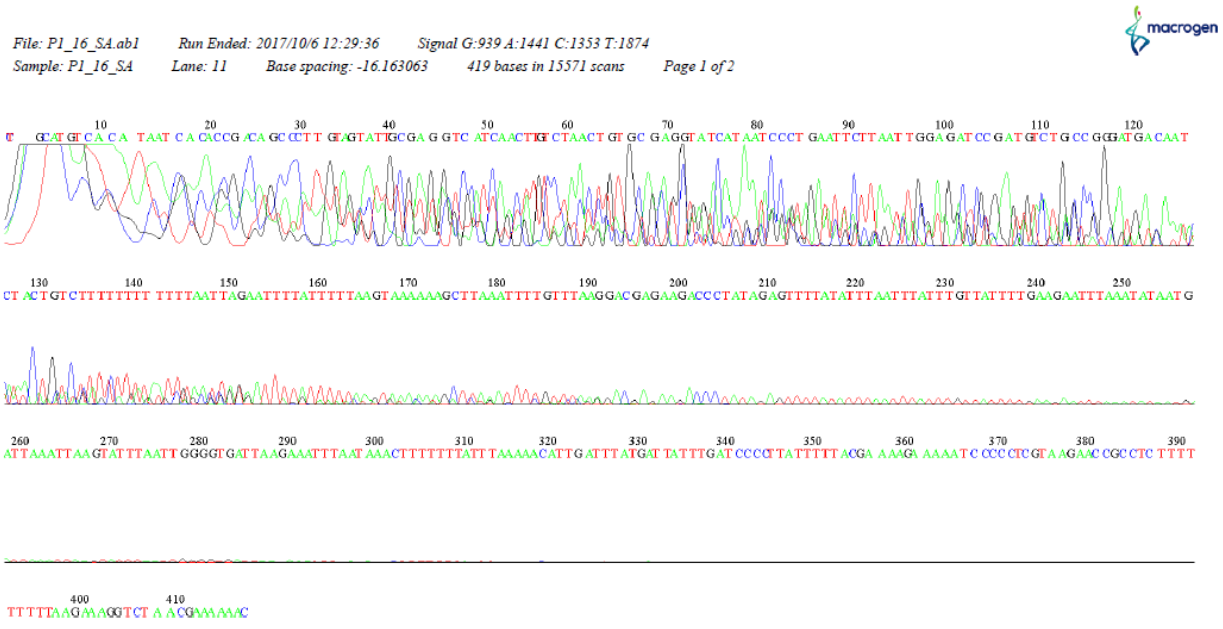



**Slika 13.** Elektroforetsko razdvajanje PCR-om umnoženih odsječaka DNA molekularnog markera COI. Na slici su prikazane **M** -„DNA ladder“, **NK**- negativna kontrola te **1-23 -** brojevi uzoraka

**Tablica 5.** Izmjerena ukupna dužina i širina tijela uzoraka te površina ventralne strane tijela.

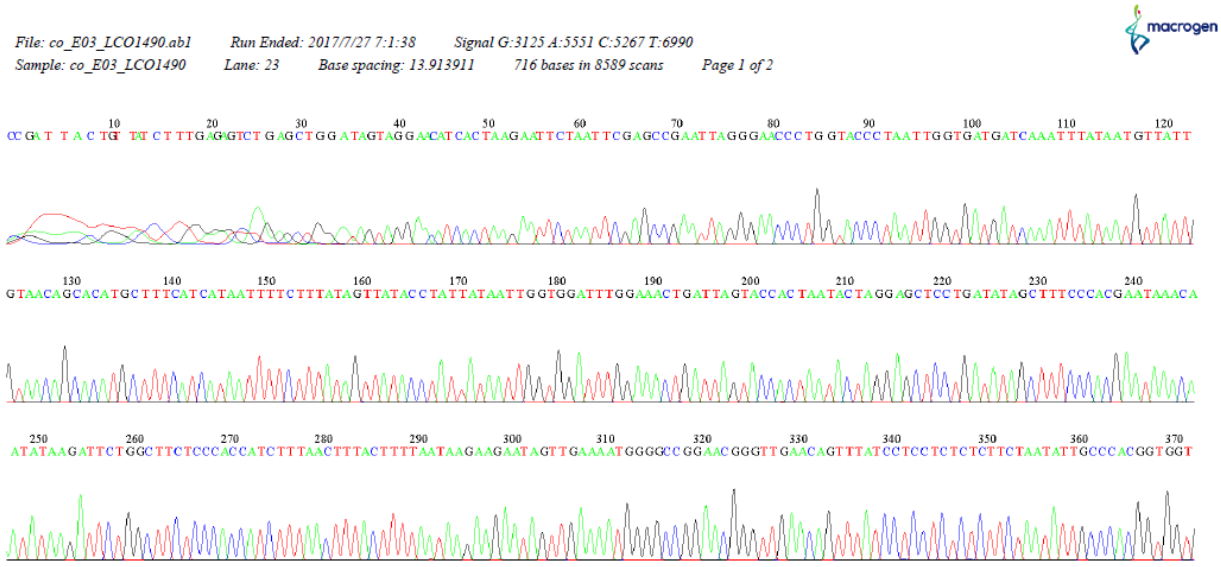
| OZNAKA UZORKA | DULJINA $[mm]$ | ŠIRINA $[mm]$ | POVRŠINA $[mm^2]$ | DATUM | MJESTO UZORKOVANJA |
|---|---|---|---|---|---|
| **GK 2** | 6,49 | 3,08 | 19,99 | 29.5.2011. | ODRANSKO POLJE, GREDA 1 |
| **Č 2 a** | 6,25 | 3,20 | 20,00 | 10.5.2017. | ZIDINE, ČEPIN |
| **L a** | 6,62 | 3,46 | 22,91 | 5.6.2011. | L.POLJE, SVINJIČKO SELO |
| **D** | 6,99 | 3,39 | 23,70 | 10.5.2017. | DOPSIN |
| **Č 1 a** | 7,06 | 3,50 | 24,71 | 10.5.2017. | ZIDINE, ČEPIN |
| **V 2** | 6,98 | 3,64 | 25,41 | 22.5.2013. | VILJEVO |
| **BP 2** | 7,20 | 3,59 | 25,85 | 27.5.2012. | SUNJSKO POLJE, BJELOVAČKO POLJE |
| **K 2** | 7,02 | 3,73 | 26,18 | 2013. | KOPAČKI RIT |
| **Kr** | 7,11 | 3,71 | 26,38 | 29.5.2011. | ODRANSKO POLJE, JEZERA |
| **G 2** | 7,09 | 3,78 | 26,80 | 2.6.2012. | ODRANSKO POLJE, GREDA |
| **GK 1** | 7,51 | 3,58 | 26,89 | 29.5.2011. | ODRANSKO POLJE, GREDA |
| **PA 2** | 7,22 | 3,83 | 27,65 | 6.6.2010. | PAUKOVEC |
| **L 2 b** | 7,36 | 3,78 | 27,82 | 5.6.2010. | L.POLJE, SVINJIČKO SELO |
| **L 1 b** | 7,81 | 3,79 | 29,60 | 5.6.2010. | L.POLJE, SVINJIČKO SELO |
| **Lč 1** | 7,86 | 3,81 | 29,95 | 28.4.2010. | L.POLJE, ČIGOČ |
| **PE 2** | 7,62 | 3,94 | 30,02 | 7.7.2013. | MURA, PEKLENICA |
| **P 2** | 7,96 | 3,79 | 30,17 | 4.7.2010. | L.POLJE, POGANOVO 1 |
| **Lč** | 7,77 | 3,89 | 30,23 | 27.4.2010. | L.POLJE, ČIGOČ, P |
| **G 1** | 7,88 | 3,91 | 30,81 | 2.6.2012. | ODRANSKO POLJE, GREDA |
| **ČP 1** | 7,71 | 4,03 | 31,07 | 5.6.2010. | ČIGOČ P |
| **S 2** | 7,80 | 3,99 | 31,12 | 2010. | SPAČVA |
| **ČN** | 7,74 | 4,04 | 31,27 | 4.6.2011. | L.POLJE, ČIGOČ |
| **K 1** | 8,07 | 3,96 | 31,96 | 2013. | KOPAČKI RIT |
| **O** | 8,18 | 3,92 | 32,07 | 25.5.2014. | ODRANSKO POLJE, JEZERA |
| **SO** | 7,96 | 4,03 | 32,08 | 3.6.2012. | ODRANSKO POLJE, STARA ODRA |
| **VN 2** | 8,07 | 4,01 | 32,36 | 2.6.2017. | JOSIPOVAC, VIKEND NASELJE, KARAŠICA |
| **SD 2** | 8,23 | 4,01 | 33,00 | 2.6.2017. | VIŠNJEVAC, STARA DRAVA |
| **Č 1** | 8,13 | 4,06 | 33,01 | 10.5.2017. | ZIDINE, ČEPIN |
| **OS 2** | 8,36 | 3,95 | 33,02 | 4.7.2010. | L.POLJE, OSEKOVO 1 |
| **PA 1** | 8,11 | 4,14 | 33,58 | 6.6.2010. | PAUKOVEC |
| **SD 1** | 8,29 | 4,16 | 34,49 | 2.6.2017. | VIŠNJEVAC, STARA DRAVA |
| **OV** | 8,50 | 4,06 | 34,51 | 2.6.2013. | OTOK VIRJE 1, GORNJI TOK DRAVE |
| **V 1** | 8,11 | 4,28 | 34,71 | 22.5.2013. | VILJEVO |
| **D.D.** | 8,22 | 4,40 | 36,17 | 9.6.2013. | MURA, DONJA DUBRAVA 2 |
| **KL 1** | 8,39 | 4,32 | 36,24 | 28.4.2010. | L.POLJE, PAVLINOV KLJUN |
| **G** | 8,23 | 4,42 | 36,38 | 3.6.2012. | ODRANSKO POLJE, GREDA 1 |
| **SR** | 8,41 | 4,33 | 36,42 | 9.6.2013. | SENJAR RUK 1, MURA |
| **L** | 8,60 | 4,26 | 36,64 | 5.6.2010. | L.POLJE, SVINJIČKO SELO |
| **BP 1** | 8,72 | 4,40 | 38,37 | 27.5.2012. | SUNJSKO POLJE, BJELOVAČKO POLJE |
| **OS 1** | 9,03 | 4,25 | 38,38 | 4.7.2010. | L.POLJE, OSEKOVO 1 |
| **VN 1** | 8,99 | 4,45 | 40,01 | 2.6.2017. | JOSIPOVAC, VIKEND NASELJE, KARAŠICA |
| **P 1** | 9,16 | 4,38 | 40,12 | 4.7.2010. | L.POLJE, POGANOVO 1 |
| **J 1** | 9,71 | 4,19 | 40,68 | 2011. | JELAS POLJE |
| **S 1** | 9,69 | 4,31 | 41,76 | 2010. | SPAČVA |

Ukupno je na postupak sekvenciranja gena podjedinice I citokrom oksidaze poslano 47 uzoraka, dok je na sekvenciranje gena manje podjedinice ribosomalne RNA (16S rRNA) poslano samo 28 uzoraka jer je za ostale uzorke na gelovima utvrđeno da je PCR reakcija neuspjela te ti uzorci nisu više korišteni u daljnjim analizama. Nakon sekvenciranja pregledani su kromatogrami, te je obrađivanjem i sravnjivanjem sekvenci dobiveno 38 koncenzus sekvenci za grupu gena COI. Automatizirano sekvenciranje DNA je jedno od najčešćih metoda izvedenih u molekularnim laboratorijima. No nažalost, ova metoda nije savršena i teško je pronaći uzrok koji je doveo do neuspjele reakcije sekvenciranja. Loša kvaliteta DNA, gubitak reakcije sekvenciranja tijekom koraka pročišćavanja, korištenje krive početnice, degradacija početnice ili propala sinteza početnice, kontaminirana deionizirana voda samo su neki od uzroka koji mogu dovesti do neuspjele reakcije (web 10). Kromatogram neuspjele reakcije sekvenciranja (Slika 14.) sadrži signale koji se preklapaju pa sve do slabih signala koji se na kraju i gube. U ovom istraživanju dobiveni kromatogrami za 6 uzoraka iz grupe gena COI ukazivali su na neuspjelu reakciju sekvenciranja DNA. Stoga se za njih nije mogla napraviti koncenzus sekvenca te je u istraživanju korištena sekvenca sa samo jednom početnicom. Za grupu gena 16S rRNA dobiveno je 12 koncenzus sekvenci, dok se za 8 uzoraka nije mogla napraviti koncenzus sekvenca.




**Slika 14.** Primjer neuspjele reakcije sekvenciranja DNA

Kod uspjele reakcije sekvenciranja DNA kromatogram sadrži jasne signale s oštrim i ravnomjerno raspoređenim vrhovima kao što je prikazano na Slici 15. Takav kromatogram prikazuje nam točan nukleotidni slijed, te se dobivene sekvence mogu koristiti za daljnje analize.

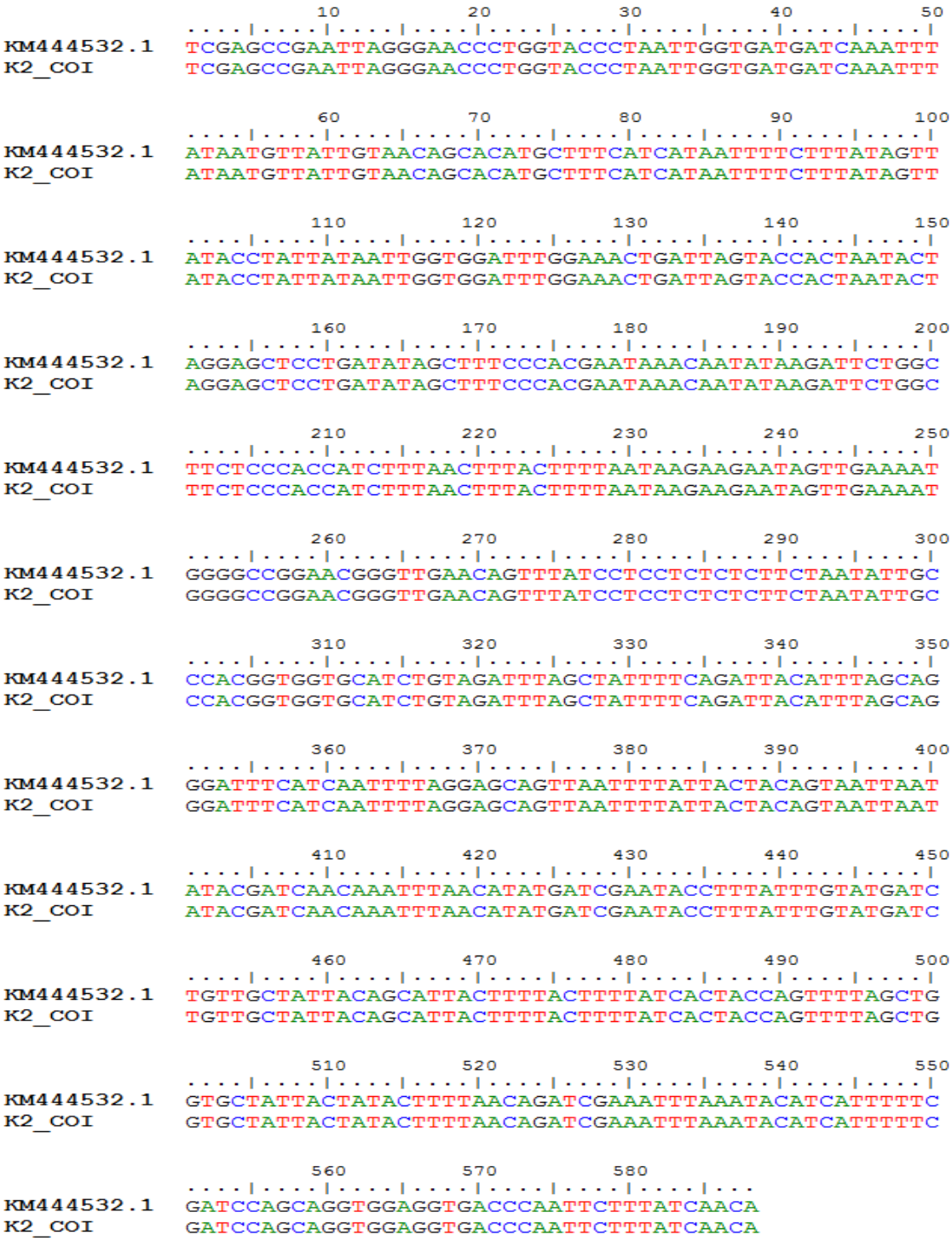



**Slika 15.** Primjer uspjele reakcije sekvenciranja DNA

Dužine sekvenci za gen citokrom oksidazu podjedinica I kreću se od 438 do 588 parova baza. Dok dužina sekvence oglednog primjerka (engl. *voucher specimen*) koje su pohranjene u genskoj bazi GenBank iznosi 658 parova baza. Dužine sekvenci za gen 16S RNA iznose između 114 parova baza za najkraću sekvencu i 409 parova baza za najdužu sekvencu što se može obrazložiti neuspjelom reakcijom sekvenciranja DNA. Ogledni primjerak za gen 16S rRNA ne pronalazimo u banci gena jer još nisu napravljena istraživanja s navedenim molekularnim markerom.

### 3.1. Vrsta *Hydrochara caraboides* Linnaeus, 1758

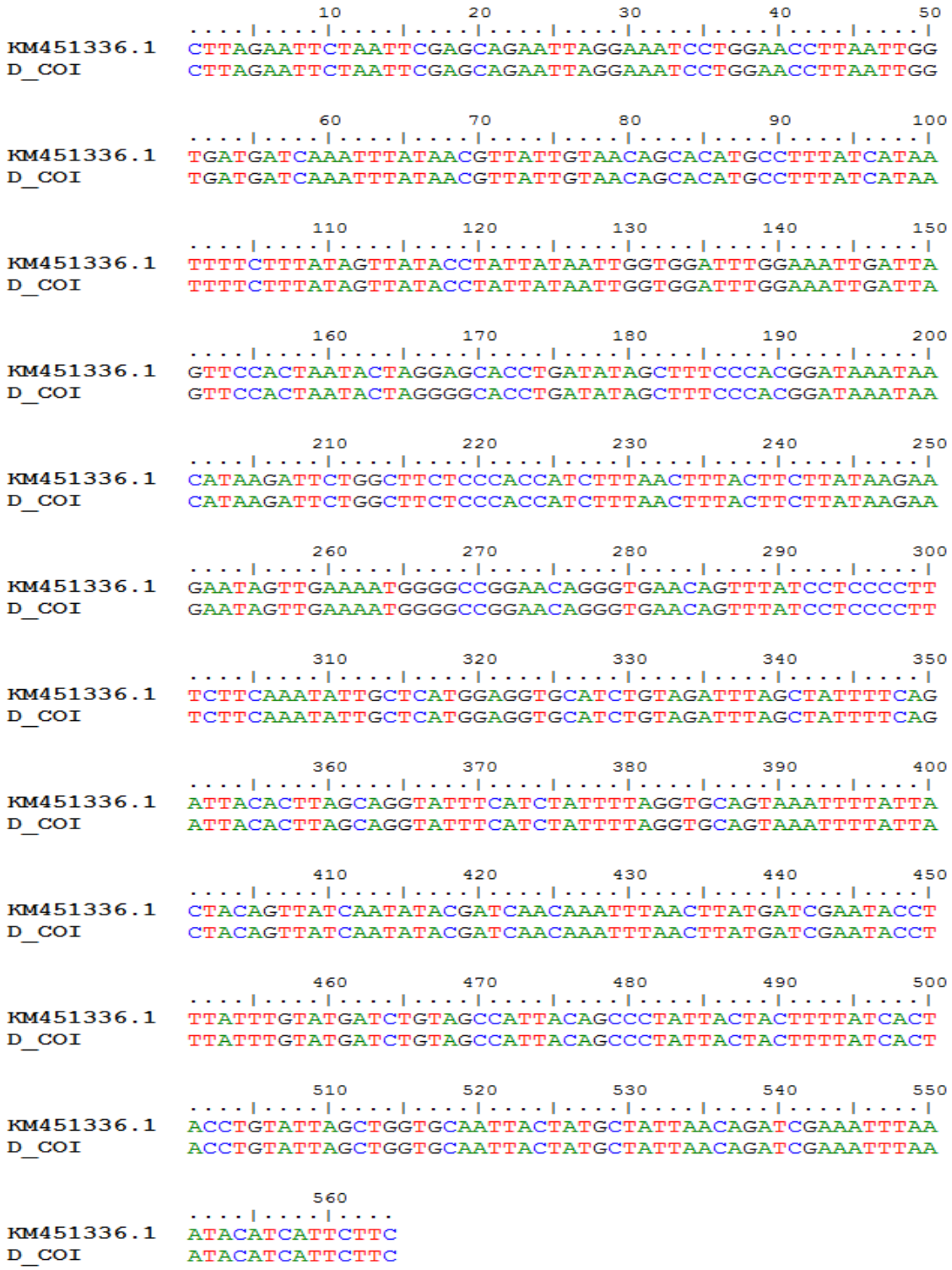
Usporedbom dobivenih sekvenci podjedinice I citokrom oksidaze s istovrsnim sekvencama iz banke gena gotovo sve analizirane sekvence (41/44) u ovom istraživanju pripale su vrsti *H. caraboides.* Kao referentna sekvenca odabrana je sekvenca iz Bavarske državne zbirke u Münchenu, Njemačka skupine autora: Hendrich L, Moriniere J, Haszprunar G, Hebert PD, Hausmann A, Kohler F i Balke M. S navedenom sekvencom KM444532.1 dobivena je 100%-tna i 99%-tna identičnost sa sekvencama u ovom istraživanju (Slika 16.). Na temelju usporedbe dobivenih sekvenci, pripadajući uzorci ovog istraživanja identificirani su kao vrsta *H. caraboides.*




**Slika 16.** Sravnjene sekvence vrste *Hydrochara caraboides* iz Kopačkog rita (uzorak K2) i iz Bavarske državne zbirke u Münchenu (Njemačka) potvrđuju 100%-tnu identičnost. Sekvenca KM444532.1 nalazi se u banci gena kao ogledni primjerak (engl. *voucher specimen*)

### 3.2. Vrsta *Hydrochara flavipes* Steven, 1808

Dobivene sekvence podjedinice I citokrom oksidaze usporedile su se s istovrsnim sekvencama iz banke gena, te su 3 analizirane sekvence pripale vrsti *H. flavipes.* Kao referentna sekvenca odabrana je sekvenca iz Bavarske državne zbirke u Münchenu, Njemačka skupine autora: Hendrich L, Moriniere J, Haszprunar G, Hebert PD, Hausmann A, Kohler F i Balke M. S navedenom sekvencom KM451336.1 dobivena je 99%-tna identičnost sa sekvencama u ovom istraživanju (Slika 17.). Na temelju usporedbe dobivenih sekvenci, pripadajući uzorci ovog istraživanja identificirani su kao vrsta *H. flavipes.*




**Slika 17.** Sravnjene sekvence vrste *Hydrochara flavipes* iz Dopsina (uzorak D) i iz Bavarske državne zbirke u Münchenu (Njemačka) potvrđuju 99%-tnu identičnost. Sekvenca KM451336.1 nalazi se u banci gena kao ogledni primjerak (engl. *voucher specimen*)

### 3.3. Usporedba sekvenci vrsta *Hydrochara caraboides* i *Hydrochara flavipes*

U Tablici 6 nalaze se osnovne karakteristike nukleotidnih sekvenci gena citokrom oksidaze podjedinica I vodenih kornjaša iz roda *Hydrochara*, gdje je udio pojedinih baza i udio baznih parova izražen u postotcima. Udio baznih parova GC pokazao je male varijacije: od 32,98 kod vrste *H. flavipes* do 33,67% kod vrste *H. caraboides*, dok udio baznih parova AT također nije pokazao velike varijacije: 66,33% kod vrste *H. caraboides* i 67,02% kod vrste *H. flavipes*.

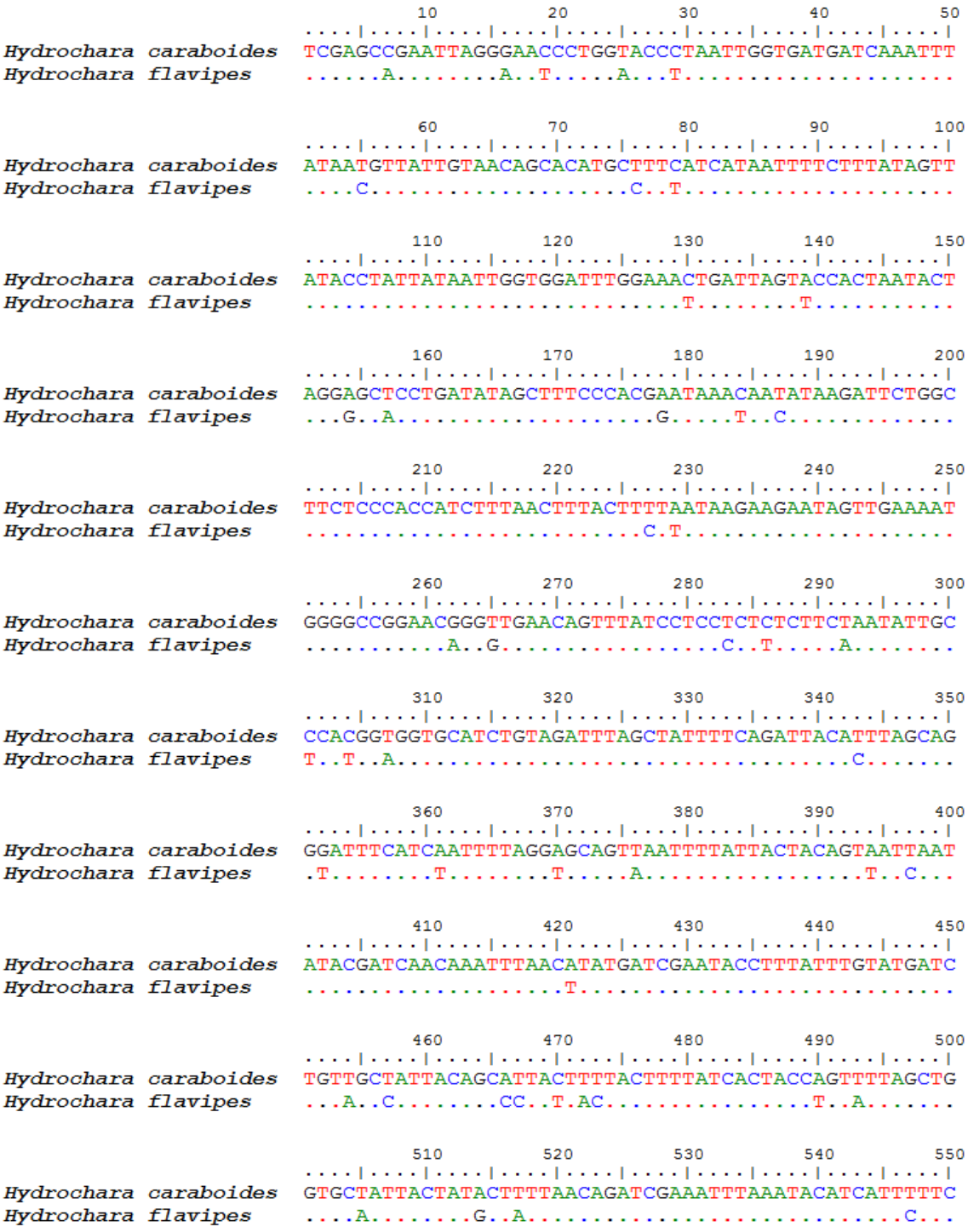
**Tablica 6.** Osnovne karakteristike nukleotidnih sekvenci gena citokrom oksidaze podjedinica I vodenih kornjaša iz roda *Hydrochara*

| | | **udio pojedinih baza (%)** | | | | **udio baznih parova (%)** | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Vrsta** | dužina sekvence | A | C | G | T | G + C | A + T |
| *H. caraboides* | 588 | 30,10 | 18,03 | 15,65 | 36,22 | 33,67 | 66,33 |
| *H. flavipes* | 564 | 30,67 | 17,91 | 15,07 | 36,35 | 32,98 | 67,02 |

Kako bi se sekvence detaljnije proučile napravljena je analiza nukleotidnih udaljenosti sekvenci (engl. *pairwise distance*). To je metoda koja predstavlja genetičku udaljenost između sekvenci i definira se kao udio nepodudaranja baznih parova unutar sravnjenih sekvenci. Analiza je pokazala da se sekvence vrste *H. caraboides i* vrste *H. flavipes* razlikuju u 46 baznih parova (Slika 18.), odnosno pokazuju identičnost sekvenci od 83,72% (Tablica 7).

**Tablica 7.** Prikaz vrijednosti nukleotidne udaljenosti (engl. *pairwise distance*) između COI sekvenci identificiranih vrsta.

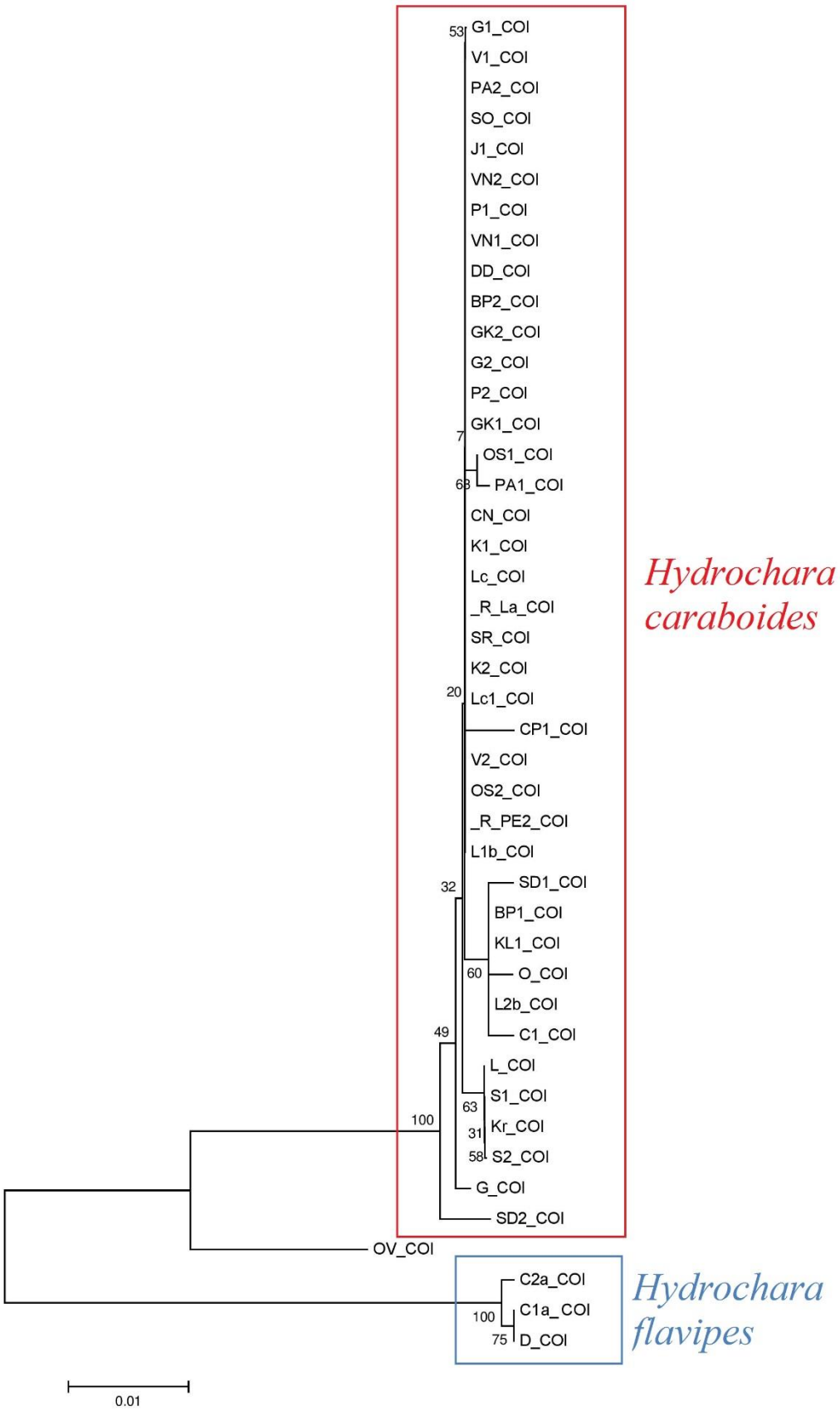
| **Vrsta** | ***H. caraboides*** | ***H. flavipes*** |
|---|---|---|
| *H. caraboides* | 0,0000 | |
| *H. flavipes* | 0,1627 | 0,0000 |




**Slika 18.** Sravnjene sekvence podjedinice I citokrom oksidaze vodenih kornjaša iz roda *Hydrochara* pronađenih u kontinentalnoj Hrvatskoj. Konsenzus vrste *H. caraboides* prikazan je punim nukleotidnim slijedom, dok su u konsenzusu vrste *H. flavipes* podudarnosti s prvom sekvencom označene točkama, a nukleotidne promjene odgovarajućim slovom

### 3.4. Filogenetsko stablo dobiveno „Neighbor joining“ (NJ) metodom za grupu COI gena

Rezultati NJ analize su prikazani na filogenetskom stablu koje se nalazi na Slici 19. Dobiveno filogenetsko stablo nije ukorijenjeno i sadrži skalu za procjenu udaljenosti. Duljina ove skale označava dužinu grane, odnosno koliko su sekvence udaljene. U ovom istraživanju ona iznosi 0,01, što označava da su sekvence udaljene 1%. Na filogenetskom stablu jasno se vidi izdvajanje sekvenci vrsta roda *Hydrochara* za gen COI u dvije linije s istim vrstama te je podržano 100%-tnom statističkom vjerojatnošću. Unutar linije roda *Hydrochara* izdvojile su se dvije linije s jedinkama vrste *H. caraboides* i *H. flavipes*. Na filogenetskom stablu vidljivo je i izdvajanje sekvence uzorka OV sakupljenog na lokaciji Otok Virje, gornji tok Drave. Nakon što je sekvenca uzorka OV uspoređena s podacima u banci gena pomoću *on-line* programa BLAST dobivena je 96%-tna identičnost s oglednim primjerkom (engl. *voucher specimen*) vrste *H. caraboides*, te se ne može sa sigurnošću tvrditi da se radi o toj vrsti. Jedinke unutar linije vrste *H. flavipes* prikupljene su u Čepinu (Zidine) i u Dopsinu. Unutar linije *H. caraboides* vidljivo je razdvajanje nekoliko podlinija koje bi mogle ukazivati na postojanje hibridnih vrsta.




**Slika 19.** Filogenetsko stablo dobiveno „Neighbour joining“ (NJ) metodom za grupu COI gena

# 4. RASPRAVA

Danas se mali broj stručnjaka bavi porodicom Hydrophilidae. Iako su dio najbrojnije skupine kukaca u Hrvatskoj, mali broj entomologa radi istraživanja na njima. U Hrvatskoj postoji veliki potencijal za filogenetska istraživanja unutar porodice Hydrophilidae s obzirom na prednosti koje Hrvatska nudi: povoljan geografski položaj, tri biogeografske regije, specifična geološka konfiguracija i razvedenost obale. Ove prednosti čine Hrvatsku idealnom za takva istraživanja upravo zato jer nije potrebno proći velike udaljenosti kako bi svi tipovi staništa bili pokriveni. Nadalje, postoji i velika vjerojatnost specijacije na otocima, što ju čini dodatno zanimljivom.

U svojim katalozima i revizijama porodice Hydrophilidae autori: Smetana (1980); Hansen (1999) i Löbl i Smetana (2004) pretpostavljaju kako područje Hrvatske nastanjuju dvije vrste iz roda *Hydrochara*, a to su: *H. caraboides* i *H. flavipes.* Podaci o prisutnosti nekih vrsta i rodova (npr. *Hydrochara*) se mogu naći u radovima koji obuhvaćaju faune drugih država u Europi i to na razini pojedinih rodova, a nikako cijele porodice (İncekara i sur., 2009).

Areal rasprostranjenosti vrste *H. caraboides* potvrđen je u istraživanju koje je provedeno od travnja do kraja studenog 2005. godine na području Parka prirode Kopački rit gdje je uzorkovana i determinirana samo navedena vrsta iz roda *Hydrochara* (Turić, 2013). Nakon konstruiranja filogenetskog stabla pomoću dobivenih sekvenci, rezultati se podudaraju s opće prihvaćenom sistematikom baze podataka Fauna Europaea (https://fauna-eu.org/). Prema navedenoj bazi podataka, Hrvatska je područje rasprostranjenosti dvije vrste iz roda *Hydrochara,* vrste *H. caraboides* i vrste *H. flavipes,* što je ovim istraživanjem potvrđeno, dok je prisustvo vrste *H. caraboides* ranije potvrđeno istraživanjem Turić (2013).

Precizna determinacija vodenih kornjaša iz roda *Hydrochara* samo na temelju morfoloških obilježja izuzetno je zahtjevna jer je otežava morfološka sličnost brojnih vrsta, kao i visok unutarvrsni varijabilitet. Stoga se danas poseže za molekularnom metodologijom „DNA barkodiranja" (Hebert i sur., 2003) koja se pokazala kao izuzetno koristan alat za determinaciju morfološki sličnih vrsta. Unatoč istraživanjima, filogenija Hydrophiloidea još uvijek je dvosmislena što navodi Bernhard i sur. (2009). Većina istraživanja temelje se samo na morfološkim obilježjima (Hansen, 1991, 1997; Beutel, 1994; Archangelsky, 1998, 2004, 2008; Beutel i Komarek, 2004; Beutel i Leschen, 2005; Short, 2010) dok su istraživanja temeljena na molekularnim podacima oskudna (Korte i sur., 2004; Bernhard i sur., 2006). Zadnjih nekoliko

desetljeća upotreba mitohondrijske DNA proširila se u filogenetskim, populacijskim i evolucijskim istraživanjima. Razlog tome je što mitohondrijska DNA ima karakteristike koje ju čine idealnim odabirom za takva istraživanja. To su: lakoća izolacije, manjak rekombinacije, veliki broj potencijalnih kopija, nasljeđivanje po majčinskoj liniji, relativna očuvanost samih nukleotidnih sljedova unutar Metazoa i različite brzine mutacija na pojedinim regijama unutar same molekule (Hunt i sur., 2007). Podjedinica I citokrom oksidaze je jedan od najvećih protein kodirajućih gena u životinjskom svijetu i sadržava velik broj filogenetski informativnih mjesta (nukleotida) od bilo kojeg drugog mitohondrijskog gena. Osim toga, COI je biokemijski jako dobro istražena te su poznate njene uloge u metabolizmu, kao i reakcije u kojima sudjeluje (Lunt i sur., 1996) S obzirom na navedene činjenice, COI se danas koristi kao univerzalni marker u DNA barkodiranju (Hebert i sur., 2003). Kako bi rezultati istraživanja bili što točniji i precizniji, filogenetska istraživanja uključuju veći broj molekularnih markera u kojima su potrebne kombinacije nuklearnih i mitohondrijskih gena, koji zbog sporije brzine molekularnog sata daju bolju razlučivost na dubljim granama filogenetskog stabla (Korte i sur., 2004). Bernhard i sur. (2009) su ustanovili da se kombinacijom molekularnih metoda s jasno definiranim morfološkim parametrima postižu točniji rezultati što je i potvrđeno u istraživanju Bruvo-Mađarić i sur. (2013). Autori su tijekom determinacije uočili da sakupljene jedinke čine kompleks vrsta *Hydrochara caraboides-dichroma*, odnosno da imaju obilježja obje vrste (prijelazni oblik). U navedenom istraživanju korišteno je 6 molekularnih markera: geni za 28S rRNA, 18S rRNA, 16S rRNA, 12S rRNA, COI i COII pomoću kojih je ova vrsta potvrđena.

U ovom istraživanju nakon odrađenih morfometrijskih analiza, razlike u veličini jedinki usporedile su se s rezultatima molekularne identifikacije. Izmjerene su ukupna dužina i širina tijela uzoraka te površina ventralne strane tijela te nakon usporedbe može se zaključiti kako uzorci vrste *H. flavipes* pripadaju u skupinu manjih jedinki s obzirom na veličinu tijela. Osim razlika u veličini tijela vrste *H. caraboides* i *H. flavipes* razlikuju se i po dužini sekvenci što možemo vidjeti u Tablici 6. gdje vrsta *H. caraboides* ima dužu sekvencu od vrste *H. flavipes*.

Mogući nedostatak ovog istraživanja jest nedovoljan broj molekularnih biljega te detaljnije analize morfoloških karakteristika korištenih uzoraka što se namjerava provesti u budućim istraživanjima. U ovom istraživanju kao molekularni markeri koristili su se geni za podjedinicu I citokrom oksidaze (COI) i manju podjedinicu ribosomalne RNA (16S rRNA). Zbog problema u radu s molekularnim markerom 16S rRNA već od samog početka dobiveni rezultati nisu korišteni u ovom istraživanju. Za marker 16S rRNA bilo je pripremljeno nekoliko reakcijskih

smjesa te je isprobano nekoliko različitih uvjeta za PCR reakciju te je poslije procesa elektroforeze napravljena detekcija produkata PCR-a, međutim za samo polovicu uzoraka dobiveni su uspješni rezultati koji su poslani na sekvenciranje koje nije rezultiralo kvalitetnim sekvencama koje bi se mogle koristiti u daljnjem istraživanju.

Program MEGA 6 koristi se za genetičke i molekularne analize te ima mogućnost analize FASTA datoteka, poravnavanja sekvenci i rekonstrukcije filogenetskog stabla metodama: Maximum Likelihood (ML), Neighbor Joining (NJ) i Maximum Parsimony (MP). U ovom istraživanju, rekonstrukcija filogenetskog stabla napravljena je metodom udruživanja susjeda (NJ) pomoću matrice udaljenosti koja se određuje računajući udaljenosti između DNA-sekvenci te se na temelju nje određuje izgled filogenetskog stabla. Razlike u sljedovima DNA povećavaju udaljenost, dok sličnosti u sljedovima smanjuju ukupnu udaljenost. Ova metoda određuje topologiju stabla i duljinu grana, odnosno udaljenosti između svakog čvora stabla. Prednost ove metode je što se može obraditi velika količina podataka i računalno je brza (Tamura i sur, 2013). U ovom istraživanju nakon konstruiranja filogenetskog stabla vidljivo je izdvajanje 3 skupina, a to su: skupina uzoraka vrste *H. caraboides*, vrste *H. flavipes* i uzorka OV sakupljenog na lokaciji Otok Virje, gornji tok Drave, što nam ukazuje na mogućnost postojanja prijelaznih oblika unutar roda *Hydrochara* (Slika 19.).

Ovo istraživanje je značajno iz razloga što predstavlja jedno od prvih genetskih ili filogenetskih istraživanja roda *Hydrochara* na području kontinentalne Hrvatske te doprinosi cjelokupnoj slici o filogeniji i prisutnosti roda *Hydrochara* na području Hrvatske. Za daljnja istraživanja roda *Hydrochara* potrebno je uvesti i druge molekularne markere kako bi rezultati bili što pouzdaniji, te osim središnje i istočne Hrvatske, prikupiti uzorke s područja alpinske i mediteranske Hrvatske. Također, veći prinos filogenetskoj rekonstrukciji doprinijele bi kombinirane analize molekularnih podataka i morfoloških karakteristika.

# 5. METODIČKI DIO

U 5. poglavlju diplomskog rada nalazi se priprema za nastavni sat biologije s nastavnom temom „Beskralješnjaci/Razred kukci (Insecta)“. Priprema se može iskoristiti za održavanje blok sata biologije u trajanju od 90 minuta u drugom razredu srednje škole.

## PRIPREMA ZA NASTAVNI SAT BIOLOGIJE

| **Ime i prezime nastavnika** | **Škola** | **Datum** |
|---|---|---|
| Maja Lesjak | | 2018. |

| **Nastavna jedinica /tema** | **Razred** |
|---|---|
| **Osobine i organizacijske razine živih bića - Beskralješnjaci / Razred kukci (Insecta)** | **2.** |
| **Temeljni koncepti** | **Ključni pojmovi** |
| prilagodbe na životne uvjete, bioraznolikost | Hitinska kutikula, uzdušnice, sastavljeno oko, preobrazba, bioraznolikost, biološka važnost |
| **Cilj nastavnog sata (nastavne teme)** | |
| Upoznati unutarnju i vanjsku građu kukaca na primjeru vodenih kornjaša (Coleoptera) te ukazati na veliku bioraznolikost kukaca s osvrtom na biološku važnost i štetnost kukaca. | |

**Ishodi učenja**

**1. Opisati vanjsku građu tijela kukaca i objasniti građu kože kukaca.**
**2. Upoznati unutrašnju građu kukaca.**
**3. Objasniti kako je velik broj razvijenih osjetila kod kukaca povezan s prilagodbom na kopneni i vodeni način života.**
**4. Analizirati način na koji letni mišići sudjeluju u letu.**
**5. Objasniti razliku između potpune i nepotpune preobrazbe.**
**6. Opisati razloge velike biološke raznolikosti kukaca te prepoznati njihov značaj za čovjeka.**

| **Br.** | **Razrada ishoda nastavne jedinice** | **Zadatak/ primjer ključnih pitanja za provjeru ostvarenosti ishoda** | **KR** | **PU** |
|---|---|---|---|---|
| **1.** | | *Kako je građeno tijelo kod porodice Hydrophilidae (vodoljupci)?*<br>*Gdje se nalaze krila na tijelu kukaca?*<br>*Nabroji koji tjelesni privjesci se nalaze na određenoj tagmi na tijelu kukaca?*<br>*Koji sloj na koži kukcima pruža zaštitu od isušivanja?*<br>*Na koji način pigmenti u koži pomažu kukcima u preživljavanju na kopnu?* | I<br>I<br>I<br>II | |
| **2.** | 2.1. Obrazložiti način disanja.<br>2.2. Navesti građu krvožilnog sustava.<br>2.3. Opisati način razmnožavanja.<br>2.4. Opisati dijelove probavnog sustava.<br>2.5. Navesti građu živčanog sustava. | *Što je specifično kod porodice Hydrophilidae u načinu disanja?*<br>*Kako je građen krvožilni sustav kod kukaca?*<br>*Kakva je oplodnja kod kukaca?*<br>*Navedi i opiše dijelove probavnog sustava.*<br>*Kakav živčani sustav imaju kukci?* | I<br>I<br>I<br>I<br>I | |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **3.** | | *Objasni na koji način se kukci nalaze u prednosti tijelom pronalaska hrane i partnera u odnosu na ostale člankonošce.* | II | |
| **4.** | | *Opiši let kukaca.*<br>*Na koji način je sposobnost leta pridonijela uspješnosti kukaca?* | I<br>II | |
| **5.** | | *Što je preobrazba ili metamorfoza?*<br>*Na primjeru opiši razliku između potpune i nepotpune preobrazbe.* | I<br>II | |
| **6.** | 6.1. Objasniti koje prilagodbe kukaca su pridonijele velikoj biološkoj raznolikosti kukaca.<br>6.2. Navesti pozitivne utjecaje kukaca na čovjeka.<br>6.3. Prepoznati negativno djelovanje kukaca na ljude, životinje i biljke. | *Osim sposobnosti letenja koja je odgovorna za veliku rasprostranjenost kukaca, koji još razlozi pridonose tome?*<br>*Navedi nekoliko produkata kukaca koji su izravno korisni čovjeku.*<br>*Što bi se dogodilo na Zemlji kada bi kukci izumrli?*<br>*Na koje sve načine kukci djeluju negativno na ljude, biljke i na život čovjeka na način da nanose gospodarske štete? Navedi primjere.* | II<br>I<br>II<br>I | |

**Kognitivna razina (KR):** I. reprodukcija, II. konceptualno razumijevanje i primjena znanja, III. rješavanje problema
**Procjena uspješnosti učenja (PU):** – odgovara manje od 5 učenika, +/- odgovara otprilike polovina učenika, + odgovara većina učenika

## Tijek nastavnog sata

| **Tip sata** | **Obrada novih sadržaja** | **Trajanje** | **Blok sat (90min)** |
|---|---|---|---|

| STRUKTURNI ELEMENT NASTAVNOG SATA | DOMINANTNA AKTIVNOST | BR. ISHODA | KORISTITI U IZVEDBI | METODA | SOCIOLOŠKI | TRAJANJE (min) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Uvodni dio | N ⇨ Pobuditi motivaciju u učenicima pokazivanjem slika na kojima se nalaze predstavnici člankonožaca (*Prilog 1*) i postaviti pitanje: *Što prepoznajete na slici? Na koja potkoljena se dijele člankonošci (Arthropoda) te kako su člankonošci dobili ime?*<br>U ⇨ Prepoznaju predstavnike člankonožaca na slici te navode kako se koljeno člankonošci sastoji od 6 potkoljena: Trilobitomorpha (trorežnjaci), Cheliceriformes (kliještari), Crustacea (rakovi), Myriapoda (stonoge) i Hexapoda (šesteronošci) te ističu kako je osnovno obilježje člankonožaca egzoskelet. Kako bi se mogli pokretati u tom skeletu, noge su im raščlanjene odakle i dolazi ime člankonošci. | 1 | VM | R | F | 5 |
| | N ⇨ Najaviti temu pitanjem: *Kojem potkoljenu pripada razred kukaca?* Napisati naslov novog sadržaja na ploču. Upozoriti učenike kako je potrebno tijekom cijelog sata prepisivati sadržaj s ploče.<br>U ⇨ Odgovaraju da razred kukaca (Insecta) pripada potkoljenu Hexapoda. Pišu naslov novog sadržaja u bilježnice. | | P | R | F | 2 |
| Središnji dio | N ⇨ Pomoću PowerPoint prezentacije (*Prilog 4*) upoznati učenike s vanjskom građom kukaca čije se tijelo sastoji od glave, prsa i zatka. Svaki od navedenih dijelova sadrži različite tjelesne privjeske. Upozoriti učenike na postojanje iznimaka kod predstavnika kukaca čija se građa tijela razlikuje od one osnovne (porodica Hydrophilidae (vodoljupci)).<br>U ⇨ Uočavaju vanjsku građu kukaca i tjelesne privjeske koji se nalaze na tijelu te shvaćaju kako postoje iznimke u građi tijela kukaca. | 1 | PP<br>p | R | F | 6 |
| | N ⇨ Pomoću PowerPoint prezentacije objasniti građu kože kukaca koju čini hitinska kutikula.<br>U ⇨ Uočavaju od čega je sastavljena koža kukaca. | 1 | PP<br>P | R | F | 5 |
| | N ⇨ Podijeliti radne listiće (*Prilog 2*) pomoću kojih učenici shvaćaju unutarnju građu kukaca. Objasniti zadatak te dati učenicima vrijeme za izvršavanje zadatka.<br>U ⇨ Rješavaju radne listiće u paru te provjeravaju rješenja. | 2 | RL | T<br>R | P | 10 |
| | N ⇨ Prodiskutirati s učenicima o načinu disanja s naglaskom na pojedine vrste koje su razvile i dodatne načine disanja kao što su sloj kisika koji se naziva plastron.<br>U ⇨ Aktivno sudjeluju u razgovoru o naučenom načinu disanja i shvaćaju kako postoje i drugi načini disanja kod kukaca. | 2 | PP<br>P | R | F | 5 |
| | N ⇨ Pomoću PowerPoint prezentacije prikazati učenicima različite usne organe kod kukaca i objasniti kako njihov oblik utječe na način hranjenja te ih upoznati s građom sastavljenih očiju kukaca i ostalim osjetilima koje kukci posjeduju (osjetila za ravnotežu, opip, sluh, toplinu, njuh).<br>U ⇨ Uočavaju različito građene usne organe i građu sastavljenih očiju. | 3 | PP<br>P | R | F | 5 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | N ⇨ Opisati koji mišići sudjeluju u letu kukaca.<br>U ⇨ Uočavaju kako funkcionira let kukaca. | 4 | PP<br>P | R | F | 5 |
| | N ⇨ Postaviti pitanje: *Što je preobrazba? Koje vrste prolaze kroz proces preobrazbe?* Upoznati učenike s preobrazbom kukaca koja može biti potpuna i nepotpuna kada nedostaje stadij kukuljice.<br>U ⇨ Odgovaraju na pitanja i uočavaju da postoji potpuna i nepotpuna preobrazba kukaca. | 5 | PP<br>P | R | F | 5 |
| | N ⇨ Prodiskutirati s učenicima o bioraznolikosti kukaca te usmjeriti pažnju na to kako su kukci najrasprostranjenija i najrazličitija životinjska skupina. Pomoću PowerPoint prezentacije upoznati učenike s nekoliko redova razreda Insecta te zajedno prodiskutirati o zanimljivostima vezanim za određeni red.<br>U ⇨ Aktivno sudjeluju u razgovoru o bioraznolikosti kukaca. | 6 | PP<br>P | R | F | 15 |
| | N ⇨ Postaviti pitanja: *Nabroji i objasni nekoliko razloga zašto su kukci bitni za biosferu? Na koji način kukci štete životinjama, ljudima i biljkama?*<br>U ⇨ Aktivno sudjeluju u razgovoru i navode koje su važnosti i štetnosti kukaca za biosferu. | 6 | PP<br>P | R | F | 7 |
| **Završni dio** | N ⇨ Podijeliti radne listiće (*Prilog 3*) pomoću kojih će učenici samostalno naučiti više o produktima kukaca koji su izravno korisni čovjeku. Objasniti zadatak te dati učenicima vrijeme za izvršavanje zadatka.<br>U ⇨ Rješavaju radne listiće u paru te provjeravaju rješenja. | 6 | RL | T<br>R | P | 10 |
| | N ⇨ Najaviti ponavljanje naučenog gradiva na način da nastavnik prvi postavi pitanje učeniku i kaže jedan mjesec u godini. Učenik koji je rođen u tom mjesecu odgovara na pitanje i postavlja novo pitanje kolegama u razredu.<br>U ⇨ Aktivno sudjeluju u ponavljanju naučenog gradiva. | | I | R | F | 10 |

**Nositelji aktivnosti**: N – nastavnik, U - učenici (dodati i mijenjati uloge ukoliko je potrebno uz svaku aktivnost)
**Koristiti u izvedbi**: RL – radni listić za učenike, UDŽ – udžbenik, RB – radna bilježnica, P – ploča, PM – prirodni materijal, E – pokus/eksperiment, MD – model, AP – aplikacija, PP – projekcija prezentacije, V – video zapis, A – animacija, I – igra, IU – igranje uloga, RS – računalna simulacija, M – mikroskop, L – lupa, F – fleks kamera, T – tablet, MO – mobitel, OP – organizator pažnje, AL - anketni listić TM - tekstualni materijali (dodati prema potrebi) VM- vizualni materijali
**Metode**: PR – praktični radovi, D – demonstracija, C – crtanje, I – usmeno izlaganje, R – razgovor, T – rad na tekstu i pisanje
**Oblici rada**: I – individualno, P – rad u paru, G – grupni rad, F – frontalno

## Materijalna priprema

**Nastavna sredstva (a) i pomagala (b)**:

**a)** nastavna sredstva - radni listići
**b)** nastavna pomagala - ploča, kreda, laptop i LCD projektor

## Plan učeničkog zapisa

**Razred kukci (Insecta)**

- imaju vanjski skelet - egzoskelet
- građa tijela:
  a) GLAVA: 1 par člankovitih ticala, 1 par sastavljenih očiju
  b) PRSA: Sastoje se od 3 kolutića: 1 par ili 2 para krila i 3 para nogu za hodanje
  c) ZADAK
- disanje uzdušnicama ili trahejama
- usni organi za grizenje, sisanje, lizanje, bodenje i upijanje
- istezanjem i stiskanjem tijela unutarnje hvatište krila mijenja položaj (gore-dolje) u odnosu na vanjsko hvatište i krila se pomiču.
- preobrazba kukaca:
  a) POTPUNA: jaja, ličinka, kukuljica, odrasli
  b) NEPOTPUNA: jaja, ličinka, odrasli
- velika bioraznolikost kukaca: najrasprostranjenija i najrazličitija životinjska skupina!

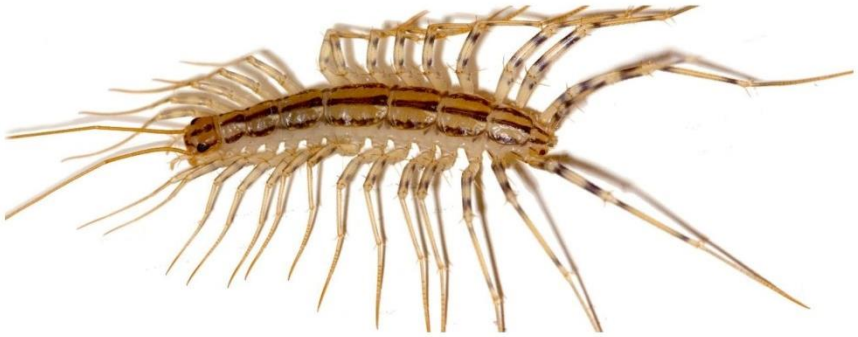
| **Prilagodba za učenike s posebnim potrebama** |
| --- |
| Ovisno o poteškoćama učenicima prilagoditi gradivo i zadatke. |

| **Prilozi** |
| --- |
| PRILOG 1 Predstavnici člankonožaca.<br>PRILOG 2 Unutarnja građa kukaca.<br>PRILOG 3 Ljekovitost i kemijski sastav meda.<br>PRILOG 4 PowerPoint prezentacija „Razred kukci (Insecta)“. |

**Prilog 1**



Pauk (potkoljeno: Cheliceriformes)



Stonoga (potkoljeno: Myriapoda)



Rak (potkoljeno: Crustacea)




Kukac (potkoljeno: Hexapoda)

**Prilog 2**

# RADNI LISTIĆ → UNUTARNJA GRAĐA KUKACA

**ZADATAK: Pročitaj navedeni tekst te pomoću njega i udžbenika na prazne crte upiši odgovarajuće pojmove.**

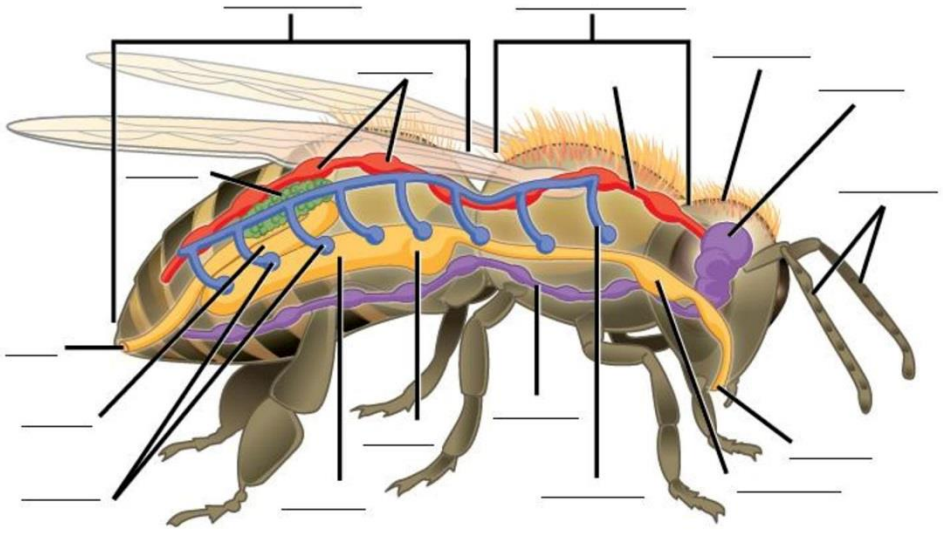
**Živčani sustav** čini niz živčanih čvorova (ganglija), koji su ljestvičasto povezani. Ganglij glave složene je strukture, najrazvijeniji kod zadružnih opnokrilaca, i to jače u radilica nego kod spolnih životinja. Nadždrijelni ganglij je najrazvijeniji u tijelu kukaca i naziva se cerebralni ganglij. Kod različitih se kukaca opaža povezanost između veličine mozga i stupnja aktivnosti.

**Probavilo** je podijeljeno na prednje, srednje i stražnje crijevo. Na prednjem crijevu razlikujemo usta, ždrijelo, jednjak, volju i žvačni predželudac. Pomoću ždrijela sišu hranu, a ako jedu tvrdu hranu, usitnjavaju je u žvačnom predželucu. Hrana se probavlja i upija u srednjem crijevu koje počinje žljezdanim želucem. Stražnje crijevo se otvara crijevnim ili analnim otvorom.

**Disanje**. Kukci dišu uzdušnicama ili trahejama. Uzdušnice se granaju po tijelu u sve sitnije traheole koje dopiru do samih stanica i opskrbljuju ih kisikom. Na mjestu gdje se koža uvrnula nastaje otvor koji zovemo odušak(stigma). Traheje ulaze i u krila.

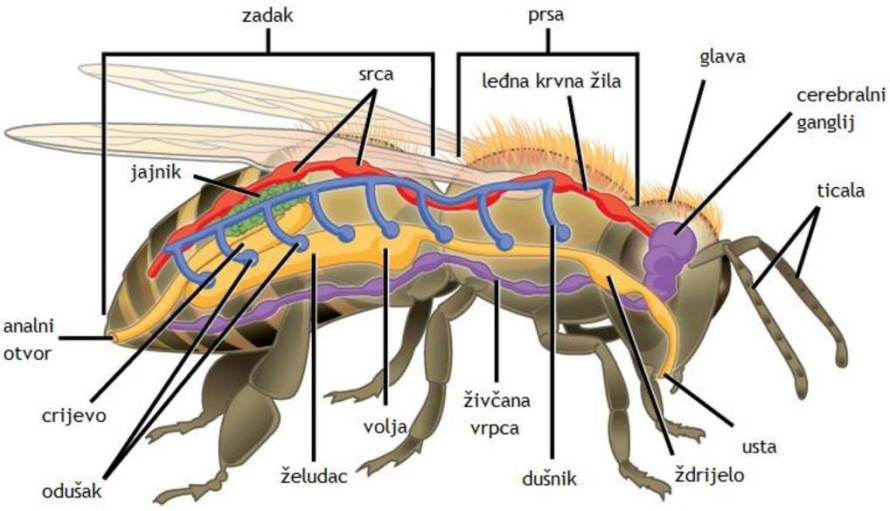
**Krvotok**. Kukci imaju slabije razvijen krvni optok. On se sastoji od jedne žile koja čini srce, a nalazi se na leđnoj strani. Na srcu su kolutićavo raspoređeni otvori-ostije.

**Razmnožavanje**. Kukci su razdvojenog spola. Imaju parne jajnike i sjemenike. Njihove spolne stanice (spermiji i jaja) odvode parne cjevčice koje se na kraju udruže u neparnu cjevčicu. Kukci imaju jedan spolni otvor. Oplodnja je unutrašnja.



# RADNI LISTIĆ → UNUTARNJA GRAĐA KUKACA

**RJEŠENJE:**



**Prilog 3**

# LJEKOVITOST I KEMIJSKI SASTAV MEDA



Med je sladak gust sok što ga pčele medarice stvaraju od nektara koji skupljaju na cvjetovima. Med je jedan od najsavršenijih proizvoda prirode i u njemu se nalaze gotovo svi sastojci koji grade ljudski organizam. Svi dosadašnji pokušaji industrijske proizvodnje meda usprkos silnoj tehnologiji i uloženim ogromnim sredstvima dali su poražavajuće rezultate. Tajnu proizvodnje pravoga prirodnog pčelinjeg meda pčele nose u svom tijelu i organima za probavu koji taj proizvod pretvaraju u lijek gotovo nezamjenjiv u ljudskoj prehrani. Nema na svijetu pčele koja proizvodi loš med, a loš med rezultat je industrijskoga punjenja meda ili lošega, nesavjesnog i needuciranog pčelara.

Zreli med ne sadrži više od 15% vode, a pčele ga u saću pokrivaju voštanim poklopcima i tako čuvaju od upijanja vlage i kvarenja. U medu se nalaze minerali, aminokiseline, visoko vrijedne organske kiseline kao što su mravlja, jabučna, limunska, octena, jantarna, pigmenti, razni derivati klorofila, vosak te elementi kompleksa vitamina B. Neke vrste meda sadrže znatne količine željeza. Nektar koji pčele skupljaju iz cvijeća glavni je izvor ugljikohidrata koje pretvaraju u lako probavljivi šećer. Glavni sastojci meda jesu ugljikohidrati i oni čine 95 - 99% suhe tvari ovisno o vrsti meda. Najzastupljeniji su: glukoza, fruktoza, maltoza, saharoza i drugi.

Zadaci:

a) U tablicu razvrstaj ugljikohidrate koji su navedeni u tekstu.

| | |
|---|---|
| monosaharidi | |
| oligosaharidi - disaharidi | |

b) Koji su korisni učinci meda na organizam?

_____

c) Nabroji neke anorganske tvari koje ulaze u sastav meda.

_____

d) Koje vrste meda poznaješ?

_____

e) Kako bi razlikovao prirodni i med industrijske proizvodnje?

_____

p.s. Ukoliko ne znaš odgovor na pitanje upotrijebi joker: potraži na internetu ili pitaj nastavnika!

| **Prilog 4** |
| --- |
| Prilog 4: PowerPoint prezentacija „Razred kukci (Insecta)“ nalazi se u prilozima diplomskog rada. |

**Literatura**

Bačić T, Erben R, Krajačić M. 2009. Raznolikost živoga svijeta, udžbenik biologije za drugi razred gimnazije. Školska knjiga, Zagreb.
http://www.bvo.zadweb.biz.hr/pages/kukci/kukci.htm
http://www.alfaportal.hr/phocadownload/osnovna_skola/7_razred/biologija/galerija_slika/index.html

**Zabilješke nakon izvedbe**

# 6. ZAKLJUČAK

Istraživanje mitohondrijskog markera za gen citokrom oksidaza podjedinica I u 44 jedinki vodenih kornjaša roda *Hydrochara*, analiziranih u sklopu ovog rada, rezultira sljedećim zaključcima:

1. Molekularni marker za gen citokrom oksidaza podjedinica I (COI) potvrdio se kao vrlo dobar marker za određivanje vrsta unutar roda *Hydrochara.*

2. Na lokalitetima Dopsin i Čepin identificirana je vrsta *Hydrochara flavipes*, što ujedno predstavlja i prvu evidenciju ove vrste na području Hrvatske.

3. Molekularnom identifikacijom određene su dvije vrste iz roda *Hydrochara* na području kontinentalne Hrvatske, a to su: *Hydrochara caraboides* i *Hydrochara flavipes.*

4. Dobiveni rezultati se podudaraju s opće prihvaćenom sistematikom baze podataka Fauna Europaea prema kojoj je Hrvatska područje rasprostranjenosti dvije vrste iz roda *Hydrochara,* vrste *H. caraboides* i vrste *H. flavipes.*

5. Različitost uzorka s otoka Virje (OV) u filogenetskim analizama ukazuje na postojanje prijelaznih oblika unutar roda *Hydrochara*, odnosno na prisutnost nove vrste na području Hrvatske što se mora dodatno potvrditi budućim istraživanjima.

# 7. LITERATURA

Alonso-Zarazaga MA, Hansen M, Ribera I, Hernando C. 2013. Fauna Europaea: Hydrophilidae. Fauna Europaea Version 2017.06. https://fauna-eu.org/ (pristupljeno: 1.12.2017.)

Archangelsky M. 1998. Phylogeny of Hydrophiloidea using characters from adult and preimaginal stages. *Syst Entomol* 23:9-24.

Archangelsky M. 2004. Higher-level phylogeny of Hydrophilinae (Coleoptera: Hydrophilidae) based on larval, pupal, and adult characters. *Syst Entomol* 29:188-214.

Archangelsky M. 2008. Phylogeny of Berosini (Coleoptera: Hydrophilidae, Hydrophilinae) based on larval and adult characters, and evolutionary scenarios related to habitat shift in larvae. *Syst Entomol* 33:635-650.

Barbour MT, Gerritsen J, Snyder BD, Stribling JB. 1999. *Rapid Bioassessment Protocols for Use in Streams and Wadeable Rivers: Periphyton, Benthic Macroinvertebrates and Fish*, Second Edition. EPA 841-B-99-002. U.S. Environmental Protection Agency; Office of Water; Washington, D.C., 337 pp.

Bernhard D, Schmidt C, Korte A, Fritzcs G, Beutel RG. 2006. From terrestrial to aquatic habitats and back again – molecular insights into the evolution and phylogeny of Hydrophiloidea (Coleoptera) using multigene analyses. *Zool Scr* 35:597-606.

Bernhard D, Ribera I, Komarek A, Beutel RG. 2009. Phylogenetic analysis of Hydrophiloidea (Coleoptera: Polyphaga) based on molecular data and morphological characters of adults and immature stages. *Insect Systematics & Evolution* 40:3-41.

Beutel RG. 1994. Phylogenetic analysis of Hydrophiloidea based on characters of the head of adults and larvae. *Koleopter Rundschau* 64:103-131.

Beutel RG, Komarek A. 2004. Comparative study of thoracic structures of adults of Hydrophiloidea and Histeroidea with phylogenetic implications (Coleoptera, Polyphaga). *Org Divers Evol* 4:1-34.

Beutel RG, Leschen RAB. 2005. Phylogenetic analysis of Staphyliniformia (Coleoptera) based on characters of larvae and adults. *Syst Entomol* 30:510-548.

Boukal DS, Boukal M, Fikáček M, Hájek J, Klečka J, Skalický S, Šťastný J, Trávníček D. 2007. Catalogue of water beetles of the Czech Republic (Coleoptera: Sphaeriusidae, Gyrinidae, Haliplidae, Noteridae, Hygrobidae, Dytiscidae, Helophoridae, Georissidae, Hydrochidae, Spercheidae, Hydrophilidae, Hydraenidae, Scirtidae, Elmidae, Dryopidae, Limnichidae, Heterceridae, Psephenidae). *Klapalekiana* 43:1-289.

Bruvo-Mađarić B, Mičetić-Stanković V, Čorak L, Ugarković Đ, Komarek A. 2013. Contributions to molecular systematics of water scavenger beetles (Hydrophilidae, Coleoptera). *Journal of zoological systematics and evolutionary research* 51(2):165-171.

Friday LE. 1988. A Key to the Adults of British Water Beetles. *Field Studies* 7:1-151.

Gueorguiev VB. 1971. *Coleoptera Hydrocanthares et Palpicornia*. Catalogus faunae Jugoslaviae. SAZU, Ljubljana, 45 pp.

Gullan PJ, Cranston P. 2010. *Insects: An Outline of Entomology*. 4th Edition. Wiley-Blackwell Publishing, Oxford, 584 pp.

Habdija I, Habdija PB, Radanović I, Špoljar M, Kepčija MR, Karlo VS, Miliša M, Ostojić A, Perić SM. 2011. *Protista-Protozoa-Metazoa-Invertebrata - strukture i funkcije*. Alfa, Zagreb, 583 pp.

Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.

Hansen M. 1991. The Hydrophiloid Beetles. Phylogeny, classification and a revision of the genera (Coleoptera, Hydrophiloidea). *Biologiske Skrifter* 40:1-368.

Hansen M. 1997. Phylogeny and classification of the staphyliniform beetle families (Coleoptera). *Biol Skrif* 48:1-339.

Hansen M. 1999. *World Catalogue of Insects. Volume 2: Hydrophiloidea (Coleoptera)*. Apollo Books, Copenhagen, 416 pp.

Hebert PDN, Ratnasingham S, DeWaard JR. 2003. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270:596-599.

Hunt T, Bergsten J, Levkanicova Z, Papadopoulou A, Oliver St. J, Wild R, Hammond MP, Ahrens D, Balke M, Caterino SM, Gómez-Zurita J, Ribera I, Barraclough GT, Bocakova M, Bocak L, Vogler PA. 2007. A comprehensive phylogeny of beetles reveals the evolutionary origins of a superradiation. *Science* 318:1913-1916.

İncekara M, Mart A, Polat A, Karaca H. 2009. Turkish hydrophilidae (Coleoptera) III. genus *Hydrochara* Berthold, 1827 with the description of a new species, *Hydrochara major* sp.n. *Turkish Journal of Zoology* 33(3):315-319.

Jäch MA, Balke M. 2008. Global diversity of water beetles (Coleoptera) in freshwater. *Hydrobiologia* 595:419-442.

Koča G. 1900. Prilog fauni gore Papuka i njegove okoline. *Glasnik Hrvatskog naravoslavnog društva* 12:1-3.

Koča G. 1906. Popis tvrdokrilaca (kornjaša) Vinkovačke okoline. *Glasnik Hrvatskog naravoslavnog društva* 17:119-212.

Korte A, Ribera I, Beutel GR, Bernhard D. 2004. Interrelationships of Staphyliniform groups inferred from 18S and 28S rDNA sequences, with special emphasis on Hydrophiloidea (Coleoptera, Staphyliniformia). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 42:281-288.

Küster HC. 1842. *Käfer Dalmatiens*. Isis, 752 pp.

Löbl I, Smetana A. 2004. *Catalogue of Palearctic Coleoptera*. Vol. 2: Hydrophiloidea-Staphylinoidea. Apollo Books, Copenhagen, 942 pp.

Lunt HD, Zhang DX, Szymura JM, Hewit GM. 1996. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect molecular biology* 5(3):153-165.

Matoničkin I. 1981. *Beskralješnjaci. Biologija viših avertebrata*. Školska knjiga, Zagreb, 642 pp.

Merdić E, Keža N, Csabai Z. 2005. Aquatic insects in Kopački rit Nature Park (Heteroptera: Nepomorpha, Gerromorpha and Coleoptera: Hydradephaga, Hydrophiloidea). *Natura Croatica* 14:263-272.

Molnár A, Csabai Z, Tóthmérész B. 2009. Influence of flooding and vegetation patterns on aquatic beetle diversity in a constructed wetland complex. *Wetlands* 29:1214-1223.

Molnár A, Hegedüs R, Kriska G, Horváth G. 2011. Effect of cattail (*Typha* spp.) mowing on water beetle assemblages: changes of environmental factors and the aerial colonization of aquatic habitats. *Journal of Insect Conservation* 15(3):389-399.

Müller J. 1909. Georyssidae, Dryopidae, Heteroceridae et Hydrophilidae Dalmatiae. *Verhandlung der kaiserlich-königlichen zoologisch-botanischen Gessellschaft in Wien* 59:456-485.

Nilsson A. 1996. *Aquatic Insects of North Europe*. Apollo Books, Stenstrup, 274 pp.

Noss RF. 1990. Indicators for monitoring biodiversity: a hierarchical approach. *Conservation Biology* 4:355-364.

Novak P. 1952. *Kornjaši Jadranskog primorja (Coleoptera)*. Jugoslavenska akademija znanosti i umjetnosti, Zagreb, 522 pp.

Novak P. 1970. Rezultati istraživanja kornjaša našeg otočja. *Acta Biologica* VI, Jugoslovenska akademija, Zagreb, 58 pp.

Pearson DL. 1994. Selecting indicator taxa for the quantitative assessment of biodiversity. *Biological Sciences* 345:75-79.

Ribera I, Vogler AP. 2000. Habitat type as a determinant of species range sizes: the example of lotic-lentic differences in aquatic Coleoptera. *Biological Journal of the Linnaean Society* 71:33-52.

Ribera I, Foster GN, Vogler AP. 2003. Does habitat use explain large scale species richness patterns of aquatic beetles in Europe? *Ecography* 26:145-152.

Rockstein M. 1973. *The Physiology of Insecta*. Volume I. Academic Press, SAD, 668 pp.

Rosenberg DM, Resh VH. 1993. *Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates*. Chapman & Hall, London, 461 pp.

Sharma S, Pandey P, Dave V. 2013. Role of aquatic beetles for water quality assessment. *International Journal of Recent Scientific Research* 4(11):1673-1676.

Short AEZ. 2010. Phylogeny, evolution and classification of the giant water scavenger beetles (Coleoptera: Hydrophilidae: Hydrophilini: Hydrophilina). *Syst Biodivers* 8:17-37.

Short AEZ, Fikáček M. 2011. World catalogue of the Hydrophiloidea (Coleoptera): additions and corrections II (2006–2010). *Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae* 51(1):83-122.

Smetana A. 1980. Revision of the genus *Hydrochara* Berth. (Coleoptera: Hydrophilidae). *Memoirs of the Entomological Society of Canada* 111:1-100.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol*. 30:2725-2729.

Turić N. 2007. Vodeni kukci (Heteroptera, Coleoptera) Parka prirode Kopački rit s posebnim osvrtom na rijetke, zaštićene i ugrožene vrste. Poslijediplomski sveučilišni interdisciplinarni znanstveni studij Zaštita prirode i okoliša. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i Institut Ruđer Bošković Zagreb. Magistarski rad.

Turić N, Merdić E, Csabai Z. 2008. First record of *Berosus geminus* (Reiche et Saulcy, 1856) and *Enochrus affinis* (Thunberger, 1774) (Coleoptera: Hydrophilidae) for Croatian fauna. *Entomologia Croatica* 12(2):78-86.

Turić N, Merdić E, Csábai Z, Hackenberger KB, Jeličić Ž. 2010. Aquatic Coleoptera and Heteroptera assemblages and diversity in relation to habitat type and flood dynamic structure. IXth European Congress of Entomology, Budimpešta.

Turić N, Merdić E, Hackenberger Kutuzović B, Jeličić Ž, Vignjević G, Csabai Z. 2012**.** Structure of aquatic assemblages of Coleoptera and Heteroptera in relation to habitat type and flood dynamic structure. *Aquatic Insects* 34(1):189-205.

Turić N. 2013. Prostorno vremenski utjecaj vodnog režima na strukturu i raznolikost vodenih kukaca (Heteroptera i Coleoptera) s posebnim osvrtom na zaštićenu vrstu *Graphoderus*

*bilineatus* (De Geer, 1774). Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij Zaštita prirode i okoliša. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i Institut Ruđer Bošković Zagreb. Doktorski rad.

Verberk WCEP, Van Kleef HH, Dijkman M, Van Hoek P, Spierenburg P, Esselink H. 2005. Seasonal changes on two different spatial scales: response of aquatic invertebrates to water body and microhabitat. *Insect Science* 12(4):263-280.

White DS. 2009. Coleoptera (Beetles) in Aquatic Ecosystems. *Encyclopedia of Inland Waters.* 144-156.

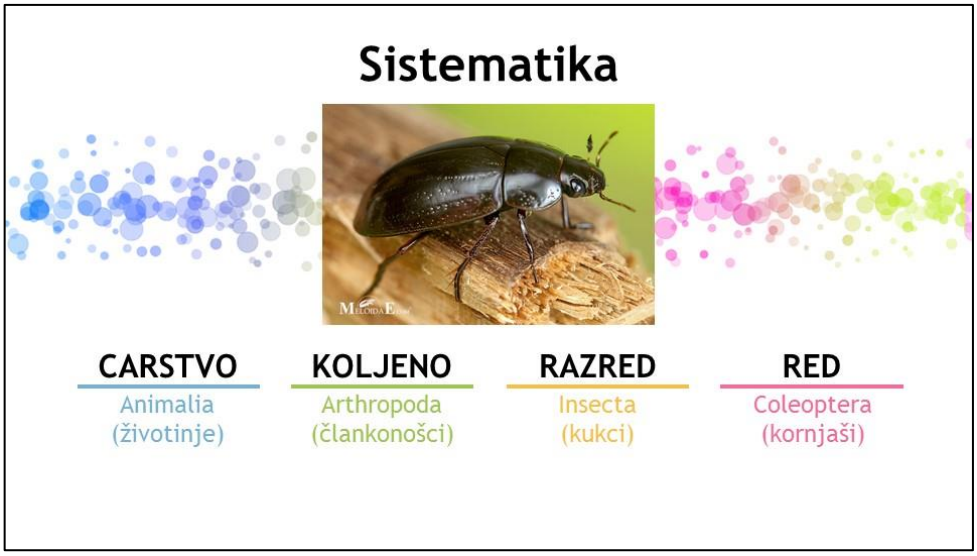
**WEB izvori:**

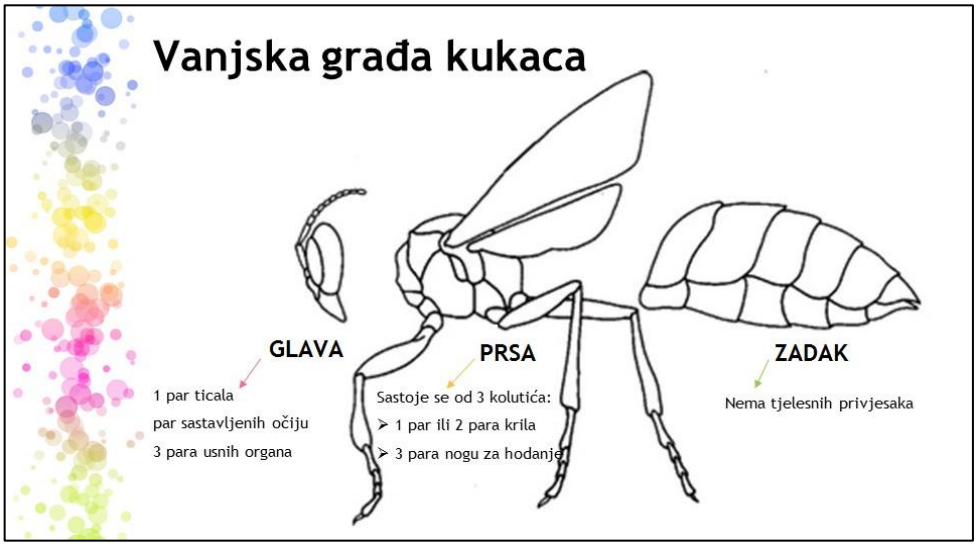
1. http://www.faunaeur.org, pristupljeno: 10.9.2017.
2. http://www.macrogamta.lt/lt/coleoptera-vabalai/hydrophilidae-k%C5%ABdravabaliai, pristupljeno: 27.11.2017.
3. https://www.flickr.com/search/?text=hydrochara, pristupljeno: 18.9.2017
4. http://lifeinfreshwater.net/water-beetles-coleoptera/#more-2190, pristupljeno: 3.10.2017.
5. https://www.flickr.com/photos/janhamrsky/14347900233/in/photostream/, pristupljeno: 3.10.2017.
6. http://lifeinfreshwater.net/ngg_tag/hydrochara-caraboides-larva/, pristupljeno: 13.10.2017.
7. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Reitter1908_table79_Hydrochara_caraboides.png, pristupljeno: 13.10.2017.
8. https://genent.cals.ncsu.edu/bug-bytes/aquatic-respiration/, pristupljeno: 2.11.2017.
9. http://www.voda.hr/sites/default/files/dokumenti/ekolosko_istrazivanje_povrsinskih_kopnenih_voda.pdf, pristupljeno: 4.11.2017.
10. https://www.nucleics.com/DNA_sequencing_support/DNA-sequencing-troubleshooting.html, pristupljeno: 4.12.2017.

# 8. PRILOZI

**Prilog 1. PowerPoint prezentacija Razred kukci (Insecta)“**

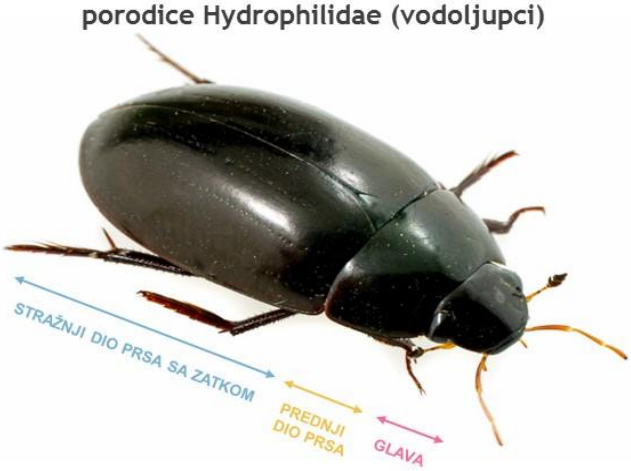


# VANJSKA GRAĐA

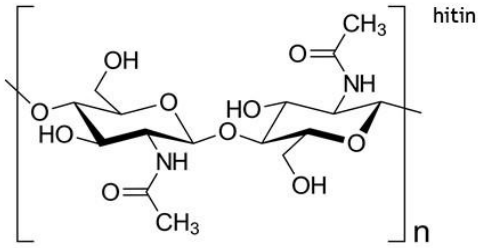
porodice Hydrophilidae (vodoljupci)

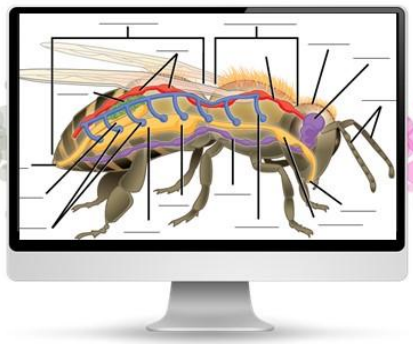



# Koža kukaca

- Tijelo kukaca prekriva HITINSKA KUTIKULA koju izlučuje epiderm
- Ona može biti glatka ili s različitim naborima, dlačicama ili ljuščicama
- Gornji sloj kutikule prekriva VOŠTANI SLOJ koji sprječava gubitak tekućine iz tijela
- U koži se nalaze brojni PIGMENTI pa su kukci različito obojeni
- Hitinsku kutikulu mijenjaju tijekom procesa PRESVLAČENJA





# UNUTARNJA GRAĐA

**Radni listić**

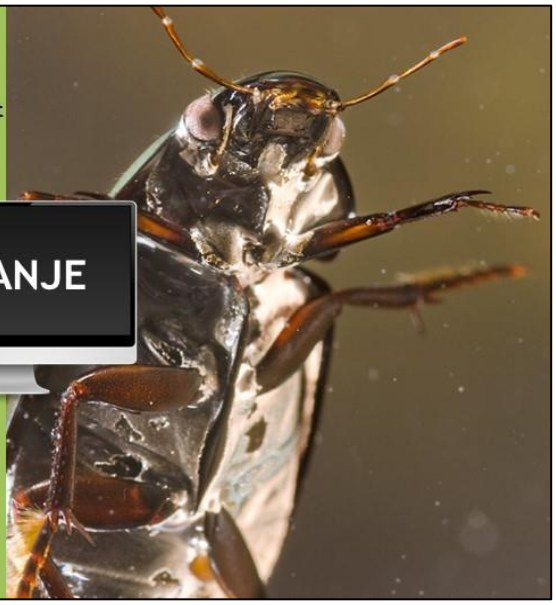
→ Kukci dišu **uzdušnicama** ili **trahejama**

→ Uzdušnice nastaju uvraćanjem kože u unutrašnjost tijela u obliku cjevčica

→ Granaju se po tijelu u **traheole**

→ Traheole dopiru do stanica te ih opskrbljuju s $O_2$

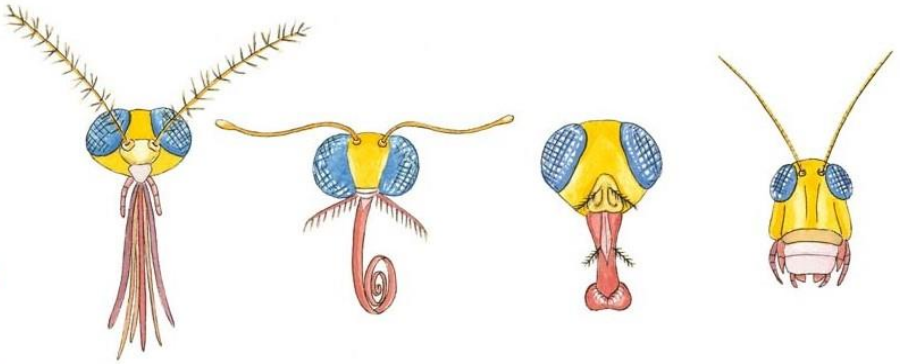
DISANJE



**Tko želi znati više!**

Vrste iz porodica Hydrophilidae nose zrak u obliku zračnog sloja (**plastrona**) koji je smješten na dlačicama na trbušnoj strani tijela te on vrši ulogu škrga. Ove vrste vodenih kornjaša kisik mogu uzimati direktno iz vode i upravo zbog toga mogu ostati ispod površine vode duže vrijeme.

# USNI ORGANI KOD KUKACA



za bodenje i sisanje kod komarca

za lizanje kod leptira

za upijanje kod muhe

za grizenje i žvakanje kod skakavca

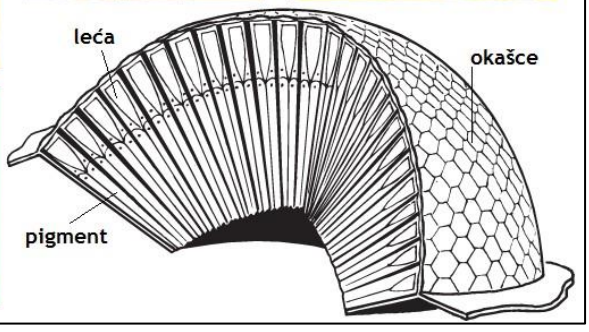
# Sastavljeno oko kukca



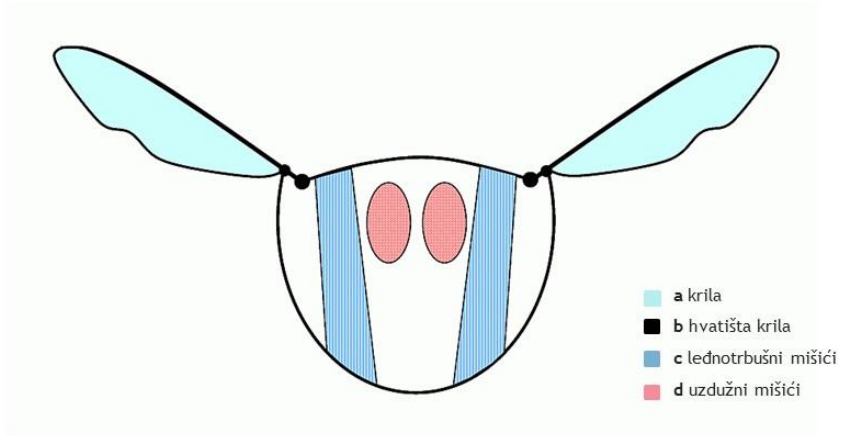








# Letni mišići




Istezanjem i stiskanjem tijela unutarnje hvatište krila mijenja položaj (gore-dolje) u odnosu na vanjsko hvatište i krila se pomiču.

# Preobrazba kukaca






## Preobrazba kukaca

| POTPUNA | NEPOTPUNA |
|---|---|
| 1 jaja | 1 jaja |
| 2 ličinka | 2 ličinka |
| 3 kukuljica | 3 odrasli |
| 4 odrasli | |

# ŽIVOTNI CIKLUS PČELE



JAJE LIČINKA KUKULJICA ODRASLI STADIJ

# Raznolikost kukaca

**Najrasprostranjenija i najrazličitija životinjska skupina!**

**Krilaši (*PTERYGOTA*)**

Vodencvjetovi (*EPHEMEROPTERA*)

Leptiri (*LEPIDOPTERA*)

Dvokrilci (*DIPTERA*)

Tekuti (*MALLOPHAGA*)

Opnokrilci (*HYMENOPTERA*)

Polukrilci (*HEMIPTERA*)

Mrežokrilci (*NEUROPTERA*)

Vretenca (*ODONATA*)

Uši (*ANOPLURA*)

Ravnokrilci (*ORTHOPTERA*)

Buhe (*SIPHONAPTERA*)

Kornjaši (*COLEOPTERA*)



**Beskrilci (*APTERYGOTA*)**

→ Ni u jednom stadiju života nemaju krila



## Kornjaši (COLEOPTERA)



→ Najbrojniji red u životinjskom carstvu
→ Poznato oko 300 000 vrsta
→ Veličina: 1 mm - 12 cm
→ Dva para krila: gornje je tvrdo potkrilje, a ispod se slaže opnasto potkrilje
→ Hrane se biljnom i životinjskom hranom
→ Hruštevi, trčci, jelenci, nosorošci, zlatne mare, krijesnice, vodoljupci, strizibube

## Leptiri (*LEPIDOPTERA*)

→ Dva para mrežastih krila prekrivenih ljušticama
→ Sišu biljne sokove
→ Ličinke su im gusjenice





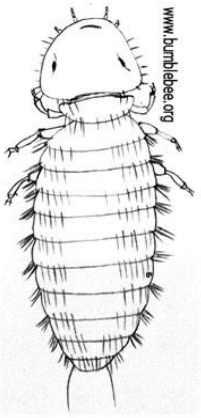
## Vodencvjetovi (*EPHEMEROPTERA*)

→ Dva para opnastih krila
→ Kao ličinke žive u potocima, jezerima 2-3 godine
→ Žive 1-2 dana do razmnožavanja



## Tekuti (*MALLOPHAGA*)

→ Nametnici na koži toplokrvnih životinja
→ Krila su im zakržljala
→ Hrane se rožnatim tvarima, dlakom i perjem












## Polukrilci (*HEMIPTERA*)

→ Stjenice, bilje uši, cvrčci

→ Žive u vodi kao vodene stjenice ili kao nametnici na čovjeku i životinjama ili se hrane biljkama



## Uši (*ANOPLURA*)

→ Usni organi za bušenje kože sisavaca

→ Vanjski nametnici; sišu krv sisavcima

→ Obična uš, uš glave, odjevna uš









## Vretenca (*ODONATA*)

→ Ličinke žive u vodi

→ Tijelo je vretenasto

→ Vrlo su proždrljivi

## Ravnokrilci (*ORTHOPTERA*)

→ Zeleni skakavac, žohar, bogomoljka
→ Usni organi za grizenje
→ Hrane se biljnom hranom





bogomoljka



skakavac

## Dvokrilci (*DIPTERA*)

→ Muhe, komarci, obadi
→ Jedan par opnastih krila
→ Usni organi prilagođeni za lizanje, bodenje i sisanje



obad



tigrasti komarac



muha





## Mrežokrilci (*NEUROPTERA*)

→ Velika mrežasta krila
→ Usni organi za grizenje
→ Ličinke su grabežljive i imaju potpunu preobrazbu



## Buhe (*SIPHONAPTERA*)

→ Usni organi za bušenje kože i sisanj pticama i sisavcima
→ Glava im je srasla s prsima
→ Spljošteno tijelo





pčela



osa

## Opnokrilci (*HYMENOPTERA*)

→ Dva para opnastih krila, neke vrste imaju žalac
→ Usni organi za grizenje i lizanje
→ ose, pčele, mravi, bumbari



mrav

# Biološka važnost kukaca

1. Kukci imaju veliku ulogu kao oprašivači biljaka
2. Utječu na rasprostranjenje biljaka
3. Kukci imaju važnu ulogu u razlaganju mrtvih organizama
4. Kukci su važna karika u održavanju kopnenog i vodenog ekosustava
5. Hrana su drugim životinjskim skupinama
6. Produkti kukaca izravno su korisni čovjeku
7. Upotreba kukaca u medicini
8. Idealni organizmi za fundamentalna biološka istraživanja



# Štetnost kukaca

- Uzročnici bolesti







- Štetnici u poljoprivredi

