

# Barkodiranje vrsta roda *Hydrochara* (Coleoptera, Hydrophilidae)

---

**Radić, Andrea**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2019**

*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:181:338351>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-19**



**ODJEL ZA  
BIOLOGIJU**  
Sveučilište Josipa Jurja  
Strossmayera u Osijeku

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek](#)



Sveučilište Josipa Juraja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Andrea Radić

**Barkodiranje vrsta roda *Hydrochara* (Coleoptera, Hydrophilidae)**

Završni rad

Osijek, 2019.

## **TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

**Sveučilište Josipa Juraja Strossmayera u Osijeku**

**Završni rad**

**Odjel za biologiju**

**Preddiplomski sveučilišni studij Biologije**

**Znanstveno područje: Prirodne znanosti**

**Znanstveno polje: Biologija**

### **BARKODIRANJE VRSTA RODA HYDROCHARA (COLEOPTERA, HYDROPHILIDAE)**

**Andrea Radić**

**Rad je izrađen na:** Laboratorij za entomologiju, Odjel za biologiju, Osijek

**Mentor :** Dr.sc. Nataša Turić, docent

**Komentor:** Dr.sc. Goran Vignjević, docent

#### **Sažetak završnog rada:**

Vodeni kornjaši pripadaju velikom koljenu člankonožaca. Red kornjaša (Coleoptera) broji oko 400 000 opisanih vrsta. Porodica Hydrophilidae ima jako veliki broj prestavnika i žive na različitim tipovima staništa. U rodu Hydrochara nalazi se 23 vrste, od kojih se na području Hrvatske nalazi 2 vrste, *H. flavipes* i *H. caraboides*. Budući da imaju veliku morfološku sličnost, na temelju barkodiranja i molekularnog markera za gen citokrom oksidazu podjedinicu I (COI), odredile su se vrste unutar roda Hydrochara. Nakon izvršenog istraživanja dobiveni su rezultati koji se poklapaju s podacima u bazi podataka Fauna Europaea. Potvrđene su dvije vrste iz roda Hydrochara, *H. flavipes* i *H. caraboides*. Na otoku Virju, odnosno u gornjem toku Drave uzorkovane su jedinke za koje se procjenjuje da pripadaju novoj vrsti, koja se prije nije evidentirala na području Hrvatske.

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** vodeni kornjaši, Hydrochara, barkodiranje, geni za citokrom oksidazu podjedinicu I (COI)

**Rad je pohranjen:** na mrežnim stranicama Odjela za biologiju, te u Nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu.

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**

**Bachelor thesis**

**Department of Biology**

**Undergraduate university study programme in Biology**

**Scientific Areal:** Natural sciences

**Scientific Field:** Biology

## **BARCODING OF THE HYDROCHARA SPECIES (COLEOPTERA, HYDROPHILIDAE)**

**Andrea Radić**

**Thesis performed at:** Laboratory of entomology, Department of Biology, Osijek

**Supervisor:** Nataša Turić, PhD, Assistant Professor

**Cosupervisor:** Goran Vignjević, PhD, Assistant Professor

### **Short abstract:**

Water beetles belong to the arthropods. Coleoptera counts around 400 000 of the described type. Hydrophilidae has a very large number of representatives and they live on different types of habitats. In the Hydrochara kind there are 23 species, two of them are located on the Croatian territory, *H. flavipes* and *H. caraboides*. Since they have a large morphological resemblance, based on barcoding and molecular markers for gene cytochrome oxidase subunit I (COI), species were determined within the Hydrochara kind. After the research has been carried out, results have been obtained which match with data in the database of the Fauna Europaea. Two species were confirmed in the Hydrochara kind, *H. flavipes* and *H. caraboides*. On the island Virje, or in the top flow of the river Drava, individuals were sampled, which are evaluated to belong to a new species, which has not been recorded before on the Croatian territory.

**Original in:** Croatian

**Keywords:** water beetles, Hydrochara, barcoding, genes for cytochrome oxidase subunit I (COI)

**Thesis deposited:** on the Department of Biology website and the Croatian Digital Theses Repository of the National and University Library in Zagreb.

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Barkodiranje.....	1
1.2. Sistematika vodenih kornjaša.....	1
1.3. Značajke vodenih kornjaša iz podreda Polyphaga (Hydrophilidae).....	2
1.3.1. Vanjska građa.....	2
1.3.2. Disanje.....	6
1.3.3. Prehrana.....	7
1.3.4. Životni ciklus.....	7
1.4. Ekologija i stanište vodenih kornjaša iz podreda Polyphaga (Hydrophilidae).....	8
1.5. Cilj znanstvenog rada.....	8
2. MATERIJALI I METODE.....	9
2.1. Područje istraživanja.....	9
2.2. Metode uzorkovanja vodenih kornjaša.....	9
2.3. Izolacija DNA.....	10
2.4. Određivanje koncentracije DNA.....	11
2.5. Umnažanje DNA lančanom reakcijom polimeraze (PCR).....	12
2.5.1. Početnice .....	12
2.5.2. Reakcijske smjese PCR-a i uvjeti reakcija za marker COI.....	12
2.6. Elektroforetsko razdvajanje odsječaka DNA u agaroznom gelu.....	14
2.7. Određivanje nukleotidnih sljedova PCR produkata i bioinformatička analiza nukleotidnih sljedova.....	14
3. REZULTATI.....	15
3.1. Vrsta <i>Hydrochara caraboides</i> Linnaeus, 1758.....	16
3.2. Vrsta <i>Hydrochara flavipes</i> Steven, 1808.....	16
3.3. Usporedba sekvenci vrsta <i>Hydrochara caraboides</i> i <i>Hydrochara flavipes</i> .....	16
4. RASPRAVA.....	18
5. ZAKLJUČAK.....	20
6. LITERATURA.....	21

## 1. UVOD

### 1.1. Barkodiranje

Barkodni sustav podataka (BOLD) predstavlja računalni program koji pomaže pri pohrani, analizi i objavljivanju zapisa barkoda DNA (Ratnasingham i Hebert, 2007). Pristupa mu se preko Internet stranice [www.barcodinglife.com](http://www.barcodinglife.com). Navedena metoda predložena je 2003. godine, te se koristi za identifikaciju vrsta i otkrivanje novih, još neopisanih vrsta. Barkodiranje se temelji na određivanju sljedova nukleotida standardiziranog fragmenta mitohondrijskog gena za podjedinicu I citokrom oksidaze (COI) duljine od oko 650 pb (Izvor: Web 1).

Svaki istraživač koji ima interes prema DNA barkodiranju može slobodno koristiti BOLD (Ratnasingham i Hebert, 2007).

Korištenje molekularnih metoda odnosno podataka o DNA sekvenci imalo je veliki utjecaj na taksonomiju vodenih kukaca. Veliki broj očuvanih kornjaša nalazi se u zbirkama širom svijeta koje se koriste u genskim analizama. Analizom podataka o DNA sekvenci mitohondrijskog gena COI određuje se filogenija i povijest kornjaša (Gholamzadeh i sur., 2016).

### 1.2. Sistematika vodenih kornjaša

Red Coleoptera spada u koljeno člankonožci te predstavlja najveći red unutar razreda kukaca s oko 400 000 opisanih vrsta (Jäch i Balke, 2008). Sačinjavaju ga četiri podreda: Polyphaga, Myxophaga, Adephaga i Archostemata (White, 2009). Najbrojniji podred u rodu Coleoptera je Polyphaga sa oko 370 000 opisanih vrsta (Jäch i Balke, 2008). Veliki broj vrsta kornjaša prilagođen je životu u kopnenim ekosustavima, dok se mali broj prilagodio životu u vodi. Kornjaše koji su prilagođeni životu u vodenom staništu ili barem jedan dio svoga životnoga ciklusa provode u vodi nazivamo vodenim kornjašima. Samo podredovi Polyphaga i Adephaga imaju vodene predstavnike na području Europe (Nillson, 1996). Nadporodica Hydrophiloidea sadrži oko 475 rodova i 6600 opisanih vrsta koje su svrstane u 3 kopnene porodice: Sphaeritidae, Synteliidae, Histeridae i jednu vodenu porodicu Hydrophilidae (Bernhard i sur., 2009). Porodicu Hydrophilidae sačinjava 174 roda i 2652 opisane vrste (Jäch

i Balke, 2008) i dijeli se u četiri potporodice: Horelophinae, Horelophopsinae, Hydrophilinae i Sphaeridiinae (Boukal i sur., 2007).

Rod *Hydrochara* zastupljen je s 23 opisane vrste, a samo 4 vrste su zabilježene na području Europe, a to su: *Hydrochara flavipes* (Steven, 1808), *Hydrochara caraboides* (Linnaeus, 1758), *Hydrochara semenovi* (Zaitzev, 1908) i *Hydrochara dichroma* (Fairmaire, 1892). Najveće područje rasprostranjenja ima vrsta *Hydrochara caraboides*, a nakon nje vrsta *Hydrochara flavipes*. Navedene dvije vrste nalaze se i na području Hrvatske (Turić, 2013).

#### **SISTEMATIKA RODA**

**CARSTVO: Animalia**

**KOLJENO: Arthropoda**

**POTKOLJENO: Hexapoda**

**RAZRED: Insecta**

**RED: Coleoptera**

**PODRED: Polyphaga**

**NADPORODICA: Hydrophiloidea**

**PORODICA: Hydrophilidae**

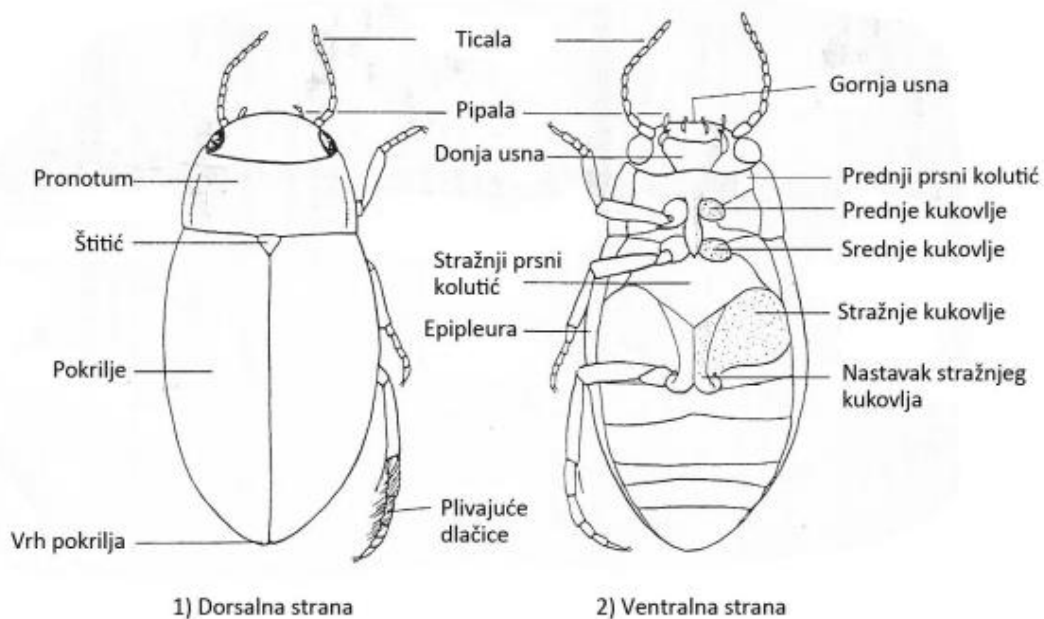
**POTPORODICA: Hydrophilinae**

**ROD: Hydrochara**

### **1.3. Značajke vodenih kornjaša iz podreda Polyphaga (Hydrophilidae)**

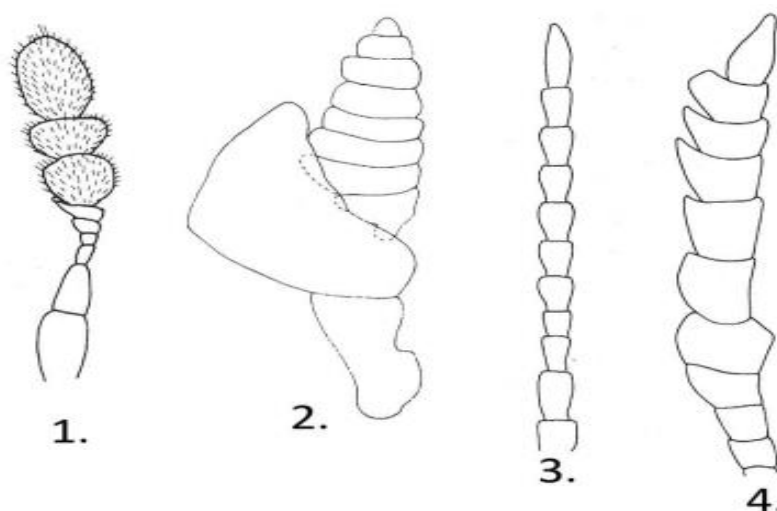
#### **1.3.1. Vanjska građa**

Kornjaši mogu biti sitni ili krupni kukci s veličinom tijela od 0,25mm do 17 cm. Na tijelu kornjaša se razlučuju tri tagme: glava (*caput*), prsa (*thorax*) i zadak (*abdomen*). Glavu čini akron i 5 kolutića, prsa tvore 3 kolutića (*prothorax*, *mesothorax* i *metatorax*), dok 11 kolutića zajedno s telzonom čini zadak (Matoničkin, 1981). Skoro cijelo tijelo kornjaša pokrivaju tvrda pokrivanja ili elitre. Prednja krila su hitinizirana i pokrivaju stražnja krila. Elitre imaju zaštitnu funkciju, a mekana stražnja krila su opnasta i imaju letnu funkciju. Većina vrsta ima čvrsto hitinizirano tijelo u cijelosti. Raznolikost u građi i veličini tijela omogućila im je prilagodbe na najrazličitije uvijete okoline (Habdija i sur., 2011).



**Slika 1.** Vanjska građa vodenih kornjaša (Preuzeto i prilagođeno iz Friday, 1988)

Glava kornjaša je cjelovita hitinska čahura na kojoj se nalaze složene oči, 1 par ticala koja su sastavljena od 11 manjih članaka i gornje usne (labrum). Ticala su sastavljena od tri dijela, stručka (scapes), spojnice (pedicel) i biča (flagellum) (Slika 2.). Njihova su usta okrenuta prema naprijed, a čelo prema gore. Oko usta se nalaze člankoviti usni organi koji se sastoje od gornje čeljusti (mandibulae), donje čeljusti (maxillae) i donje usne (labium), te su preobraženi u organe za grizenje koji su ujedno i najprimitivniji (Habdija i sur., 2011).

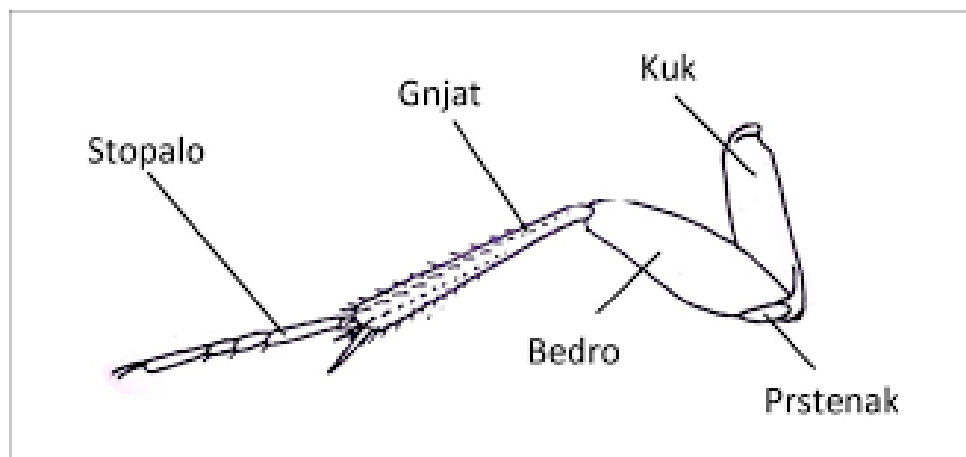


**Slika 2.** Struktura ticala kod različitih porodica vodenih kornjaša: 1. Hydrophilidae, 2. Dryopidae, 3. Dytiscidae i 4. Noteridae (Preuzeto i prilagođeno iz Nillsona, 1996)



Prsa se sastoje od prednjeg (prothorax), srednjeg ( mesothorax) i stražnjeg ( metathorax) kolutića i čini pokretačku tagmu u kukaca. Sa stražnje strane prsnog kolutića pričvršćen je trouglasti štitić (Nillson, 1996). Na svakom kolutiću nalazi se po jedan par nogu koje mogu imati različite funkcije. Kod kornjaša noge prvenstveno služe za plivanje i hodanje. Noga ima člankovitu građu i sastoji se od šest dijelova: kuka (coxa), nožnog prstenka (trochanter), bedra (femur), gnjata (tibia), stopala (tarsus) i predstopala (praetarsus) (Slika 3.). Na srednjem i stražnjem ili samo srednjem kolutiću prsa nalaze se krila. Prednja krila imaju zaštitnu, dok stražnja krila, ukoliko postoje, imaju letnu funkciju. Krila koja imaju zaštitnu ulogu nemaju krilna rebra (Habdija i sur., 2011; Matoničkin, 1981).

Zadak kornjaša sačinjen je od 5-7 vidljivih začanih kolutića, te nemaju začanih privjesaka (cerci) koji obavljaju osjetnu ulogu. Obično se posljednji kolutić zatka uvlači u prednji kolutić (Matoničkin, 1981).



**Slika 3.** Građa noge vodenog kornjaša ( Preuzeto i prilagođeno iz Nillsona, 1996)

Unutarnji organi nalaze se u tjelesnoj šupljini koja je po podrijetlu hemocel i naziva se miksocel. Šuljina nastaje u embrionalnom razvitku.

Živčani sustav kornjaša ima ljestvičastu građu. U području prsa i zatka dolazi do stapanja ganglija, prva tri para živčanih ganglija su se stopila u nadždrijelni ganglij tzv. „mozak“, a druga u podždrijelni ganglij (Habdija i sur., 2011).

Prednji dio probavila kukaca započinje ustima koja se nastavljaju u jednjak koji je obično podijeljen na dva različita dijela: volju (*ingluvies*) i proventriculus koji je sfinkterom odvojen od srednjeg crijeva. Prednji dio proventriculusa izgrađen je kao žvačni predželudac u kojem se, ne uvijek, nalaze žvačni hitinski zubići. Stražnji dio proventriculusa prelazi u srednje crijevo koje je od stražnjeg odvojeno naborom ili zaliskom. U stražnjem se crijevu resorbira voda, ioni i aminokiseline (Matoničkin i Erben, 2002).

Krvožilni sustav je otvoren, te su kod njih arterije i vene različito razvijene. Budući da dišu uzdušnicama imaju vrlo pojednostavljen krvožilni sustav. Iz tog razloga u zatku s leđne strane imaju oduže srce (leđna krvna žila) koje je sastavljeno od više klijetki, a sa strane svaka ima svoj par ostija sa zaliscima. Prednji dio krvne žile je aorta koja se pruža u glavu kornjaša. Kroz krvožilni sustav prolazi tjelesna tekućina bezbojne ili žućkaste boje koja sadrži hemocite, katione, anione, a kod nekih kukaca i hemoglobin (Habdija i sur., 2011).

Kornjaši za ekskreciju imaju Malpighijeve cjevčice koje predstavljaju nerazgranate izvrate crijeva u hemocel. Nastaju evaginacijom proktoderma, te je ektodermalnog podrijetla. Za ekskreciju su važna i masna tijela koja predstavljaju krpaste nakupine mezodermalnih stanica sa strane crijeva. Masna tijela imaju sljedeće uloge: sinteza i metabolizam masti, sinteza i metabolizam bjelančevina, te sinteza mokraćne kiseline i deaminacija dušikovih spojeva. Prije pražnjenja crijeva rektalna žlijezda resorbira vodu iz polutekućeg sadržaja, te se ekskreti izbacuju u kristaliziranoj formi (Habdija i sur., 2011).

Oplodnja je unutarnja. Kornjaši imaju parne gonade koje su smještene u zatku. Parni gonodukti se pri kraju združuju u neparnu izvodnu cijevčicu zbog čega imaju samo jedan spolni otvor. Za ženski spolni uređaj je karakteristično sjemenno spremište (*receptaculum seminis*) i neke žlijezde koje su potrebne za odlaganje jajašaca, dok za muški spolni uređaj sjemena vrećica (*vesicula seminalis*) i dodatne sluzne žlijezde (Matoničkin i Erben, 2002).

Posjeduju hormonalne žlijezde koje su neovisne o endokrinom sustavu, a to su: protorakalna žlijezda, ventralna žlijezda i perikardijalna žlijezda. Najpoznatiji neurohemalni organi su *corpora cardiaca*, a to su parni organi smješteni u retrocerebralnom kompleksu na prednjem kraju aorte (Habdija i sur., 2011).

### 1.3.2. Disanje

Izmjena plinova zasniva se na difuziji kroz stijenku tijela kod sitnijih kukaca, dok u krupnijih oblika funkciju izmjene plinova obavlja uzdušnički (trahejalni) sustav. Uzdušnice predstavljaju epidermalne uvrate koji se razgranjuju u cjevasti sustav kojim struji zrak sve do stanica i međustaničnih prostora. Širina uzdušnica varira od 1 $\mu$ m do nekoliko milimetara, te na površini obložene slojem epitelnih stanica (Habdija i sur., 2011).

Kukci koji posjeduju uzdušnički sustav za disanje i žive u vodi imaju veću potrebu za kisikom, zbog čega su razvili niz prilagodbi kako bi se suočili s nižom koncentracijom kisika u mediju u kojem žive (Gullan i Cranstron, 2010).

Za odrasle vodene kornjaše karakteristična su dva načina podvodnog disanja. Većina vrsta iz porodice Hydrophilidae ima spremište zraka (plastron) ispod pokrivanja, te ga mogu uzimati direktno iz vode. Upravo iz tog razloga mogu ostati pod vodom duži vremenski period. Ličinke nemaju spremišta za zrak, te su razvile sustav uzdušničkih škruga koji je neovisan o atmosferskom zraku. Plastron predstavlja niz kruto i blisko raspoređenih dlaka na trbušnoj strani tijela (Nillson, 1996).



**Slika 4.** Tanki sloj kisika s trbušne strane kornjaša (Izvor: web 2)

### 1.3.3. Prehrana

Pripadnici podreda Polyphaga većinom su svejedi ili biljojedi, dok su pripadnici podreda Adephaga uglavnom predatori odnosno hrane se ostalim beskralježnjacima, račićima, kukcima i maločetinašima (Friday, 1988; Nillson, 1996). Ličinke vodenih kornjaša uglavnom hvataju živi plijen, ali su povremeno i strvinari. Odrasle jedinke se hrane živim ili mrtvim biljnim materijalom. Kornjaši osim što hvataju plijen mogu i biti plijen, te su izloženi velikoj opasnosti. Njih obično love veći vodeni grabežljivci poput riba i ostali grabežljivi kukci (naročito ličinke vretenaca), te su iz toga razloga razvili mnoge kemijske obrane. Navedene obrane prisutne su samo kod odraslih oblika (Nillson, 1996).

### 1.3.4. Životni ciklus

Više od 85% kukaca ima potpunu preobrazbu (holometaboliju). Upravo su kornjaši jedni od kukaca koji imaju potpunu preobrazbu koja uključuje sljedeće stadije: jaje, ličinku, kukuljicu i odrasli stadij (imago). Jaja većine vodenih kornjaša su glatka, mekana i prekrivena čvrstom ljuskom. Kod kukaca s potpunom preobrazbom dolazi do razvoja imaginifugalne ličinke koja se presvlači i zakukulji u nepokretnu kukuljicu iz koje izlazi odrasli kukac nakon određenog vremenskog perioda. Ličinke nemaju začetke krila, te se presvlače nekoliko puta. Uobičajeno se razvijaju ljeti. Odrasle jedinke imaju krila, više ne rastu i ne presvlače se. Kada završi razvojni ciklus ličinke ona se više ne hrani i prelazi u stanje mirovanja u kojem izgrađuje kukuljicu (Habdija i sur., 2011; Nillson, 1996).

Ličinke većine vodenih kornjaša imaju tri faze razvoja. Prvu fazu razvoja karakterizira organeli za probijanje jajeta na prednjem dijelu ličinke. Druga i treća faza se razlikuju samo po broju tjelesnih privjesaka. Ličinke vodenih kornjaša obično napuštaju vodeni medij kako bi se zakukuljili, te se proces produkcije kukuljice događa u litoralnoj zoni. Odrasle se jedinke pojavljuju ljeti i tada ulaze u period leta. Odrasle jedinke u tome periodu zauzimaju posebne ekološke niše u prirodi. Kod nekih se to događa jednom u životu (*Elmidae*), dok kod drugih i nekoliko puta (većina predstavnika porodice *Hydrophilidae*) (Nillson, 1996).

Ustrojeni životni ciklusi vodenih kornjaša omogućili su njihovo uspješno preživljavanje tijekom kratke faze života u vodi. Kornjaši koji žive u plitkim lokvama i barama brzo prolaze kroz ličinački stadij u stadij kukuljice (Eyre, 2006).



**Slika 5.** Holobetabolija kornjaša (Coleoptera); 1. jaje, 2. ličinka, 3. kukuljica i 4. Imago  
(Izvor: web 3)

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

Vodeni kornjaši nastanjuju sve tipove slatkovodnih i bočatih staništa. Prestavljaju jednu od najbrojnijih skupina vodenih kukaca koji su izvrsni pokazatelji kakvoće staništa, stabilnosti i starosti staništa u kojem borave. Iz navedenih razloga može se smatrati indikatorskim vrstama koje imaju specifične kemijske i fizikalne zahtjeve (Sharma i sur., 2013)

Faktori koji utječu na populacije vodenih kornjaša su provodljivosti i pH koji indirektno utječu na brojnost i sastav vodenih kornjaša (Lundkvist i sur., 2001).

Rubni dijelovi vodenih staništa područja su najveće brojnosti i raznolikosti vrsta vodenih kornjaša (Nillson, 1996). Primarna staništa vodenih kukaca su slatkovodne močvare koje su u posljednjih 30-ak godina jako uništene u vidu degradacije staništa koja pak uključuje sušenje, zakiseljavanje i eutrofikaciju (Verberek i sur., 2005)

#### **1.5. Cilj znanstvenog rada**

Na temelju molekulske identifikacije odrediti vrste iz roda *Hydrochara* odnosno utvrditi prisutnost vrsta *Hydrochara caraboides* i *Hydrochara flavipes* na području kontinentalne Hrvatske.

## 2. MATERIJALI I METODE

### 2.1. Područje istraživanja

Istraživanje je provedeno na nekoliko lokaliteta smještenih uz četiri velike rijeke koje pripadaju Crnomorskom sljevu. Uzorkovale su se jedinke na području Čepina, Viljeva, Sunjskog polja, Čigoča, Grede i Peklenice. Uz rijeku Savu smješteni su Čigoč i Sunjsko polje, dok se Viljevo i Čepin nalaze uz Dravu. Greda se nalazi u blizini Odra, a Peklenica uz rijeku Muru. Rijeke Sava i Drava dvije su najveće tekućice na području Hrvatske, prva je Sava čija dužina vodotoka u Republici Hrvatskoj iznosi 510 km, dok Drava ima vodotok dug 323 km. Mura predstavlja najveći prtok rijeke Drave, dok je Odra lijevi prtok rijeke Save (Izvori: web 4, web 5, web 6).

**Tablica 1.** Područja istraživanja vodenih kornjaša

TEKUĆICA	SAVA	DRAVA	MURA	ODRA
MJESTO UZORKOVANJA	Čigoč	Čepin	Peklenica	Greda
	Sunjsko polje	Viljevo		

### 2.2. Metode uzorkovanja vodenih kornjaša

Jedinke iz roda *Hydrochara* uzorkovane su pomoću entomološke mrežice i klopki s atraktantom. Nakon što se pohrane u bočice s cijankalijem, radi lakšeg usmrćivanja, jedinke se prebacuju u 95%-tni etanol koji zaštićuje uzorkovani materijal od razgradnje. Uzorkovani vodeni kornjaši se koriste u daljnim analizama.



**Slika 6.** Entomološka mrežica (Izvor: web 7)

### **2.3. Izolacija DNA**

Svakoj jedinki se prvo odstrane tri noge koje se izvažu na analitičkoj vagi. Iz nogu vodenih kornjaša izolirana je DNA pomoću kompleta za izolaciju DNA (engl. *DNeasy® Blood & Tissue Kit*) proizvođača Qiagen. Na taj se način izolirala DNA koja se nalazi u mitohondrijima i jezgrama stanica. Za izolaciju DNA su potrebni sljedeći regensi: lizirajući pufer ATL, lizirajući pufer AL, apsolutni alkohol, pufer za ispiranje AW1, pufer za ispiranje AW2, pufer za eluciju AE i proteinaza K.

Postupak izolacije DNA vrši se kroz sljedeće korake:

- 1) izvagano tkivo stavi se u sterilnu tubicu od 1,5mL gdje se mehanički usitnjava tkivo
- 2) dodati 180  $\mu$ L lizirajućeg pufera ATL (engl. *Animal Tissue Lysis*)
- 3) dodati 20  $\mu$ L proteinaze K i vorteksirati 5-10 s
- 4) slijedi inkubacija tkiva u vodenoj kupelji 24 sata na 56°C uz povremeno miješanje
- 5) vorteksirati tubicu s uzorkom 15 s
- 6) dodati 200  $\mu$ L lizirajućeg pufera AL, vorteksirati i dodati 200  $\mu$ L etanola, a zatim vorteksirati pri čemu mora nastati homogena smjesa

- 7) dobiveni uzorak prebaciti u kolonu za ispiranje. Kolonu zatvoriti i centrifugirati 1 min na 8000 rpm pri sobnoj temperaturi. Zatim baciti kolekcijsku tubicu i staviti kolonu u novu sterilnu tubicu za prikupljanja eluata.
- 8) dodati 500  $\mu\text{L}$  pufera za ispiranje AW1. Kolonu zatvoriti i centrifugirati 1 min na 8000 rpm pri sobnoj temperaturi. Baciti kolekcijsku tubicu i staviti kolonu u novu sterilnu tubicu za prikupljanje eluata.
- 9) dodati 500  $\mu\text{L}$  pufera za ispiranje AW2, centrifugirati 3 min na 14000 rpm pri sobnoj temperaturi
- 10) baciti kolekcijsku tubicu i staviti kolonu u novu sterilnu tubicu od 1,5 mL
- 11) dodati 200  $\mu\text{L}$  pufera za eluciju AE i inkubirati 1 min na sobnoj temperaturi, pa centrifugirati 1 min na 8000 rpm pri sobnoj temperaturi
- 12) kolonu izvaditi i baciti, a tubice u kojim se nalazi eluat spremi i čuvati na  $+4^{\circ}\text{C}$

## 2.4. Određivanje koncentracije DNA

Uz pomoć uređaja Nanophotometer (Implen, Njemačka) određena je koncentracija DNA u uzorcima. Valna duljina pri kojoj se određuje koncentracija DNA iznosi 260 nm. Kao slijepa proba korištena je sterilna deionizirana voda čija je koncentracija 0,00 ng/  $\mu\text{L}$ . Koncentracija DNA se izražava u ng/  $\mu\text{L}$ .

**Tablica 2.** Koncentracije DNA u uzorcima

OZNAKE UZORKA	KONCENTRACIJA [ng/ $\mu\text{L}$ ]
ZČ1	15,29
GOP1	4,25
V1	5,01
BP1	15,05
P1	5,71
LPČ1	2,85



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

Procesom lančane reakcije polimerazom umnoženi su geni za citokrom oksidazu podjedinica I (COI) pomoću specifične početnice za taj gen. PCR (engl. *Polymerase Chain Reaction*) je metoda kojom se relativno kratki dio DNA umnožava u veliki broj identičnih kopija. Znanstvenik Kary Mullis je 1983. godine otkrio i opisao metodu kojom se u *in vitro* uvjetima umnožava DNA bez kloniranja i to iz malih količina DNA. Riječ je o tzv. polimeraznoj lančanoj reakciji. Za izvođenje PCR reakcije su potrebni: deoksiribonukleozid-trifosfati (dNTP-ovi), DNA kao kalup za umnažanje, termostabilna DNA polimeraza (taq polimeraza), par sintetskih oligonukleotidnih početnica i divalentni kationi (najčešće ion magnezija).

PCR reakcija se sastoji od sljedećih faza:

- 1) FAZA DENATURACIJE
- 2) FAZA HIBRIDIZACIJE POČETNICA
- 3) FAZA ELONGACIJE POČETNICA

### 2.5.1. Početnice

Za izvođenje PCR reakcije korištene su početnice za gen citokrom oksidazu podjedinice I (COI) koje su sintetizirane u korisničkom servisu Macrogen. U Tablici 2. navedeni su nukleotidni sljedovi korištenih početnica.

**Tablica 3.** Par početnica korišten pri umnažanju markera COI metodom PCR

IME POČETNICE	NUKLEOTIDNI SLIJED POČETNICE
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 marker COI

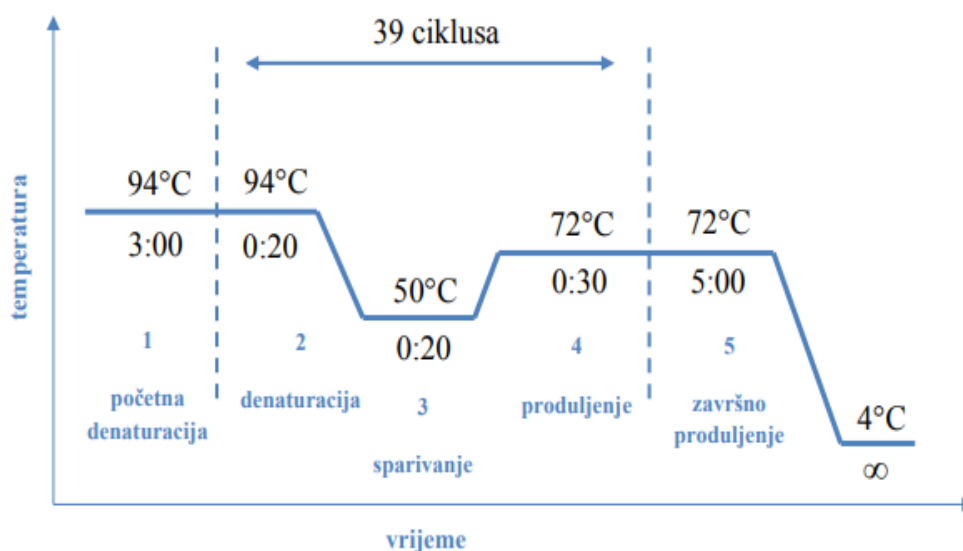
Umnažanje DNA polimeraznom lančanom reakcijom izvedeno je u 0,2 mL PCR tubicama u uređaju GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems) u ukupnom volumenu reakcijske smjese od 25 µL. Kako bi olakšali postupak umnažanja DNA korištena je

mješavina reagensa za PCR koja sadrži PCR enzim, dNTP smjesu, optimizirani pufer i boju, a naziva se EmeraldAmp® MAX PCR Master Mix (Takara Biotechnology, Japan). Budući da su koncentracije DNA u uzorcima bile različite, uzorci za marker COI podijeljeni su u tri skupine što je prikazano u Tablici 3.

**Tablica 4.** Reakcijske smjese za marker COI za tri skupine uzoraka

	PRVA SKUPINA	DRUGA SKUPINA	TREĆA SKUPINA
mq H2O	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

Ciklus umnažanja odsječaka COI metodom PCR prikazan je na Slici 7. koji uključuje početnu denaturaciju na 94°C. Nakon toga slijedi 39 ciklusa umnažanja koji obuhvaća tri faze (denaturacija na 94°C, sparivanje početnica i kalupa DNA na 50°C te produljivanje lanca na 65°C). Na temperaturi od 72°C odvija se završno produljivanje lanca.



**Slika 7.** Program ciklusa umnažanja odsječaka COI polimeraznom lančanom reakcijom

## **2.6. Elektroforetsko razdvajanje odsječaka DNA u agaroznom gelu**

Horizontalnom elektroforezom u 2 %-tnom agaroznom gelu razdvojeni su odsječci DNA u obliku bendova. Agarozni gel načinjen je otapanjem agaroze u 0,5 x TBE puferu kojem se zatim doda SYBR® Safe boja za gelove (LifeTechnologies, Termo Fisher Scientific, SAD). Nakon što se izlije gel potrebno je nekoliko minuta da pređe iz tekućeg u kruto stanje. Zatim se dolije 0,5 x TBE pufer koji treba prekriti gel. Pomoću češljica napravljene su jažice u koje se nanosi 5 µL PCR produkta i 2 µL markera (GenRuler 1 kb DNA Ladder) koji određuje dužinu odsječaka DNA. Elektroforeza se odvija pri sobnoj temperaturi i naponu od 50 V. Kada produkti izađu iz jažica napon je potrebno povećati na 100 V. Dodana SYBR® Safe boja se veže za dvolančanu DNA što omogućuje lakše uočavanje bendova.

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

Za određivanje nukleotidnih sljedova potrebno je pomiješati 5 µL PCR produkta i 5 µL otopine početnica. Načinjeni uzorci su poslani u Macrogen Inc. (Južna Koreja) na sekvenciranje. Korištene su dvije početnice (LCO-1490 I HCO-2198) u reakcijama sekvenciranja. Upotrebom programa BioEdit omogućeno je pregledavanje i sravnjivanje sekvenci, te uklanjanje krajeva i loše očitanih podataka (Hall, 1999). Dobivene sekvence se uspoređuju sa sekvencama koje su pohranjene u genskoj bazi GenBank institucije NCBI (engl. *National Center for Biotechnology Information*) pomoću alata BLAST (engl. *Basic Local Alignment Search Tool*). Na temelju algoritma megablast vrši se pretraživanje vrlo sličnih nukleotidnih sljedova. Uz pomoć programa MEGA6 v. 06 (engl. *Molecular Evolutionary Genetic Analysis*) određuje se udaljenost između nukleotidnih sljedova (Tamura i sur., 2013).

### 3. REZULTATI

Prikupljenim vodenim kornjašima izmjerena je dužina i širina tijela. Obe veličine su izražene u mm, te se iz tih veličina izračunala površina tijela u mm<sup>2</sup>. Vrijednosti navedenih veličina prikazane su u Tablici 4. Budući da je teško identificirati, na temelju razlika u morfologiji, jedinke iz roda *Hydrochara* pristupilo se molekularnoj identifikaciji upotrebom molekularnog markera COI. Izolacija DNA izvršena je prema protokolu proizvođača, uz male izmjene. Koncentracija DNA varirala je od 2,85 ng/μL do 15,29 ng/μL. Nakon toga se pomoću metode PCR umnožila DNA koja se zajedno s markerom nanosi u jažice agaroznog gela. Po završetku elektroforeze napravljena je detekcija produkata polimerazne lančane reakcije pomoću UV-svjetla gdje se jasno uočavaju bendovi koncentriranog produkta. Gel dobiven nakon elektroforeze poslan je na određivanje nukleotidnih sekvenci.

**Tablica 5.** Ukupna dužina i širina jedinki vodenih kornjaša, te površina ventralne strane tijela.

OZNAKA UZORKA	DULJINA [mm]	ŠIRINA [mm]	POVRŠINA [ mm <sup>2</sup> ]	DATUM	MJESTO UZORKOVANJA
ZČ1	7,05	3,45	24,32	10.5.2017.	ZIDINE, ČEPIN
BP1	7,17	3,52	25,24	27.5.2012.	SUNJSKO POLJE, BJELOVAČKO POLJE
GOP1	7,45	3,56	26,52	29.5.2011.	ODRANJSKO POLJE, GREDA
LPČ1	7,88	3,78	29,79	28.4.2010.	L.POLJE, ČIGOČ
P1	6,93	3,88	26,89	7.7.2013.	MURA, PEKLENICA
V1	7,97	4,21	33,55	22.5.2013.	VILJEVO

Nakon sekvenciranja pregledani su kromatogrami i njihovom analizom utvrđeno je postojanje uspješnih i neuspješnih reakcija sekvenciranja DNA. Uzroci koji mu možda uzrokovali neuspjelu reakciju su: loša kvaliteta DNA, korištenje pogrešne početnice, degradacija početnica, zagađena deionizirana voda i sl. Kod uspjele reakcije sekvenciranja kromatogram prikazuje točan slijed nukleotida. Za gen citokrom oksidazu podjedinicu I dužina sekvence se kreće od 438 do 588 parova baza.

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

Usporedbom dobivenih sekvenci COI s istovrsnim sekvencama iz banke gena pripadale su vrsti *Hydrochara caraboides*. Referentna sekvenca uzeta je iz Bavarske državne zbirke u Münchenu, Njemačka skupine autora: Hendrich L, Moriniere J, Haszprunar G, Hebert PD, Hausmann A, Kohler F i Balke M. U analizi sekvence KM444532 sa sekvencom u ovom istraživanju dobivena je 100%-tna i 99%-tna identičnost što ukazuje na identifikaciju vrste *Hydrochara caraboides*.

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

Usporedbom dobivenih sekvenci COI s istovrsnim sekvencama iz banke gena pripadale su vrsti *Hydrochara flavipes*. Referentna sekvenca uzeta je iz Bavarske državne zbirke u Münchenu, Njemačka skupine autora: Hendrich L, Moriniere J, Haszprunar G, Hebert PD, Hausmann A, Kohler F i Balke M. U analizi sekvence KM451336 sa sekvencom u ovom istraživanju dobivena je 99%-tna identičnost što ukazuje na identifikaciju vrste *Hydrochara flavipes*.

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

Udio pojedinih baza i udio baznih parova predstavljaju osnovne karakteristike nukleotidnih sekvenci gena citokrom oksidaze podjedinice I vodenih kornjaša iz roda *Hydrochara*. Njihove vrijednosti prikazane su u Tablici 6., te su izražene u %.

**Tablica 6.** Osnovne karakteristike nukleotidnih sekvenci gena COI za vrste iz roda *Hydrochara*

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

Određena je genetička udaljenost između nukleotidnih sekvenci koja se definira kao udio nepodudarenih baznih parova unutar sravnjenih sekvenci. Na taj se način ustanovila 83,72%-tna sličnost sekvenci kod vrsta *Hydrochara caraboides* i *Hydrochara flavipes*. Važno je istaknuti da unutar linije *Hydrochara caraboides* postoje različite podlinije koje ukazuju na postojanje hibridnih vrsta.

#### 4. RASPRAVA

Na području kontinentalne Hrvatske utvrđena je prisutnost dviju vrsta *H. caraboides* i *H. flavipes* (Hansen, 1999; Löbl i Smetana, 2004), ali i prisutnost hibridnih vrsta. Prisustvo nove vrste nastojat će se utvrditi u daljnjim istraživanjima. Malo je znanstvenika koji se bave porodicom Hydrophilidae, zbog čega je i mali broj znanstvenih radova na tu temu. Vodeni kornjaši su najbrojnija skupina kukaca u Hrvatskoj, ali su najmanje istraženi. U svom istraživanju Turić (2013) navodi prisustvo vrste *H. caraboides* na području Parka prirode Kopački rit koje je provedeno od travnja do kraja studenog 2005. godine. Budući da je teško identificirati vrste iz roda *Hydrochara* samo na temelju morfoloških obilježja pristupa se molekularnoj identifikaciji, odnosno određivanju nukleotidnih sekvenci. Barkodiranje se koristi kao jako pouzdan alat u određivanju morfološki vrlo sličnih jedinki. Većina znanstvenika svoja istraživanja temelji na morfološkim razlikama između jedinki (Short, 2010; Hansen, 1991). Postoje znanstvenici koji su pristupili molekularnoj identifikaciji, ali njih je jako malo (Berhard i sur., 2006). Identifikacija vrsta koja se temelji na malim segmentima DNA koristi se za proučavanje vrsta koje je teško razlikovati na osnovu morfoloških obilježja (Pace, 1997). Citokrom oksidaza podjedinica I (COI) smještena je u kružnom lancu mitohondrijske DNA. Gen COI predložen je kao univerzalni marker u procesu barkodiranja (Hebert i sur., 2003).

U ovom znanstvenom radu primjenila se metoda barkodiranja. Usporedbom sekvenci vrsta *Hydrochara caraboides* i *Hydrochara flavipes* utvrđena je 83,72%-tna sličnost. Vrsta *H. caraboides* ima dužu sekvencu od vrste *H. flavipes*. Osim toga razlike se uočavaju i u veličini jedinki. Jedinke vrste *H. flavipes* su manje u usporedbi s jedinkama vrste *H. caraboides*. U ovom istraživanju su se koristili geni za podjedinicu I citokrom oksidaze (COI) kao jedan od molekularnih markera. Geni za manju podjedinicu ribosomalne RNA (16S rRNA) također se može koristiti kao molekularni marker u barkodiranju. Kombinacijom morfoloških parametara i molekularnih metoda postižu se precizniji rezultati što je potvrđeno u radu Bruve-Mađarića i sur. (2013).

Postoji organizacija pod nazivom „*Consortium for the Barcode of Life*“ koja je organizirala BOLD sustav. BOLD sustav predstavlja bazu referentnih sekvenci gena COI čiji je zadatak prikupiti barkodove svih eukariota. Korisnici koji su registrirani u navedenu bazu pohranjuju barkodove, te informacije o uzorku koji su na raspolaganju ostalim korisnicima.

Zbog neistraženosti roda *Hydrochara* provedeno je ovo istraživanje. Cilj je bio potvrditi ranija istraživanja na ovu temu. Budući da Hrvatske predstavlja dobar potencijal za istraživanje roda *Hydrochara* zbog niza prednosti, provedeno je i ovo istraživanje. Povoljan geografski položaj i povoljna klima jedan su od razloga rasprostranjenosti ovoga roda. Istraživanja su provedena na području kontinentalne Hrvatske, ali ne i na području mediteranske i alpske Hrvatske. Upravo se zbog toga nastoje prikupiti jedinke vodenih kornjaša i s navedenih područja koja će biti provedena u narednim istraživanjima. Na taj će način baza podataka biti kompletnija što je i cilj organizacije koja je osnovala BOLD sustav.



## 5. ZAKLJUČAK

Ovim je istraživanjem utvrđena prisutnost vrsta *Hydrochara caraboides* i *Hydrochara flavipes* na području kontinentalne Hrvatske. Njihova prisutnost utvrđena je na temelju molekulske identifikacije. U narednim istraživanjima će biti potrebno uvesti i druge molekularne markere kako bi rezultati bili točniji i sigurniji.

## 6. LITERATURA

- Bernhard D, Schmidt C, Korte A, Fritzsche 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.
- 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: Sphaeriidae, Gyrinidae, Halplidae, Noteridae, Hygrobiidae, Dytiscidae, Helophoridae, Georissidae, Hydrochidae, Spercheidae, Hydrophilidae, Hydraenidae, Scirtidae, Elmidae, Dryopidae, Limnichidae, Heteroceridae, Psephenidae). *Klapalekiana* 43:1-289.
- Bruvo-Madžarić 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.
- Eyre M. D. 2006: A strategic interpretation of beetle (Coleoptera) assemblages, biotopes, habitats and distribution, and the conservation implications. *Journal of Insect Conservation* 10: 151 – 160.
- Friday LE. 1988. A Key to the Adults of British Water Beetles. *Field Studies* 7:1-151
- Gullan PJ, Cranston P. 2010. *Insects: An Outline of Entomology*. 4th Edition. Wiley-Blackwell Publishing, Oxford, 584 pp.
- Gholamzadeh S, Incekara Ü. 2016. Review of molecular taxonomy studies on Coleoptera aquatic insects. *Int. J. Entomol. Res.* 04 (01) 2016. 25-36
- 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. 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.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, DeWaard JR. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270:313-321

- Jäch MA, Balke M. 2008. Global diversity of water beetles (Coleoptera) in freshwater. *Hydrobiologia* 595:419-442.
- Löbl I, Smetana A. 2004. Catalogue of Palearctic Coleoptera. Vol. 2: Hydrophiloidea Staphylinoidea. Apollo Books, Copenhagen, 942 pp.
- Lundkvist E., Landin J., Karlsson F. 2001: Dispersing diving beetles (Dytiscidae) in agricultural and urban landscapes in south – eastern Sweden. *Annales Zoologici Fennici* 39: 109 – 123.
- Matoničkin I. 1981. Beskralješnjaci. *Biologija viših avertebrata. Školska knjiga*, Zagreb, 642 pp.
- Matoničkin I, Erben R. 2002. *Opća zoologija. Školska knjiga*, Zagreb, 380 pp.
- Nilsson A. 1996. *Aquatic Insects of North Europe*. Apollo Books, Stenstrup, 274 pp.
- Pace N.R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276, 734-740
- Ratnasingham S, PDN Hebert. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)). *Molecular Ecology Notes* 7,355-364
- 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.
- 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. 2013. Prostorno vremenski utjecaj vodnog režima na strukturu i raznolikost vodenih kukaca (Heteroptera i Coleoptera) s posebnim osvrtom na zaštićenu vrstu *Graphoderus 55 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. [https://www.pmf.unizg.hr/dna\\_barkodiranje](https://www.pmf.unizg.hr/dna_barkodiranje), pristupljeno: 12.3.2019.
2. [https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcSqUGFbuUgFTVlisdMd\\_Rl70FtS\\_jX3uVFPs3UIPCtCXB7NQ9az](https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcSqUGFbuUgFTVlisdMd_Rl70FtS_jX3uVFPs3UIPCtCXB7NQ9az), pristupljeno: 9.6.2019.
3. <http://sebrkic.weebly.com/uploads/8/0/6/6/806684/2288043.gif?361>, pristupljeno: 9.6.2019.
4. <https://www.voda.hr/hr/novosti/sava-rijeka-s-najduljim-vodotokom-u-hrvatskoj>, pristupljeno: 13.6.2019.
5. <http://prirodahrvatske.com/usca-rijeka/>, pristupljeno: 13.6. 2019.

6. <https://www.voda.hr/hr/novosti/prirodna-drzavna-granica-rijeka-iznimne-bioraznolikosti-drava>, pristupljeno: 13.6.2019.
7. [https://www.google.com/search?q=entomolo%C5%A1ka+mre%C5%BEa&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwj8uev0r4TjAhUGIIsKHT0sBF0Q\\_AUJECgB&biw=1366&bih=657#imgdii=8iqhCfkjCYeihM:&imgrc=arRBKvmQ5rs1tM;](https://www.google.com/search?q=entomolo%C5%A1ka+mre%C5%BEa&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwj8uev0r4TjAhUGIIsKHT0sBF0Q_AUJECgB&biw=1366&bih=657#imgdii=8iqhCfkjCYeihM:&imgrc=arRBKvmQ5rs1tM;), pristupljeno: 14.6.2019.