

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Dora Kermek i Nikola Pisciutta

Integrativni pristup u istraživanju obalčara (Insecta: Plecoptera) i tulara
(Insecta: Trichoptera) Parka prirode Medvednica uz komparativnu
filogeografsku analizu šire rasprostranjenih vrsta

Zagreb, 2022.

Ovaj rad izrađen je na Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Mladena Kučinića i neposrednim voditeljstvom Dore Hlebec, mag. educ. biol. et chem. i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2021./2022.

Popis kratica

ABGD – *Automatic Barcode Gap Discovery*

ASAP – *Assemble Species by Automatic Partitioning*

BA – *Bayesian analysis*

BIN – *Barcode Index Number*

BOLD – *Barcode of Life Database*

BOLD-ID – BOLD identifikacijska oznaka

bPTP – *Bayesian Poisson Tree Processes*

COI – gen za citokrom c oksidazu

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

EPT – Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera

K2P – *Kimura 2-parameter genetic distance*

ML – *maximum likelihood*

MP – *maximum parsimony*

mtDNA – mitohondrijska deoksiribonukleinska kiselina

NJ – *neighbour joining*

OTU – *operational taxonomic unit*

pb – parovi baza

PCR – lančana reakcija polimerazom

RNA – ribonukleinska kiselina

rRNA – ribosomska ribonukleinska kiselina

TBE – tris-borat-etilendiamintetraoctena kiselina

tRNA – transportna ribonukleinska kiselina

Sadržaj rada

1. Uvod.....	1
1.1 Filogenija i molekularna filogenija.....	1
1.2 Filogenetsko stablo	1
1.3 Metode rekonstrukcije stabala	3
1.4 Filogeografija.....	4
1.5 Metoda DNA barkodiranja	5
1.5.1 Podjedinica I citokrom c oksidaze (<i>COI</i>).....	6
1.6 EPT skupina.....	7
1.6.1 Metoda DNA barkodiranja u istraživanjima faune obalčara i tulara u Hrvatskoj	7
1.7 Osnovne značajke reda tulari (Trichoptera).....	9
1.8 Osnovne značajke reda obalčari (Plecoptera).....	12
1.9 Područje istraživanja.....	14
2. Hipoteza, opći i specifični ciljevi rada.....	15
2.1 Hipoteza	15
2.2 Opći cilj rada.....	15
2.3 Specifični ciljevi rada	15
3. Materijali i metode.....	16
3.1 Uzorkovanje jedinki.....	16
3.2 Morfološka determinacija vrsta	18
3.3 Metoda DNA barkodiranja	18
3.3.1 Izolacija ukupne genomske DNA iz odabranih uzoraka.....	19
3.3.2 Umnažanje mitohondrijskog gena za podjedinicu I citokrom c oksidaze (<i>COI</i>) lančanom reakcijom polimeraze korištenjem specifičnih početnica	19
3.3.3. Elektroforetsko razdvajanje dobivenih fragmenata DNA.....	20
3.3.4. Pročišćavanje i sekvenciranje fragmenata DNA.....	21
3.3.5 Računalne analize nukleotidnih sekvencija	21

3.4 Filogenetičke i filogeografske analize	21
4. Rezultati	24
4.1 Filogenetičke i filogeografske analize odabranih vrsta iz reda obalčari (Plecoptera) ...	26
4.1.1 <i>Brachyptera seticornis</i>	27
4.1.2 <i>Leuctra braueri</i>	30
4.1.3 <i>Leuctra prima</i> i <i>Leuctra</i> sp. ZB	33
4.1.4 <i>Isoperla grammatica</i>	37
4.2 Filogenetičke i filogeografske analize odabranih vrsta iz reda tulari (Trichoptera)	41
4.2.1 <i>Hydropsyche contubernalis</i>	42
4.2.2 <i>Limnephilus flavicornis</i>	45
4.2.3 <i>Philopotamus montanus</i>	48
4.2.4 <i>Wormaldia occipitalis</i>	51
5. Rasprava	54
5.1 Kriptična raznolikost vrsta tulara <i>Limnephilus flavicornis</i> , <i>Philopotamus montanus</i> , <i>Wormaldia occipitalis</i> i vrste obalčara <i>Isoperla grammatica</i>	54
5.1.1 Potencijalna simpatrijska specijacija vrste tulara <i>Limnephilus flavicornis</i>	55
5.1.2 Filogeografska kompleksnost i alopatrijska specijacija vrste <i>Philopotamus montanus</i>	55
5.1.3 Unutarvrstna genska raznolikost vrste <i>Wormaldia occipitalis</i>	56
5.1.4 Genska strukturiranost i unutarvrstna varijabilnost vrste <i>Isoperla grammatica</i>	56
5.2 Genska homogenost vrsta tulara <i>Hydropsyche contubernalis</i> i vrsta obalčara <i>Brachyptera seticornis</i>	57
5.3 Analiza obalčara iz roda <i>Leuctra</i>	58
5.4 Filogenetska posebnost uzoraka prikupljenih na području Parka prirode Medvednica	59
5.5 Metoda DNA barkodiranja u istraživanju bioraznolikosti i konzervacijskoj biologiji ..	60
5.6 Usporedba metoda razgraničavanja vrsta korištenih u filogenetskim analizama	61
5.7 Važnost analize bioraznolikosti tulara i obalčara na području Parka prirode Medvednica	62

6. Zaključci	63
7. Zahvale.....	65
8. Popis literature	66
9. Sažetak	74
10. Summary	75
11. Životopis	76
12. Prilozi.....	77

1. Uvod

1.1 Filogenija i molekularna filogenija

Filogenija je znanstvena disciplina koja proučava evolucijsku prošlost i srodstvene odnose između različitih taksonomskih kategorija. Temelji se na uočavanju homologija, sličnosti među jedinkama koje su naslijeđene od zajedničkog pretka, proučavanjem morfologije organizama, fosilnih nalaza i biogeografije, a u novije vrijeme analizom molekularnih (DNA i proteini) te biokemijskih podataka (metaboliti). U svrhu preciznije rezolucije srodstvenih odnosa među taksonima, morfološke analize upotpunjuju se molekularno-filogenetičkim analizama (Douglas i Kirkpatrick, 2017; Nei i Kumar, 2000).

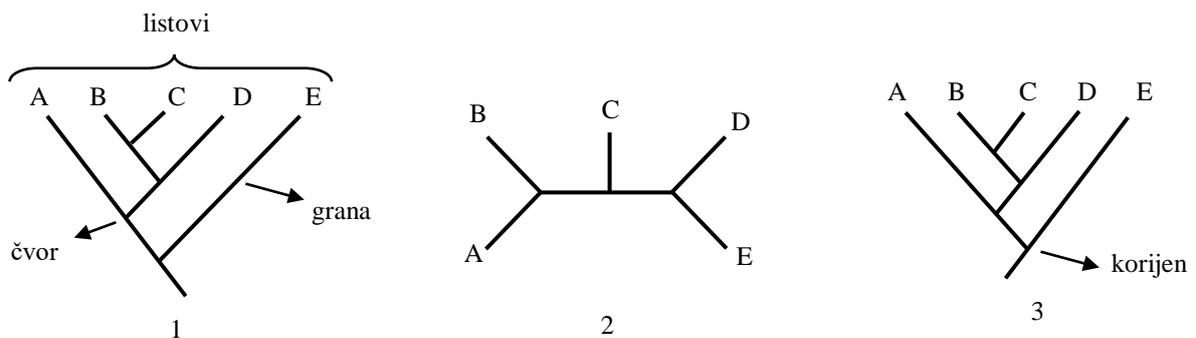
Molekularna filogenija proučava evolucijsku prošlost između i unutar različitih taksonomskih kategorija na razini bioloških makromolekula: DNA, RNA i proteina. Molekularno-filogenetičke analize uključuju primjenu molekularno-bioloških i bioinformatičkih metoda: izolaciju biološke makromolekule, umnažanje specifičnog fragmenta ili gena, sekvenciranje (određivanje redoslijeda nukleotida ili aminokiselina), višestruko sravnjivanje dobivenih sekvencija (sljedova), odabir primjenjivog modela za konstruiranje filogenetskog stabla i njegovu analizu te, u konačnici, rekonstrukciju slijeda događaja u evolucijskoj prošlosti. Primarni uvid u filogenetske odnose među nižim taksonomskim kategorijama (vrste i rodovi) i gensku raznolikost na unutar- i međuvrskoj razini dobiva se primjenom metode DNA barkodiranja (Douglas i Kirkpatrick, 2017; Trivedi i sur., 2018; Hebert i sur., 2003a).

1.2 Filogenetsko stablo

Filogenetska stabla predstavljaju pretpostavljene evolucijske odnose među taksonima, (Slika 1.1), na temelju korištenog modela, unesenih parametara i pretpostavki, a sastoje se od listova (vrhovi stabala, taksoni), grana i čvorova. Odnosi između taksona određeni su redoslijedom grananja (Xiong, 2006), dok svako grananje predstavlja specijacijski događaj, odnosno odvajanje dviju vrsta. Nerazriješeni filogenetski odnosi na stablu bit će prikazani kao dihotomija (granjanje iz kojeg nastaju dvije grupe) ili politomija (granjanje kojim nastaje više od dvije grupe). Ovisno o duljini grana razlikuju se: kladogram (duljine grana su jednake, a

informacije o evolucijskoj udaljenosti izostaju) i filogram (duljine grana odražavaju evolucijsku udaljenost) (Douglas i Kirkpatrick, 2017).

Filogenetsko stablo može biti neukorijenjeno ili ukorijenjeno (Slike 1.2 i 1.3). Korijen predstavlja zajedničkog pretka svih listova stabla, a listovi stabla koji dijele neposrednog zajedničkog pretka nazivaju se sestrinskim grupama. Neukorijenjeno stablo ne otkriva zajedničkog pretka i „smjer“ evolucije, već relativni međuodnos taksona. Kako u većini slučajeva zajednički predak svih taksona filogenetskog stabla predstavlja izumrlu ili nepoznatu vrstu, stablo je moguće ukorijeniti i na alternativne načine. Jedan od načina je korištenje vanjske grupe (eng. *outgroup*), koja predstavlja evolucijski stariji slijed (vrstu) od slijedova koji su predmet istraživanja (eng. *ingroup*). U odsutstvu vanjske grupe, primjenjuje se metoda „središnjeg ukorjenjivanja“ (eng. *midpoint rooting approach*). Navedena metoda temelji se na pretpostavci da sve sekvencije prate hipotezu molekularnog sata. Prema metodi molekularnog sata, sekvencije evoluiraju konstantom brzinom, čime je količina nakupljenih mutacija proporcionalna vremenu, stoga će središnja točka dvaju najrazličitijih taksona na razini čitavog filogenetskog stabla biti definirana kao korijen (Xiong, 2006).



Slika 1. Filogenetsko stablo: **1** – s označenim listovima, čvorovima i granama, **2** – neukorijenjeno filogenetsko stablo, **3** – ukorijenjeno filogenetsko stablo s označenim korijenom.

U opisivanju odnosa između taksonomskih jedinica na filogenetskom stablu moguće je razlikovati monofiletsku, parafiletsku i polifiletsku grupu (kladu). Validnost svake filogenetičke analize povećava se što je broj monofiletskih grupa veći, odnosno što je veći broj grupa koje uključuju sve taksonse posljednjeg zajedničkog pretka. Na temelju njih izvode se taksonomski i evolucijski zaključci. Monofiletsku grupu karakteriziraju sinapomorfije, odnosno stanja koje grupa ne dijeli ni s jednom drugom grupom i koja su rezultat nasljeđivanja od neposrednog zajedničkog pretka. Parafiletska grupa uključuju neke, ali ne i sve potomke

posljednjeg zajedničkog pretka te je opisana simpleziomorfijama, stanjima koja dijele dva ili više taksona i rezultat su nasljeđivanja od daljnjeg zajedničkog pretka. Polifiletska grupa objedinjuje taksona od kojih svi ne dijele posljednjeg zajedničkog pretka i karakteriziraju ih homoplazije. Homoplazije predstavljaju sličnosti koje nisu naslijeđene od istog pretka te mogu dovesti do potpuno pogrešnih zaključaka o srodnosti vrsta (Li, 1997).

1.3 Metode rekonstrukcije stabala

U svrhu pouzdanijih i efikasnih filogenetskih analiza razvijeno je nekoliko metoda za rekonstrukciju filogenetskih stabala, a sve one zahtijevaju matricu karaktera (eng. *character matrix*) u kojoj redovi odgovaraju sravnjenim sekvencijama uzoraka, a stupci setu nukleotida ili aminokiselina (De Bruyn i sur., 2013).

Metode za rekonstrukciju filogenetičkih stabala mogu se podijeliti na metode bazirane na matrici udaljenosti (eng. *distance matrix*) i metode bazirane na stanjima karaktera (eng. *character state*). Metode bazirane na matrici udaljenosti računaju evolucijske, odnosno genske udaljenosti za svaki par sekvencija unutar seta, najčešće kao udio supstitucija te na temelju odnosa izračunatih udaljenosti primjenom raznih algoritama konstruiraju filogenetsko stablo (Li, 1997). Najčešće korištena metoda koja se temelji na matrici udaljenosti je metoda susjednog sparivanja (NJ, eng. *neighbour joining*) (Saitou i Nei, 1987), u kojoj se povezuju najbliže susjedne taksonomske jedinice, a duljina grana odražava gensku udaljenost.

Metode bazirane na stanjima karaktera analiziraju nukleotide, delecijske i insercijske mutacije, ili aminokiseline (stanja) na pozicijama u sekvencijama (karakter) na temelju kojih konstruiraju stablo (Li, 1997). Najčešće korištene metode bazirane na stanjima karaktera su: metoda najveće štedljivosti (MP, eng. *maximum parsimony*), metoda najveće vjerojatnosti (ML, eng. *maximum likelihood*) i Bayesian analiza (BA, eng. *Bayesian analysis*) (Baxevanis i Oullette, 2001). Metoda najveće štedljivosti (Swofford i Berlocher, 1987) pronalazi topologiju stabla za koju je potreban minimalan broj evolucijskih promjena. Metoda najveće vjerojatnosti (Felsenstein, 1981) rekonstruira filogenetsko stablo (filogram) s najvećom vjerojatnošću da ono opisuje evolucijske promjene prema zadanom modelu. Metoda Bayesian analize (Mau i sur., 1999.) rekonstruira stablo prema naknadnim vjerojatnostima (eng. *posterior probabilities*) procijenjenima na osnovu zadanog evolucijskog modela.

1.4 Filogeografija

Filogeografija je interdisciplinarno područje koje koristi gensku informaciju u svrhu analize geografske distribucije genealoških linija, uz naglasak na unutarvrstne odnose ili odnose između blisko srodnih taksona (Anamthawat-Jónsson, 2012). Razvijena je kroz opažanja da grane u filogenetskom stablu dobivenim analizama sekvencija mitohondrijskih gena pokazuju upečatljiv geografski obrazac (Avis, 2000). Divergencija linija unutar vrste može biti diskontinuirana i kontinuirana, a linije mogu imati različite tipove geografske distribucije, poput preklapanja, kontinuiranog prijelaza ili su prostorno odvojene. Analiza genskih obrazaca i geografske distribucije linija ukazuje na najvjerojatnije evolucijske događaje koji su za posljedicu imali navedenu distribuciju linija (Avis i sur., 1987). Istraživanja genealogije gena mitohondrijske DNA na unutarvrstnoj razini rezultirale su postavljanjem filogeografskih hipoteza (Avis i sur., 1987):

- a) „Većinu vrsta čine geografski odvojene populacije čije jedinke zauzimaju različite grane na filogenetskom stablu.“ Genska udaljenost između grana može varirati od male do velike, no nerijetko su linije odvojene velikim filogeografskim prekidima. Ovakva geografska podjela između filogenetskih grana može se nazivati i filogeografska struktura populacije.
- b) „Vrste s ograničenom filogeografskom strukturom populacije prilagođene su lakom raspršivanju i zauzimaju područja koja ne sprečavaju protok gena.“ Pripadnici ove skupine imaju relativnu fluidnost zemljopisnog kretanja i najčešće je čine leteći kukci i morske ribe.
- c) „Monofiletske skupine koje odvajaju veliki filogenetski prekidi najčešće su rezultat dugotrajnih vanjskih (zoogeografskih) prepreka protoku gena.“ Izolirane populacije s vremenom će razviti stanje recipročne monofilije koja je rezultat kontinuiranog mijenjanja linija razmnožavanjem. Veličina genealoške diferencijacije u pozitivnoj je korelaciji s vremenom izolacije.

1.5 Metoda DNA barkodiranja

Metoda DNA barkodiranja je pouzdan i brz način identifikacije bioloških uzoraka, a temelji se na raznolikosti kratkih, standardiziranih regija genoma. Predložena je 2003. godine kao dodatak rutinskoj morfološkoj identifikaciji vrsta životinja, biljaka, gljiva, protista i prokariota (Hebert i sur., 2003a), a danas ima sve češću uporabu u stjecanju primarnog uvida u bioraznolikost, na lokalnoj i globalnoj razini. Odabir prikladnog biljega ključan je element u primjeni metode DNA barkodiranja te on mora biti dovoljno vrsno specifičan. Ako je interspecifična (međuvrsna) varijabilnost veća od intraspecifične (unutarvrsne) varijabilnosti postoji „barkod praznina“ (eng. *barcoding gap*), što potvrđuje da je gen dovoljno specifičan za pojedinu vrstu i da je metoda primjenjiva za tu vrstu, odnosno skupinu organizama. Uz to, duljina regije gena koja se nastoji umnožiti mora biti umjerene duljine kako bi se osigurala veća uspješnost umnažanja fragmenta (Trivedi i sur., 2018). Za identifikaciju uzoraka različitih skupina životinjskih organizama, kao i za utvrđivanje prisutnosti kriptičnih i još neopisanih vrsta, koristi se fragment mitohondrijskog gena za podjedinicu I citokrom c oksidaze (*COI*) dužine 658 pb (Hebert i sur., 2003a).

Analizirana sekvencija pojedinog organizma naziva se “DNA barkod“. Kako bi se nepoznati fragment DNA mogao povezati s pripadajućom vrstom, potrebno je osnovati bazu u kojoj su DNA barkodovi pridruženi morfološki determiniranim jedinkama. Takva baza uspostavljena je 2007. godine pod nazivom BOLD baza (eng. *Barcode of Life Data System*). Baza BOLD predstavlja bioinformatičku platformu koja sadrži repozitorij jedinki i zapisa DNA sljedova svih studija u kojima se primjenjuje metoda DNA barkodiranja (Ratnasingham i Hebert, 2007). Uz bazu BOLD, baza koja pohranjuje sekvencije i ostalih gena (ne isključivo *COI*) naziva se GenBank, a osnovana je 1982. godine (Benson i sur., 2012).

Potreba za pouzdanijim metodama identifikacije životinjskih vrsta pojavljuje se zbog 4 velika ograničenja morfološke determinacije, a to su: fenotipska i genetska plastičnost, problem kriptičnih vrsta, mala primjenjivost morfoloških ključeva i nedovoljan broj taksonomskih stručnjaka za određene skupine organizama. Fenotipska plastičnost i genetska varijabilnost mogu dovesti do pogrešnog prepoznavanja vrsta, rezultirajući povećanim brojem vrsta na nekom staništu čime se dobiva pogrešan uvid u bioraznolikost. Kriptične vrste karakterizira velika genetska raznolikost, koja nije popraćena razvojem morfoloških obilježja pa se razlike među vrstama, tj. jedinkama otežano, ili čak gotovo uopće ne uočavaju. Brojni morfološki

ključevi primjenjivi su za određeni životni stadij ili spol te je za točnu i preciznu determinaciju potrebna visoka razina stručnosti koja se dostiže teško i dugotrajno (Hebert i sur. 2003a). Međutim, da bi metoda DNA barkodiranja bila primjenjiva potrebno je uspostaviti povjerljivu i točnu bazu sekvencija za određenu skupinu organizama koja omogućuje povezivanje nepoznatih sekvencija s onima koje su pridodane pojedinim morfološki determiniranim vrstama (tzv. „reverzna taksonomija“), čime je ponovno naglašena važnost klasične taksonomije i nemogućnost zamjene iste molekularnim metodama (Hebert i sur., 2003b).

1.5.1 Podjedinica I citokrom c oksidaze (*COI*)

Mitochondriji su organeli u aerobnim eukariotskim stanicama koji imaju ključnu ulogu u procesima staničnog disanja, apoptoze i starenja. Unutar matriksa mitohondrija, uz ribosome, molekule RNA i proteine, nalazi se mitohondrijska DNA (mtDNA). Mitohondrijska DNA je kružna dvolančana deoksiribonukleinska kiselina koja se replicira neovisno o samoj stanici. Veličine je između 15 000 i 20 000 pb i sastoji se od kodirajuće i nekodirajuće kontrolne regije. Za razliku od jezgrine DNA, ne sadrži introne ni repetitivne sljedove, u njoj ne dolazi do homologne rekombinacije te nije omotana oko histona (Gasparre i Porcelli, 2020). U kodirajućem dijelu nalazi se 37 gena od kojih 13 kodiraju za proteinske podjedinice enzima oksidativne fosforilacije, 22 kodiraju za molekule tRNA potrebne za translaciju proteina kodiranih mitohondrijskim genomom i 2 kodiraju za molekule rRNA koje čine podjedinice mitohondrijskog ribosoma (Boore, 1999). Jedan od 13 proteina kodiranih mitohondrijskim genomom, proteinska podjedinica I citokrom c oksidaze (*COI*), sudjeluje u lancu prijenosa elektrona na unutarnjoj membrani mitohondrija kao terminalni katalizator. Vrlo je dobro istražena na biokemijskoj razini te su njena veličina i struktura očuvani kod svih aerobnih organizama (Lunt i sur., 1996). Značajke i prednosti gena *COI* za filogenetska istraživanja su višestruke: umnažanje za gotovo sve skupine organizama je moguće upotrebom univerzalnih robusnih početnica, a jedinstvenost slijeda DNA (nema introna) i manjak insercija i delecija (za razliku od mitohondrijskih gena za rRNA) omogućavaju jednostavnije bioinformatičke analize. Fenomen kolebljujuće baze, zbog kojeg nukleotidi na trećem mjestu u kodonu imaju veliki potencijal supstitucija, omogućava tri puta veću stopu molekularne evolucije u odnosu na mitohondrijske gene za rRNA. Ova stopa dovoljno je visoka da omogućava razlikovanje, ne samo vrsta, već i divergentnih linija unutar pojedine vrste (Herbert i sur., 2003b).

Vrste, odnosno njihovi sljedovi DNA, međusobno se uspoređuju računanjem nekorigiranih udvojenih genskih (PD, p-udaljenost, eng. *p-distance*, *uncorrected pairwise distance*) i korigiranih genskih udaljenosti (K2P, eng. *Kimura 2-parameter genetic distance*). Genske udaljenosti predstavljaju udio nukleotidnih mjesta na kojima se sekvencije razlikuju, a računaju se kao količnik broja razlika s ukupnim brojem nukleotida u sekvencijama koje se uspoređuju (Nei i Kumar, 2000).

Unutarvrstne genetske udaljenosti najčešće su manje od 1% za većinu skupina (Hebert i sur., 2003b; Zhou i sur., 2010), a u svrhu razgraničavanja vrsta unutar carstva životinja za 5' *COI* regiju uzima se standardna, ali vrlo konzervativna, vrijednost od 2% međuvrstne genske udaljenosti (Hebert i sur., 2003b; Monaghan i sur., 2005; Schmidt i sur., 2015; Zhou i sur., 2010).

1.6 EPT skupina

Redovi vodencvjetova (Ephemeroptera), obalčara (Plecoptera) i tulara (Trichoptera) zajedno čine EPT skupinu organizama. Pripadnici EPT skupine zbog svoje se osjetljivosti na onečišćenja smatraju jednim od najboljih bioindikatora kvalitete vode i zagađenja slatkovodnih ekosustava (Akamagwuna i sur., 2019).

Vodena staništa koja nastanjuju, barem u dijelu svog životnog ciklusa, pod negativnim su antropogenim utjecajem, poput industrijskog zagađenja i preusmjerenja vode u poljoprivredne i gradske namjene, pa sve do kontaminacija iz kanalizacije (Holzenthall i sur., 2007), što za posljedicu ima nutritivno obogaćenje slatkovodnih ekosustava. Povećane količine nutrijenata uzrokuju povećanje biomase ili abundancije vodenih kukaca, a mogu uzrokovati i izumiranje najosjetljivijih vrsta. Među slatkovodnim beskralježnjacima najviše je ugrožena upravo EPT skupina organizama (Poulton i sur., 2015).

1.6.1 Metoda DNA barkodiranja u istraživanjima faune obalčara i tulara u Hrvatskoj

Metoda DNA barkodiranja u istraživanjima faune tulara u Hrvatskoj počinje se primjenjivati 2013. godine opisom nove vrste tulara *Chaetopteryx buhari* Kučinić, Szivak i Delić, 2013 (Kučinić i sur., 2013), a kasnije se primjenjuje u istraživanjima bioraznolikosti pojedinih regija Hrvatske (Kučinić i sur., 2016, 2020; Čukušić i sur., 2017). Od 2019. godine

metoda se primjenjuje u istraživanjima bioraznolikosti faune obalčara Hrvatske (Hlebec i sur., 2019, 2021, 2022). Posljednji red EPT skupine, vodencvjetovi, tek su sa nekoliko uzoraka uključeni u istraživanje bioraznolikosti primjenom molekularnih metoda na području Hrvatske. Zbog malog broja javno dostupnih sekvencija vodencvjetova s područja Hrvatske, što onemogućava komparativnu analizu, navedeni je red EPT skupine izuzet iz molekularno-filogenetskih analiza provedenih u okviru ovog istraživanja.

Baza BOLD (pristup: 17. lipnja 2022.) sadržava 17536 sekvencija obalčara i 64151 sekvencija tulara. Među obalčarima najzastupljenije porodice su Nemouridae (3798 sekvencije) i Perlidae (2664 sekvencije), a među tularima Hydropsychidae (14014 sekvencije) i Limnephilidae (10603 sekvencije). Izrazito velika količina sekvencija za obje skupine, na globalnoj i lokalnoj skali, omogućava primjenu metode DNA barkodiranja i njenu pouzdanost u identifikaciji uzoraka.

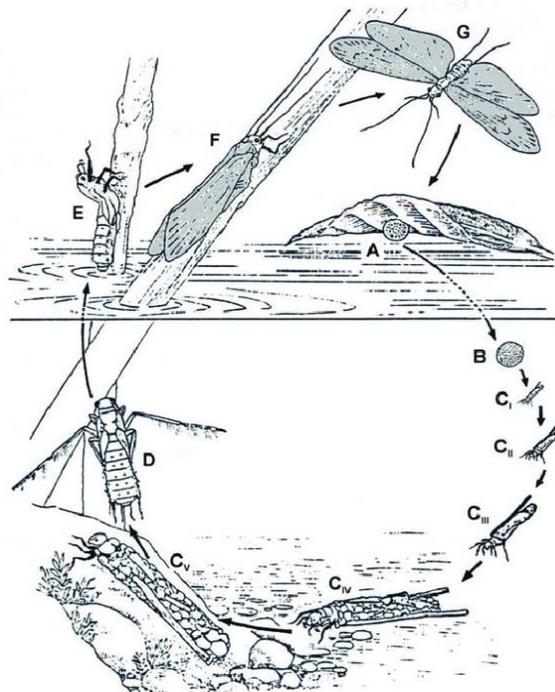
S područja Republike Hrvatske do sada su unesene 573 sekvencije tulara (od kojih je 553 determinirano do razine vrste) i 341 sekvencija obalčara (od kojih je 323 determinirano do razine vrste). Najzastupljenija porodica tulara je Limnephilidae sa 167 upisanih sekvencija, a najzastupljenija porodica obalčara je Perlodidae s 95 upisanih sekvencija. Prema objavljenim sekvencijama u bazama, fauna Hrvatske broji 183 vrsta tulara i 68 vrsta obalčara.

1.7 Osnovne značajke reda tulari (Trichoptera)

Red Trichoptera, tulari, jedni su od najvećih i najraznovrsnijih skupina vodenih kukaca, a latinsko su ime dobili po dlakavim krilima odraslih jedinki (Holzenthal i sur., 2007). Do sada je opisano 16000 vrsta svrstanih u preko 618 rodova i 51 porodicu. Nastanjuju sve kontinente, osim Antarktike (Morse i sur., 2019).

Tulari su holometabolni kukci čija su jajašca, ličinke i kukuljice vezani uz slatkovodne ekosustave (Slika 2). Potpunom preobrazbom ličinke se kroz stadij kukuljice preobražavaju u aeralne i terestričke odrasle jedinke. Većina tulara ima jednu generaciju godišnje (univoltne vrste), a manji broj vrsta su vrste s višegodišnjim životnim ciklusom (semivoltne vrste) i vrste koje godišnje imaju dvije ili više generacija (multivoltne vrste). Ženke polažu 30 – 1000 jaja u sloj matriksa, tj. masu prekrivenu ljepljivim zaštitnim polisaharidom (Morse i sur., 2019).

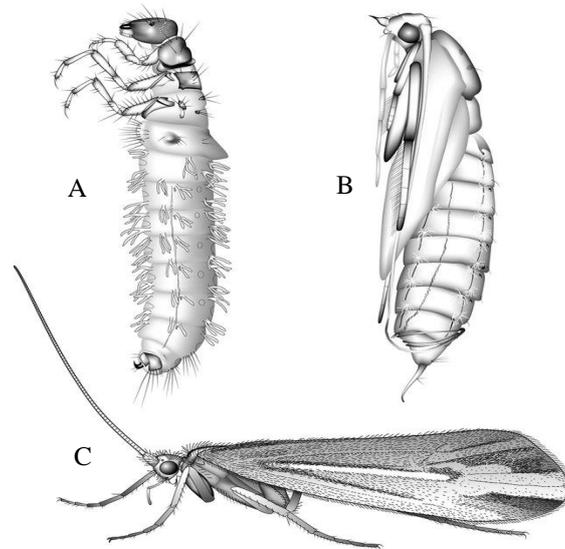
Iz jaja se izliježu ličinke (Slike 2 i 3.A) koje se tijekom rasta i razvoja nekoliko puta presvlače te tulari većinu svog životnog ciklusa provedu u tom stadiju (Morse i sur., 2019). Tijela ličinki i imaga podijeljena su na tri cjeline: glavu (*caput*), prsa (*torax*) i zadak (*abdomen*). Glava ličinki je hitinizirana, dok se hitiniziranost prsnih kolutića razlikuje ovisi o porodici. Zadak ličinki sadrži škrge i završava analnom pandžicom koja služi za hvatanje i pridržavanje za lišće, granje ili kamenje (Hickin, 1967). Ličinke pretežno žive u vodi gdje se hrane detritusom, biljkama ili grabežom, a usni organi preobraženi su za grizenje. Donjousne žlijezde ličinaka su predljljive. Neke ličinke su slobodnoplivajuće, dok druge pomoću izlučevina donjousnih žlijezdi konstruiraju tuljce ili prijenosne kućice u kojima su upletene tvari s dna vode, poput kamenčića, grančica i pijeska (Matoničkin i sur., 1999). Razlog stvaranja tuljca najvjerojatnije leži u obrani od predatora i efikasnijem disanju (Wiggins, 2004). Stvaranjem stacionarnih kućica ili modifikacijom prijenosnih kućica, ličinke se pripremaju za stadij kukuljice (Slika 3.B). Nekoliko tjedana nakon što se zakukulje, iz kukuljice izlaze odrasli tulari (Morse i sur., 2019). Ličinke se morfološki izrazito razlikuju od odraslih tulara pa je jedan od većih izazova u sistematici tulara povezivanje ova dva stadija. Ličinke brojnih vrsta nisu uključene u determinacijske ključeve, za mnoge vrste ličinke nisu opisane ni zabilježene terenskim istraživanjima (Wiggins, 2004; Hickin, 1967), što otežava njihovu identifikaciju.



Slika 2. Shematski prikaz životnog ciklusa (potpune preobrazbe) tulara. A i B - lijanje jaja, C_{I-V} - ličinka u različitim stadijima tijekom presvlačenja, D i E - kukuljica, F i G - odrasli tular. Preuzeto iz Tszedel i sur., 2009.

Veličina odraslih jedinki tulara (Slika 3.C) varira između 2 i 45 mm. Na glavi se nalaze sastavljene oči, a u pojedinim je rodovima moguće prisustvo jednostavnih očiju, ocela, što čini karakteristiku bitnu prilikom određivanja porodica i rodova (Malicky, 2004). Specifičnost ovog reda poseban je usni aparat haustelum. Nastao je spajanjem poždrijelnog žlijeba (*hypopharynx*) s vršnim dijelom donje usne (*labium*) (Holzenthal i sur., 2007). Broj članaka u gornjočeljusnim pipalima kreće se od tri do pet i bitan je prilikom determinacije odraslih jedinki (Malicky, 2004). Tijela imaga tamnijih su boja i prekrivena su dlakama. Dva para krila i tri para nogu za hodanje nalaze se na prsima. Oba para krila za vrijeme mirovanja jedinke drže nad zatkom prislonjena poput krova. Prednja krila veća su od stražnjih, a stražnja ponekad mogu i izostati (Matoničkin i sur., 1999). Na nogama tulara nalaze se tibijalni trnovi. Njihov broj može varirati između 0 i 7 te predstavljaju važnu determinacijsku značajku prilikom svrstavanja u više taksonomske kategorije. Zadnja tri od 11 kolutića zatka tvore genitalni aparat koji je specifičan za pojedinu vrstu i označava glavnu determinacijsku značajku. Međutim, kako ženski genitalni aparat sadržava manje razlikovnih značajki, na temelju ženki često je nemoguće ustanoviti pripadnost vrsti. Parni gonopodiji nalaze se na 9. kolutiću zatka mužjaka i služe za pridržavanje ženke prilikom kopulacije. Muški kopulacijski organ (*phallus*) smješten je ispod 10. kolutića i sastoji se od pokretnog bazalnog dijela (*phallobasis*) i završnog članka (*aedeagus*). Za primanje

phallusa i spermalnog sadržaja ženke imaju kompleksnu i vrsno-specifičnu unutrašnju strukturu genitalnog aparata (Malicky, 2004). Odrasle jedinke obitavaju u blizini vode i često sjedaju na okolno grmlje, granje i lišće (Matoničkin i sur., 1999).



Slika 3. Shematski prikaz morfološke građe različitih životnih stadija tulara. **A** - stadij ličinke, *Halesochila taylori* (Limnephilidae), **B** - stadij kukuljice, *Ceraclea* sp. (Leptoceridae), **C** - odrasli tular, *Hesperophylax designatus* (Limnephilidae). Preuzeto i prilagođeno prema Holzenthal i sur., 2007.

1.8 Osnovne značajke reda obalčari (Plecoptera)

U red Plecoptera, obalčari, danas se ubraja 3700 vrsta, svrstanih u 286 rodova i 17 porodica. Kao i tulari, nastanjuju sve kontinente osim Antarktike (DeWalt i sur., 2019).

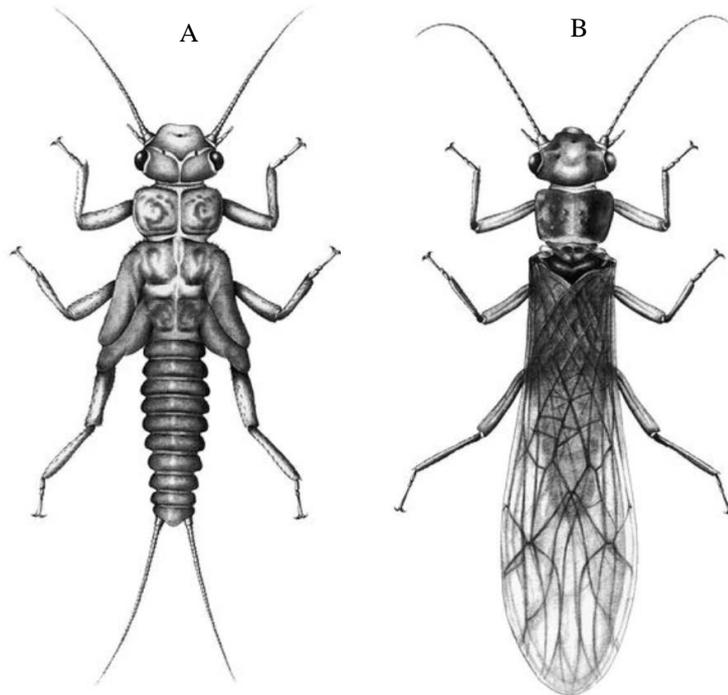
Obalčari su hemimetabolni kukci čije ličinke nepotpunom preobrazbom dostižu odrasli stadij (Glime, 2015). Kod većine vrsta, životni se ciklus završava u jednoj sezoni, a samo kod nekih, najčešće većih vrsta, može trajati i više godina. Ličinački stadij provode u vodi, a odrasle jedinke su terestričke (Popijač, 2007).

Nakon oplodnje, ženka polaže jaja leteći iznad vode i ispuštajući jaja iz zraka ili dotičući površinu vode uz "ispiranje" jajašaca sa zatka (eng. *skimming*) (Grimaldi i Engel, 2005). Jajašaca može biti do tisuću te su omotana sluzi u obliku grudice kako bi bolje prijanjala uz podlogu i oduprla se potencijalnom otplavlivanju. Prve ličinke izliježu se nakon dva do tri tjedna, uz iznimku nekih vrsta koje prolaze dijapauzu tijekom sušne sezone te se izliježu tek kada uvjeti postanu dovoljno povoljni. Jedinke mogu provesti od nekoliko mjeseci do više godina u ličinačkom stadiju te se do faze emergiranja i odraslog stadija presvlače 12 do 22 puta (Popijač, 2007). Nakon potpunog rasta i razvoja, ličinka izlazi iz vode, posljednji put se presvlači, odbacuje ličinački egzoskelet i izlazi kao odrasla jedinka (Bouchard, 2004).

Ličinke su prepoznatljive po tome što na kraju zatka imaju dva duga, segmentirana začana privjeska (*cerci*) i na završetku svake noge po dvije pandžice (Slika 4.A). Odrasle ličinke imaju karakterističan oblik drugog i trećeg prsnog segmenta (eng. *wing pads*) te dišu škrgama. Na temelju rasporeda škrga, oblika prsnih segmenata i oblika donje usne moguća je identifikacija ličinki do razine porodice (Bouchard, 2004; Popijač, 2004). Prema načinu prehrane, ličinke se svrstavaju u detritivore, usitnjivače, strugače ili grabežljivce (Popijač, 2007).

Odrasle jedinke prepoznatljive su po dugačkim nitastim antenama i specifičnom načinu polaganja krila duž tijela (Slika 4.B). Duguljasto, spljošteno i mekano tijelo ličinki i odraslih jedinki podijeljeno je na glavu (*caput*), trup (*torax*) i zadak (*abdomen*). Većina odraslih obalčara ima dva para krila, no poznate su i vrste bez ili s jako reduciranim krilima, osobito na većim nadmorskim visinama i kod mužjaka. Na glavi imaju usne organe za grizenje, tri jednostavna oka (ocele) i male sastavljene oči. Na trupu imaju noge za hodanje koje se sastoje od tri članka na čijim su krajevima po dvije pandžice, a zadak od 10 članaka završava s dva

dugačka začana privjeska (*cerci*). Odrasli obalčari uglavnom su tamnih boja, obojeni sivo ili smeđe, a veličine su najčešće do deset milimetara ili, u rjeđim slučajevima, do nekoliko centimetara (rod *Perla*). U ženki, leglica (*ovipositor*) je reducirana te je gotovo i nema (Popijač, 2007; Matoničkin, 1999; Grimaldi i Engel, 2005). Odrasle jedinke hrane se većinom algama, gljivama i mahovinama. Predatorske vrste obalčara se u odraslom stadiju najčešće uopće ne hrane, već žive od zaliha koje su nakupile u stadiju vodene ličinke (Popijač, 2007).



Slika 4. Shematski prikaz morfološke građe različitenih životnih stadija obalčara. A - stadij ličinke, *Nemoura* sp. (Nemouridae), B - odrasli obalčar, *Nemoura* sp. (Nemouridae). Preuzeto i prilagođeno iz Fochetti i Tierno de Figueroa, 2007.

Najčešće žive u hladnim i čistim tekućicama s visokom koncentracijom otopljenog kisika te s kamenitom podlogom, a manji broj vrsta živi na pijesku. Danju se zadržavaju u blizini vode, najčešće među grmljem i drvećem te skriveni u vlažnoj travi ili ispod kamenja. U pravilu su slabi letači. Zbog svoje slabe sposobnosti letenja imaju visoku stopu endemizma što ih određuje kao pogodne modele u biogeografskim istraživanjima, te su jedna od najugroženijih skupina kukaca u svijetu (Fochetti i de Figueroa, 2006; Popijač, 2007).

1.9 Područje istraživanja

Medvednica je gora na sjeveru Hrvatske smještena sjeverno od grada Zagreba. Prvi puta je zaštićena 1963. godine kao rezervat šumske vegetacije, a Parkom prirode proglašena je 1981. godine. Područje Parka danas se prostire na površini od 17938 ha koje čini područje između 120 i 1035 metara nadmorske visine. Klimatski, Medvednica ima obilježje kontinentalnog oborinskog režima s maksimumom oborina u toplom dijelu godine.

Na području Parka zabilježeno je 70 potoka i registrirano 200 izvora, što područje čini posebno pogodnim za istraživanje faune slatkovodnih ekosustava. Potoci Medvednice većinom su izrazito brdskog tipa. Karakterizira ih strm gornji tok, dok je donji položen. Zahvaljujući brojnim izvorima, vodotoci južne padine bogati su vodom cijele godine. Glavnina mnogobrojnih izvora Medvednice izvire iznad 750 metara nadmorske visine i skromnijeg je kapaciteta. Fauna potoka obiluje ugroženim i endemičnim vrstama, a uz potoke se razvija tipična obalna vegetacija. Potoke ugrožavaju onečišćenja fekalnim i drugim otpadnim vodama, odlaganje krupnog otpada, izgradnja u neposrednoj blizini i agresivne hidrotehničke mjere kojima se mijenja njihov izgled (Harmel i sur., 2015; Bakarić i sur., 2021; Senta Marić i sur., 2011).

2. Hipoteza, opći i specifični ciljevi rada

2.1 Hipoteza

Park prirode Medvednica stanište je vrsta iz redova tulara (Trichoptera) i obalčara (Plecoptera) koje karakterizira velika genetska raznolikost na unutarvrstnoj razini i na razini populacija.

2.2 Opći cilj rada

Opći cilj rada je primjenom metoda DNA barkodiranja i morfološke determinacije uzoraka iz redova tulara (Trichoptera) i obalčara (Plecoptera) doprinijeti poznavanju faunistike Parka prirode Medvednica te dobiti uvid u genetsku i morfološku raznolikost tog područja. Također, dodatnim filogenetičkim i filogeografskim analizama, nastojat će se potvrditi genetska odvojenost populacija prikupljenih na području Parka prirode od ostalih populacija šire rasprostranjenih vrsta.

2.3 Specifični ciljevi rada

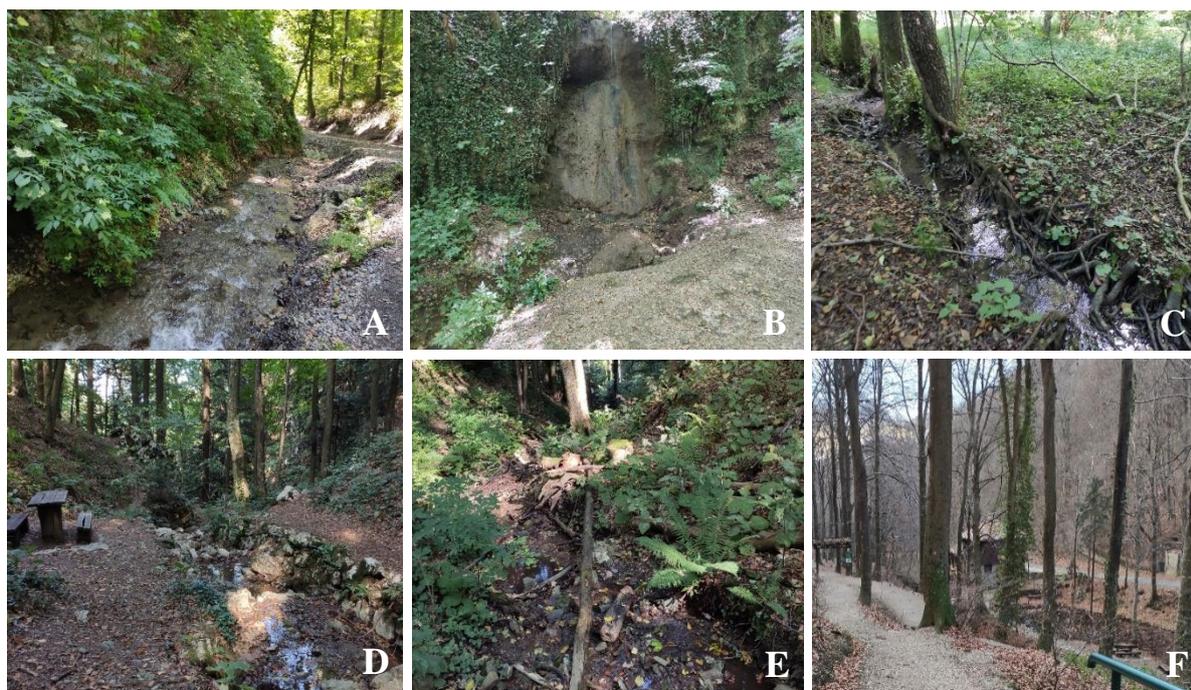
Opći cilj rada ostvarit će se kroz nekoliko specifičnih ciljeva:

1. prikupljanje jedinki iz redova tulara i obalčara na odabranim lokalitetima Parka prirode Medvednica,
2. determinacija jedinki primjenom morfološke determinacije i metode DNA barkodiranja,
3. utvrđivanje filogenetičkih i filogeografskih odnosa unutar populacija odabranih vrsta čiji se areal rasprostranjenosti proteže Europom,
4. obogaćivanje baza BOLD i GenBank upisom dobivenih sekvencija.

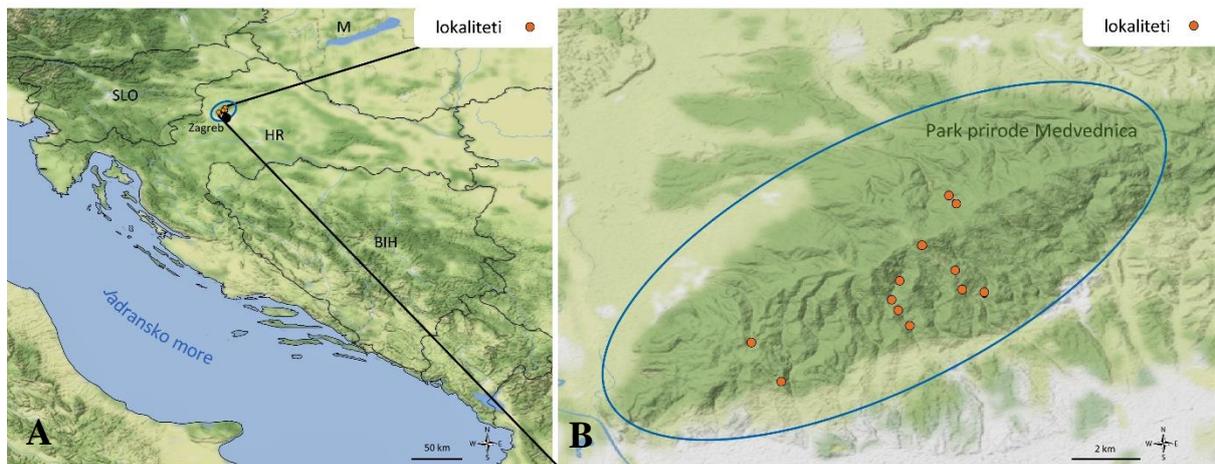
3. Materijali i metode

3.1 Uzorkovanje jedinki

Uzorci su prikupljeni na 12 lokacija na području Parka prirode Medvednica u periodu od lipnja do listopada 2021. te zimi u periodu od prosinca 2021. do ožujka 2022. (Tablica P1 u prilogu, Slika 5, Slika 6) pod dozvolom Ministarstva gospodarstva i održivog razvoja (UP/I-612-07/21-48/73). Na svim lokalitetima uzorci su prikupljeni i ljeti i zimi osim na lokaciji 12 (vrh Kraljevca, kraj ceste), na kojoj su uzorci sakupljeni samo zimi. Odrasle jedinke kukaca sakupljane su pomoću entomološke mrežice, a ličinke pincetom oko potoka ili okretanjem kamenja i granja u potocima (Slika 7.A i 7.B). Noću, odrasle jedinke sakupljane su uz pomoć UV-lampe (Slika 7.C). Trajanje uzorkovanja na svakom lokalitetu iznosilo je između 30 minuta i sat vremena. Sakupljene jedinke stavljene su u označene bočice s 96%-tnim etanolom te, nakon rada na terenu, pohranjene u hladnjaku na +8°C. Prikupljeni materijal dio je privatne zbirke Medvednica Kermek i Pischiutta, 2022.



Slika 5. Fotografije dijela lokaliteta na kojima je provedeno uzorkovanje: **A** - lokacija 4, dno potoka Bliznec, **B** - lokacija 5, slap Ferendol, **C** - lokacija 6, Jambrišakovo vrelo, **D** - lokacija 10, dno Horvatovih stuba, **E** - lokacija 11, Jelenja voda, **F** - lokacija 3, Kraljičin zdenac.



Slika 6. Područje istraživanja: **A** - karta Hrvatske s označenim položajem Medvednice i lokalitetima, **B** - karta Parka prirode Medvednica s označenim lokalitetima.



Slika 7. Terensko istraživanje: **A, B** - sakupljanje okretanjem kamenja za vrijeme dana, **C** - sakupljanje pomoću UV-lampe tijekom noći.

3.2 Morfološka determinacija vrsta

Morfološka determinacija imaga tulara izvršena je korištenjem lupe ZEISS SteREO DiscoveryV.20 i ključa za determinaciju *Atlas of European Trichoptera* (Malicky, 2004). Za određivanje porodica i rodova utvrđen je broj tibijalnih četina na svakom paru nogu, broj članaka u donjočeljusnom pipalu te prisutnost ocela. Nakon određivanja roda, vrsta je određena pregledom genitalnog aparata (Malicky, 2004).

Morfološka determinacija imaga obalčara izvršena je korištenjem lupe ZEISS SteREO DiscoveryV.20 i identifikacijskih ključeva. Kao najpouzdanije karakteristike za razlikovanje vrsta korišteni su uzorci obojanosti glave i pronotuma te genitalni aparat kod mužjaka i ženki (Illies, 1955; Kačanski i Zwick, 1970; Raušer, 1980; Ravizza, 2002; Sivec i Stark, 2002; Graf i Schmidt-Kloiber, 2003; Zwick, 2004; Murányi, 2011). Dodatna provjera determinacije izvršena je u laboratoriju Prirodoslovnog muzeja Slovenije uz mentorstvo dr. Ignaca Siveca.

3.3 Metoda DNA barkodiranja

Postupci uključeni u metodu DNA barkodiranja su:

1. izolacija ukupne genomske DNA iz odabranih uzoraka,
2. umnažanje mitohondrijskog gena za podjedinicu I citokrom c oksidaze (*COI*) lančanom reakcijom polimeraze korištenjem specifičnih početnica,
3. elektroforetsko razdvajanje dobivenih fragmenata DNA,
4. pročišćavanje i sekvenciranje fragmenata DNA,
5. računalne analize nukleotidnih sekvencija.

Nakon sekvenciranja DNA i bioinformatičke obrade dobivenih sekvencija sve sekvencije i ostale informacije o jedinkama unesene su u baze podataka BOLD i GenBank.

3.3.1 Izolacija ukupne genomske DNA iz odabranih uzoraka

Za izolaciju ukupne genomske DNA korišten je kit za izolaciju *GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit* proizvođača SIGMA-ALDRICH prema uputama proizvođača.

Ukupna genomska DNA izolirana je iz tkiva 1-3 noge ovisno o veličini jedinki (kod manjih vrsta korištena je veća količina tkiva). Ukupna genomska DNA eluirana je u 60 µL pufera.

3.3.2 Umnažanje mitohondrijskog gena za podjedinicu I citokrom c oksidaze (*COI*) lančanom reakcijom polimeraze korištenjem specifičnih početnica

Za umnažanje DNA barkod regije, odnosno podjedinice citokrom c oksidaze I (*COI*) duljine 658 pb, korištena je metoda lančane reakcije polimerazom (PCR, eng. *Polymerase Chain Reaction*) koja predstavlja brzu i specifičnu metodu umnažanja izabranih fragmenata DNA u uvjetima *in vitro*. Reakcija PCR odvija se u ciklusima od kojih svaki sadrži 3 glavna koraka: denaturacija kalupa DNA, specifično vezanje oligonukleotidnih početnica na jednolančanu DNA te sinteza komplementarnih lanaca DNA pomoću enzima DNA-polimeraze.

U svrhu uspješnog umnažanja fragmenta gena *COI* potrebno je odabrati odgovarajuće početnice. Početnice su kratke oligonukleotidne sekvencije komplementarne specifično određenom slijedu DNA i označavaju mjesto početka sinteze novog lanca.

U reakciji PCR korištene su univerzalne početnice LCO-1490 i HCO-2198 (Folmer i sur., 1994). Početnica LCO-1490 korištena je kao “prednja” (eng. *forward*) početnica, a HCO-2198 kao “obrnuta” (eng. *reverse*) početnica (Tablica 1).

Tablica 1. Univerzalne početnice korištene u PCR reakciji za umnažanje mitohondrijskog gena za podjedinicu I citokrom oksidaze (*COI*).

Gen	Početnica	Sekvencija 5' – 3'	Literatura
<i>COI</i>	LCO-1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Folmer i sur., 1994
	HCO-2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA	

Reakcijska smjesa sadržavala je 2 μL izolirane genomske DNA i 18 μL reakcijske smjese sastava:

- 2 μL pufera *DreamTaq Green Buffer* (10X), Thermo Scientific,
- 0,4 μL otopine nukleotida dNTP Mix (10mM), Promega,
- 0,8 μL početnice LCO-1490 (10 pM),
- 0,8 μL HCO-2198 (10 pM),
- 0,1 μL otopine DNA polimeraze *DreamTaq DNA Polymerase* (5 U), Thermo Scientific,
- 13,9 μL destilirane vode.

Lančana reakcija polimerazom odvijala se pri navedenim uvjetima:

1. Početna denaturacija: 95 °C, 2 minute,
2. Denaturacija: 95 °C, 30 sekundi,
3. Sparivanje početnica (eng. *annealing*): 50 °C, 30 sekundi,
4. Produljivanje lanca DNA: 72 °C, 1 minuta,
5. 35 ciklusa ponavljanja od koraka 2. do koraka 4.,
6. Završno produljivanje lanca DNA: 72 °C, 10 minuta,
7. Hlađenje: 4 °C, ∞ .

3.3.3. Elektroforetsko razdvajanje dobivenih fragmenata DNA

Uspješnost PCR reakcije provjerena je pomoću elektroforeze u agaroznom gelu. Elektroforeza je metoda koja omogućuje razdvajanje molekula DNA na gelu na temelju njihove duljine pod utjecajem istosmjerne električne struje. Budući da su molekule DNA negativno nabijene, pod utjecajem električnog polja, kreću se od negativno nabijene katode prema pozitivno nabijenoj anodi. Prije provođenja elektroforeze pripremljen je 1%-tni gel agaroze otapanjem 1,6 g agaroze u 160 mL 1% TBE pufera (tris-borat-etilendiamintetraoctena kiselina) uz dodatak 7 μL boje za vizualizaciju DNA (*Midori Green Advance DNA Stain*). Agarozni gel je položen u uređaj za elektroforezu te je u svaku jažicu gela stavljeno 2 μL uzorka. Elektroforeza je provedena pri 120 V i 400 mA u trajanju 20 minuta.

3.3.4. Pročišćavanje i sekvenciranje fragmenata DNA

Nakon PCR reakcije i provjere uspješnosti, uzorcima koji su pokazivali vrpce većeg intenziteta na elektroforezi dodano je 2 μL otopine za pročišćavanje (eng. *purification*) sastava:

- 0,05 μL otopine *Exonuclease I* (20000 U/mL), New England Biolabs Inc.,
- 0,1 μL otopine *Antarctic Phosphatase* (5000 U/mL), New England Biolabs Inc.,
- 1,85 μL destilirane vode.

Purifikacija se provedena po protokolu: 1 sat na temperaturi 37 °C i 20 minuta pri 80 °C. Pročišćeni PCR produkti poslani su na obostrano sekvenciranje u servis *Macrogen Inc.* (Amsterdam, Nizozemska).

3.3.5 Računalne analize nukleotidnih sekvencija

Rezultati sekvenciranja dobiveni od servisa *Macrogen Inc.* analizirani su i uređeni programom *Bioedit 7.2.6.1.* (Hall, 1999). Prilikom uređivanja dobivenih sekvencija, uklonjene su početnice te loše očitani počeci i krajevi. Točnost očitavanja sekvenciranih nukleotida provjerena je pregledavanjem kromatograma pojedinih sekvenci. Krivo očitane baze ručno su ispravljene. Prisutnost stop kodona u svim sekvencijama provjerena je programom *Mesquite* (Maddison i Maddison, 2021). Sekvencije loše kvalitete izostavljene su iz daljnjih analiza. Nakon ispravljanja pogrešaka i uklanjanja početnica sekvencije su sravnjene u oba smjera za svaki uzorak (smjer 5' - 3' i smjer 3' - 5') pomoću *ClustalW* višestrukog sravnjivanja (Larkin i sur., 2007). Pomoću alata *BOLD Identification Engine* na stranici baze podataka *BOLD* (www.boldsystems.org) uzorci su određeni do razine vrste na temelju sličnosti DNA barkod sekvence uzorka i već upisanih sekvencija.

3.4 Filogenetičke i filogeografske analize

Za filogenetičke i filogeografske analize odabrane su vrste obalčara i tulara širokog areala rasprostranjenosti te većeg broja postojećih sljedova dostupnih u bazama podataka (*BOLD* i *GenBank*), kako bi usporedba s eksperimentalno dobivenim sekvencijama bila pouzdanija.

U svrhu usporedbe eksperimentalno dobivenih sekvencija s već postojećim podacima, iz baza podataka BOLD i GenBank preuzeti su svi sljedovi gena *COI* navedenih vrsta. Preuzeti sljedovi uređeni su u programu MEGA 11 (Tamura i sur., 2021) u kojemu su sve sekvencije sravnjene pomoću ClustalW višestrukog sravnjivanja, nakon čega su one s manjom duljinom od 658 pb uklonjene. Prisutnost stop kodona u svim sekvencijama ponovno je provjerena programom Mesquite te su sljedovi s prisutnim stop kodonima uklonjeni.

Nakon uređivanja i sravnjivanja svih sljedova utvrđeni su haplotipovi za svaku vrstu odabranu za daljnje analize. Sekvencije su spojene u jedinstvene haplotipove pomoću opcije „DNA to haplotype collapser and converter“ online servisa FaBox v.1.61 (Villesen, 2007).

Filogenetičke analize provedene su za sve navedene vrste korištenjem metode najveće vjerojatnosti (ML, eng. *maximum likelihood*) u programu RaxML-HPC v.8 on XSEDE (Stamatakis, 2014) na online servisu CIPRES (Miller i sur., 2010). Podrška grananja unutar stabla prikazana je pomoću vrijednosti *bootstrap* korištenjem metode *Rapid bootstrapping* na temelju 1000 ponavljanja i prema modelu GTRGAMMA (eng. *General Time Reversible with gamma distribution*). Filogenetska stabla vizualizirana su i uređena u programu FigTree v.1.4.4. (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) te pomoću alata iTOL (Letunic i Bork, 2021).

Korištenjem različitih metoda za razgraničavanje vrsta (eng. *species delimitation methods*): ASAP (Puillandre i sur., 2020), ABGD (Puillandre i sur., 2012) i bPTP (Zhang, 2013) određene su grupe, tj. potencijalne vrste unutar preliminarne vrste (eng. *putative species*) na temelju genskih udaljenosti pomoću evolucijskih statističkih modela *Kimura (K80)*, *Simple Distance (p-distance)* i *Bayesian analysis (BA)*. Metoda ASAP kombinacijom analiza (vjerojatnost da je nova grupa ujedno i potencijalna nova vrsta te praćenjem udaljenosti između particija, eng. *barcode gap*) računa vrijednost „*asap-score*“ koja se koristi u rangiranju dobivenih rezultata, pri čemu je najvjerojatnijoj podjeli (eng. *partition*) dodijeljena najmanja vrijednost (Puillandre i sur., 2020). Osim navedenih, korištena je i dodatna metoda za utvrđivanje raznolikosti na razini vrste, BIN sustav (eng. *Barcode Indeks Number*) implementiran u BOLD bazi. Sustav BIN-ova je internetska okosnica koja algoritamski grupira sekvencije iz baze BOLD u zasebne skupine, tzv. operacijske taksonomske jedinice (eng. *OTU, operational taxonomic unit*) i za svaku grupu određenog OTU-a stvara pripadajući kod (Ratnasingham i Hebert, 2013). Unutarvrstne nekorrigirane odvojene genske udaljenosti (eng. *p-distance, uncorrected pairwise distance*, u ostatku teksta: „genska udaljenost“) izračunate su

za svaku odabranu vrstu pomoću programa MEGA 11 (Tamura i sur., 2021) i određene su vrijednosti najveće genske udaljenosti unutar iste vrste te intervali genske udaljenosti između grupa dobivenih različitim metodama za razgraničavanje vrsta.

Za prikaz odnosa i učestalosti pojave pojedinih haplotipova izrađene su TCS filogenetske mreže (Clement i sur., 2002) metodom statističke parsimonije (eng. *statistical parsimony*). Filogenetske mreže napravljene su u programu PopART (Leigh i Bryant, 2015). Distribucije haplotipova svake vrste prikazane su na kartama izrađenima u Cartopy paketu 0.19 u programskom jeziku Python.

4. Rezultati

Terenskim istraživanjima prikupljene su 64 jedinke tulara i 101 jedinka obalčara. Sve su prikupljene jedinke morfološkom analizom determinirane do viših taksonomskih kategorija te po mogućnosti do razine vrsta (Tablice P2 i P3, u prilogu). Prisustvo vrsta potvrđeno je metodom DNA barkodiranja te je dobiven DNA barkod 21 primjerka tulara i 25 primjeraka obalčara.

Jedinke iz reda tulara pronađene su na ukupno 6 od 12 posjećenih lokaliteta koji uključuju potoke Kraljevec, Bliznec i Jelenja voda. Najveći broj jedinki pronađen je na lokalitetima L7, 8 i 9 (potok Bliznec uz Leustekov put) noću uz korištenje UV-lampe. Najveći broj prikupljenih jedinki pripadaju rodovima *Hydropsyche* (25) i *Wormaldia* (24) čineći 39,1 %, odnosno 37,5 % od ukupnog broja prikupljenih tulara.

Morfološkom analizom do razine vrste nije bilo moguće determinirati 27 ženki tulara koje pripadaju rodovima *Hydropsyche*, *Sericostoma* i *Wormaldia*. Kako bi se odredilo o kojim vrstama se radi, trima ženkama rodova *Hydropsyche* i *Wormaldia* određen je DNA barkod. Fragment gena *COI* uzoraka roda *Sericostoma* nije uspješno umnožen, zbog čega su jedinke determinirane samo morfološkom analizom.

Jedinke tulara porodica Polycentropodidae i Ryacophilidae morfološkom analizom nisu mogle biti svrstane u nižu taksone, zbog čega su navedeni uzorci do razine vrste određeni metodom DNA barkodiranja.

Jedinke obalčara pronađene su na ukupno 8 od 12 posjećenih lokaliteta koji uključuju potoke Kraljevec, Bliznec, Družinec, Jelenja voda i Jambrišakovo vrelo. Najveći broj jedinki pronađen je uz potok Kraljevec na kamenju uz obalu. Najviše prikupljenih jedinki pripada rodu *Leuctra* (71) i vrsti *Leuctra braueri* (63) čineći 70,3 %, odnosno 62,4 % od ukupnog broja prikupljenih obalčara. Nalaz vrste *Leuctra braueri* predstavlja prvi nalaz ove vrste za faunu Hrvatske, a s obzirom na broj prikupljenih jedinki, populacija na Medvednici je vjerojatno ujedno i najveća populacija u Hrvatskoj. Jedinke *Leuctra nigra* i *Leuctra signifera* determinirane su samo klasičnom taksonomijom zbog neuspješne PCR reakcije.

Morfološkom analizom do razine vrste nije bilo moguće determinirati 11 ličinki obalčara koje pripadaju rodovima *Isoperla*, *Leuctra*, *Perla*, *Nemoura* i *Protonemura*. Dodatno, morfološkom analizom nije bilo moguće odrediti jedinku iz roda *Leuctra* (označena kao

DN71a). Jedinka pokazuje morfološku sličnost s vrstama *Leuctra signifera*, *Leuctra dalmoni* (Vincon i Muranyi, 2007), *Leuctra carpathica* (Kis, 1966) i *Leuctra prima* (Kempny, 1899), no precizna identifikacija do razine vrste je izostala zbog nedostatka komparativnog materijala u zbirkama Hrvatskog prirodoslovnog muzeja i Prirodoslovnog muzeja Slovenije. Za određivanje statusa vrste primijenjena je metoda DNA barkodiranja.

Metodom DNA barkodiranja ukupno je determinirano 13 vrsta tulara svrstanih u 7 porodica i 12 vrsta obalčara svrstanih u 5 porodica (Tablica P4, u prilogu). Vrste određene prema bazi BOLD u svim su se slučajevima podudarale s morfološki određenim vrstama. Sekvencije su unesene u bazu BOLD te su im dodijeljene BIN oznake. Unesene sekvencije svrstane su u 23 već postojeće BIN skupine unutar baze BOLD, a dvjema su dodijeljene nove BIN oznake (*Plectrocnemia conspersa*, *Limnephilus flavicornis*) (Tablica P5, u prilogu). U prikazima rezultata korišteni su terenski brojevi uzoraka, ujedno i DNA *voucher* kodovi, u formatu „DNbroj.“

Integrativnim pristupom (kombinacijom metoda DNA barkodiranja i klasične taksonomije) ukupno je utvrđeno 14 vrsta tulara i 14 vrsta obalčara na području Parka prirode Medvednica.

Kako bi se usporedila genetska odvojenost populacija različitih vrsta obalčara i tulara prikupljenih na području Parka prirode Medvednica s uzorcima iz drugih dijelova Europe, odabrano je 8 vrsta sa širokim arealom rasprostranjenosti i s većim brojem sekvencija dostupnih u bazi BOLD. U daljnje filogenetičke analize uvrštene su 4 vrste obalčara: *Brachyptera seticornis*, *Isoperla grammatica*, *Leuctra braueri* i *Leuctra prima* (zajedno s neopisanom vrstom *Leuctra* sp. ZB) i 4 vrste tulara: *Hydropsyche conturbenalis*, *Limnephilus flavicornis*, *Philopotamus montanus* i *Wormaldia occipitalis*.

4.1 Filogenetičke i filogeografske analize odabranih vrsta iz reda obalčari (Plecoptera)

Od ukupnog broja dostupnih sekvencija genskog biljega *COI* odabranih vrsta obalčara u bazama podataka BOLD i GenBank u daljnjoj analizi korištene su sekvencije duljine 658 pb (Tablica 2). Navedeni sljedovi, zajedno s dobivenim sekvencijama u okviru ovog istraživanja raspoređeni su u haplotipove (Tablice P6, P7, P8 i P9, u prilogu) koji su razvrstani u grupe, tj. potencijalne vrste (eng. *candidate (putative) species*), koristeći metode za razgraničavanje vrsta: ASAP (modeli *Simple Distance* i *Kimura (K80) ts/tv*), ABGD (model *Kimura (K80) ts/tv*), bPTP te sustav BIN-ova. Detaljne particije dobivene metodama za razgraničavanje vrsta i njihova podržanost opisane su u narednim poglavljima individualno za svaku vrstu.

Filogenetski odnosi među jedinkama analiziranih vrsta obalčara prikazani su filogenetskim stablima (Slike 8.A, 9.A, 10.A i 11.A) konstruiranim metodom najveće vjerojatnosti (ML). Učestalost i međusobni odnosi haplotipova prikazani su filogenetskim mrežama (Slike 8.B, 9.B, 10.B i 11.B). Geografska distribucija haplotipova prikazana je na kartama Europe (Slike 8.C, 9.C, 10.C i 11.C).

Tablica 2. Ukupan broj dostupnih sekvencija genskog biljega *COI* (N_{baze}) odabranih vrsta obalčara u bazama podataka BOLD i GenBank, uz broj korištenih sekvencija duljine 658 pb (N_{658}) te broj ekperimentalno dobivenih sekvencija u ovom istraživanju (N_{Medv}). Sekvencije svake vrste grupirane su u određen broj haplotipova (N_{haplot}). Broj sekvencija u bazama podataka zabilježen je na dane pristupa (od 17. do 20. svibnja 2022).

Red	Vrsta	N_{baze}	N_{658}	N_{Medv}	N_{haplot}
Plecoptera	<i>Brachyptera seticornis</i>	62	56	1	20
	<i>Leuctra braueri</i>	37	32	9	19
	<i>Leuctra prima</i> i <i>Leuctra</i> sp. ZB	23 + 1	17 + 1	1 + 1	10
	<i>Isoperla grammatica</i>	93	42	3	33

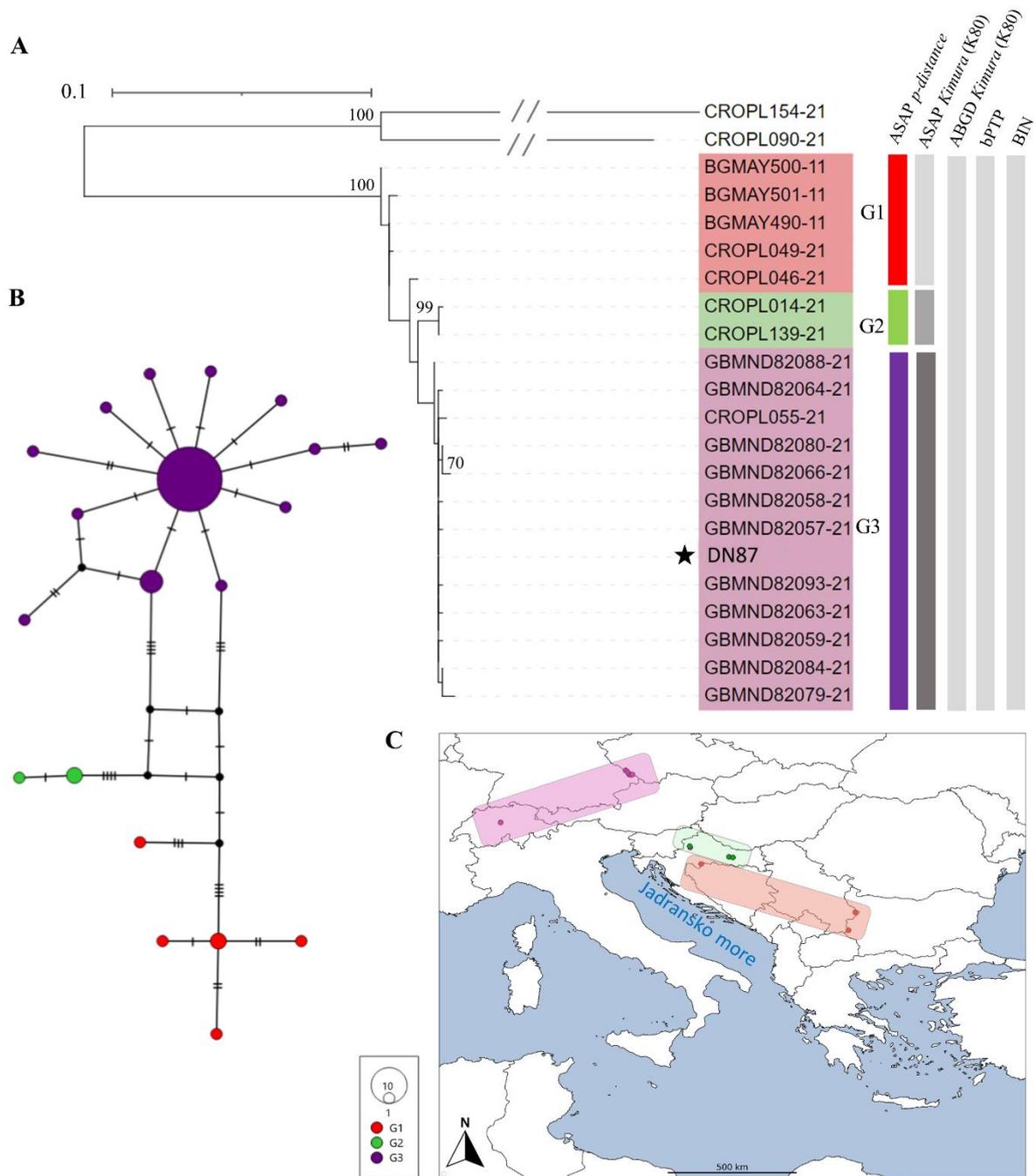
4.1.1 *Brachyptera seticornis*

Prema metodi ASAP, uz primjenu oba modela, *Simple Distance* (*p-distance*) i *Kimura* (K80) ts/tv, sljedovi se s najvećom vjerojatnošću grupiraju u tri potencijalne vrste (grupe) (vrijednost *asap-score* = 1,50), odnosno u četiri grupe (vrijednost *asap-score* = 1,50), ovisno o primijenjenom modelu. Analizom sljedova pomoću alata ABGD prema modelu *Kimura* (K80) ts/tv sekvencije čine jednu skupinu pri vrijednosti maksimalne udaljenosti $P = 4,64^{-3}$, odnosno dvije grupe pri vrijednosti maksimalne udaljenosti $P = 2,78^{-3}$. Analizom sljedova pomoću alata bPTP svi se haplotipovi grupiraju u jednu skupinu. Svim analiziranim sljedovima dodijeljen je isti BIN (AAY5851).

Iz topologije filogenetskog stabla (Slika 8.A) uočava se podjela vrste u 3 grupe označene oznakama G1-G3, od čega je grupa G2 podržana s *bootstrap* vrijednošću 99, dok grupe G2 i G3 imaju monofiletsko podrijetlo. Grupi 1 čini 5 zasebnih linija monofiletskog podrijetla, od čega je uzorak BGMAY500-11 bazalna linija (s *bootstrap* podržanošću 100). Podjelu na grupe G1-G3 podržavaju oba primjenjena modela (*p-distance* i *Kimura* (K80) ts/tv) metode ASAP. Haplotipovi koji odgovaraju grupama iz filogenetskog stabla uočavaju se i na filogenetskoj mreži (Slika 8.B). Grupe su međusobno odvojene manjim brojem mutacijskih koraka: između grupa G1 i G2 te G2 i G3 radi se o 9, a između grupa G1 i G3 o 8 mutacijskih koraka.

Ovisno o geografskoj distribuciji haplotipova (Slika 8.C), grupa G1 obuhvaća uzorke iz Bugarske i Srbije te hrvatske uzorke prikupljene na području Zrinske gore. Grupa G3 obuhvaća niz uzoraka prikupljenih na području centralne Europe (Njemačka i Švicarska), a pripadaju joj i 2 uzorka sakupljena na Medvednici (CROPL055-21, DN87), uključujući i sekvenciju dobivenu ovim istraživanjem (DN87). Ostali prethodno barkodirani uzorci s Medvednice zajedno s uzorkom s Papuka čine grupu G2.

Raspon unutarvrstne nekorrigirane udvojene genske udaljenosti za vrstu *Brachyptera seticornis* (Tablica 3) je u intervalu od 0,15% do 2,43%. Maksimalna genska udaljenost zabilježena je za haplotipove GBMND82079 i BGMAY500-11, odnosno GBMND82079 i BGMAY501-11. Unutar grupa najveća genska udaljenost je između 0,15% i 1,06%, dok je između grupa u intervalu od 1,37% do 2,28%.



Slika 8. Filogeografska analiza populacija vrste *Brachyptera seticornis* temeljena na genskom biljevu *COI* duljine 658 pb. **A** - ML filogenetsko stablo. Terminali filogenetskog stabla odgovaraju BOLD identifikacijskim oznakama prema Tablici P6, odnosno terenskim brojevima za jedinice prikupljene u ovom istraživanju (oznaka zvjezdica). Brojevi na čvorovima prikazuju podržanost grana (*bootstrap* vrijednosti), a grane s podržanošću većom od 70% smatraju se pouzdanima. Duljina grana sukladna je broju supstitucijskih promjena. Obojenost kodova označava podjelu vrste na grupe/linije prema podržanosti u filogenetskom stablu. Stupci u nijansama sive predstavljaju rezultate primjene metoda razgraničavanja vrsta, redoslijedom: ASAP – uz primjenu *p*-udaljenosti kao parametra, ASAP – uz primjenu modela *Kimura* (K80), ABGD – uz primjenu modela *Kimura* (K80), te rezultati metode bPTP i dodjeljivanja BIN-ova u okviru BOLD baze. Kao vanjske grupe za ukorjenjivanje stabla korišteni su slijedovi gena *COI* vrsta *Perla pallida* (CROPL090-19) i *Isoptera grammatica* (CROPL154-21) preuzeti iz BOLD

baze. **B** – Filogenetska mreža dobivena metodom statističke parsimonije (TCS mreža). Veličina krugova u TCS mreži odgovara učestalosti haplotipova, crne točke predstavljaju haplotipove koji nedostaju (neuzorkovane ili izumrle haplotipove), dok okomite crtice označavaju broj mutacijskih koraka. Boja grupa odgovara obojenosti kodova u filogenetskom stablu. **C** – Geografska distribucija analiziranih haplotipova prema Tablici P6. Koordinate su preuzete iz baza BOLD i GenBank. Obojenost pojedine koordinate odgovara bojama grupa iz filogenetskog stabla i mreže.

Tablica 3. Rasponi unutarvrstnih nekorigiranih udvojenih genskih udaljenosti (engl. *p-distance*, *uncorrected pairwise distance*) unutar i između grupa G1-G3 vrste *Brachyptera seticornis* odvojenih na filogenetskom stablu i mreži (Slike 8.A i 8.B). Maksimalna genska udaljenost unutar grupa označena je žutom bojom, a raspon genske udaljenosti između grupa bijelom.

	G1	G2	G3
G1	1,06 %		
G2	1,37 % - 2,28 %	0,15 %	
G3	1,37 % - 2,28 %	1,37 % - 2,13 %	0,91 %

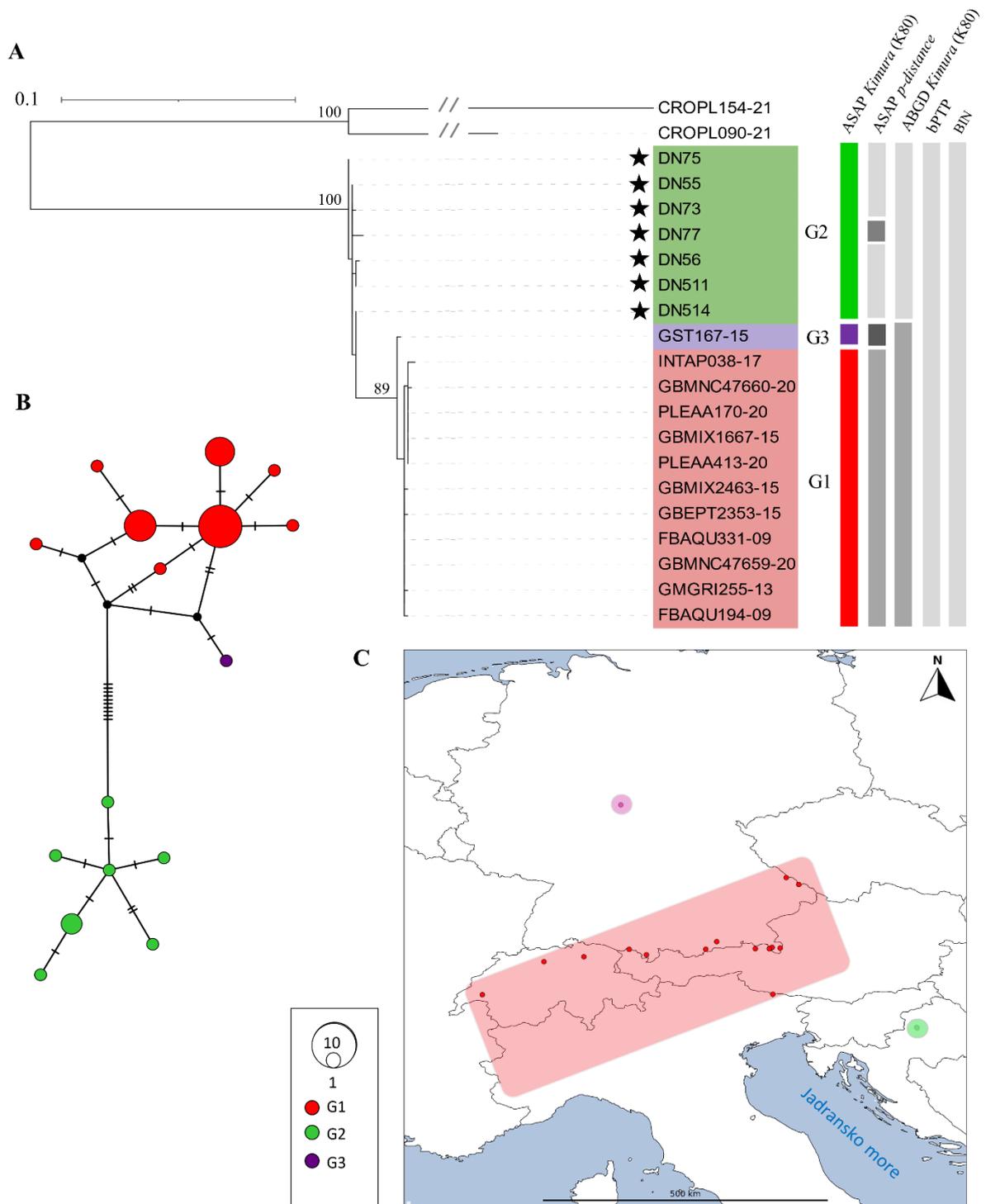
4.1.2 *Leuctra braueri*

Prema metodi ASAP i uz primjenu modela *p-distance* sljedovi se s najvećom vjerojatnošću grupiraju u 4 grupe (vrijednost *asap-score* = 2,50), odnosno u 5 grupa (vrijednost *asap-score* = 4,00). Primjenom modela *Kimura* (K80) ts/tv metode ASAP sljedovi se grupiraju u 3 grupe (vrijednost *asap-score* = 3,00), odnosno u 4 grupe (vrijednost *asap-score* = 3,50). Analizom sljedova pomoću alata ABGD prema modelu *Kimura* (K80) ts/tv sekvencije se grupiraju u dvije skupine pri vrijednostima maksimalne udaljenosti: $P = 1,67^{-3}$, $P = 2,78^{-3}$, $P = 4,64^{-3}$, $P = 7,74^{-3}$, $P = 1,29^{-2}$. Analizom sekvencija pomoću alata bPTP sekvencije se grupiraju u jednu skupinu. Svim haplotipovima dodijeljen je isti BIN (AAJ2415) (Slika 9.A).

Iz topologije filogenetskog stabla (Slika 9.A) uočava se podjela u 3 grupe označene oznakama G1-G3 s *bootstrap* podržanošću većom od 70. Grupi 2 čini 7 linija monofiletskog podrijetla, dok grupi 3 čini zasebna linija uzorka GST167-15 te je ona ujedno i sestrinska grupi 1. Grupe haplotipova prikazane na filogenetskoj mreži (Slika 9.B) odgovaraju grupama iz filogenetskog stabla. Skupine su odvojene s manjim brojem mutacijskih koraka, pri čemu je najveća udaljenost zabilježena za skupine G1 i G2 te iznosi 10 mutacijskih koraka.

Uzorci s Medvednice čine zasebnu grupu G2, dok grupa G1 obuhvaća uzorke iz Središnje Europe (Njemačka, Austrija, Italija, Švicarska) (Slika 9.C).

Vrijednost unutarvrnsne nekorigirane udvojene genske udaljenosti za vrstu *Leuctra braueri* (Tablica 4) je u intervalu od 0 % do 2,46 %. Unutar grupa maksimalna genska udaljenost iznosi 0,61 %. Najveća genska udaljenost zabilježena je između haplotipova grupa G1 i G2. Najmanji interval genske udaljenosti između grupa zabilježen je za grupe G1 i G2 i iznosi od 0,46 % do 0,77 %.



Slika 9. Filogeografska analiza populacija vrste *Leuctra braueri* temeljena na genskom biljevu *COI* duljine 658 pb. **A** - ML filogenetsko stablo. Terminali filogenetskog stabla odgovaraju BOLD identifikacijskim oznakama prema Tablici P7, odnosno terenskim brojevima za jedinice prikupljene u ovom istraživanju (oznaka zvjezdica). Brojevi na čvorovima prikazuju podržanost grana (*bootstrap* vrijednosti), a grane s podržanošću većom od 70% smatraju se pouzdanima. Duljina grana sukladna je broju supstitucijskih promjena. Obojenost kodova označava podjelu vrste na grupe/linije prema podržanosti u filogenetskom stablu. Stupci u nijansama sive predstavljaju rezultate primjene metoda razgraničavanja vrsta, redoslijedom: ASAP – uz primjenu p-udaljenosti kao parametra, ASAP – uz primjenu modela *Kimura* (K80), ABGD – uz primjenu modela *Kimura* (K80), te

rezultati metode bPTP i dodjeljivanja BIN-ova u okviru BOLD baze. Kao vanjske grupe za ukorjenjivanje stabla korišteni su slijedovi gena *COI* vrsta *Perla pallida* (CROPL090-19) i *Isoperla grammatica* (CROPL154-21) preuzeti iz BOLD baze. **B** – Filogenetska mreža dobivena metodom statističke parsimonije (TCS mreža). Veličina krugova u TCS mreži odgovara učestalosti haplotipova, crne točke predstavljaju haplotipove koji nedostaju (neuzorkovane ili izumrle haplotipove), dok okomite crtice označavaju broj mutacijskih koraka. Boja grupa odgovara obojenosti kodova u filogenetskom stablu. **C** – Geografska distribucija analiziranih haplotipova prema Tablici P6. Koordinate su preuzete iz baza BOLD i GenBank. Obojenost pojedine koordinate odgovara bojama grupa iz filogenetskog stabla i mreže.

Tablica 4. Rasponi unutarvrstnih nekorigiranih udvojenih genskih udaljenosti (engl. *p-distance*, *uncorrected pairwise distance*) unutar i između grupa G1-G3 vrste *Lecutra braueri* odvojenih na filogenetskom stablu i mreži (Slike 9.A i 9.B). Maksimalna genska udaljenost unutar grupa označena je žutom bojom, a raspon genske udaljenosti između grupa bijelom.

	G1	G2	G3
G1	0,61 %		
G2	1,84 % - 2,46 %	0,61 %	
G3	0,46 % - 0,77 %	1,84 % - 2,15 %	0 %

4.1.3 *Leuctra prima* i *Leuctra* sp. ZB

Sekvencija uzorka DN71a predstavlja DNA barkod odrasle jedinke iz roda *Leuctra* čija determinacija morfološkim analizama nije bila moguća zbog nedostatka komparativnog materijala. Usporedbom s bazama podataka, sekvencija pokazuje najveću sličnost sa sekvencijom CROPL248-21 koja pripada neopisanoj jedinki roda *Leuctra* (oznaka u bazi BOLD: *Leuctra* sp. ZB, prikupljenoj na području Žumberačkog gorja). Kako navedene dvije sekvencije prema bazama podataka pokazuju najveću sličnost s opisanom vrstom *Leuctra prima*, u nastavku su analizirane zajedno. Za ostale vrste s kojima jedinka pokazuje morfološku sličnost (*Leuctra signifera*, *Leuctra dalmoni* i *Leuctra carpathica*) ne postoje dostupne sekvencije u bazama podataka BOLD i GenBank (pristup: 22. lipnja 2022.).

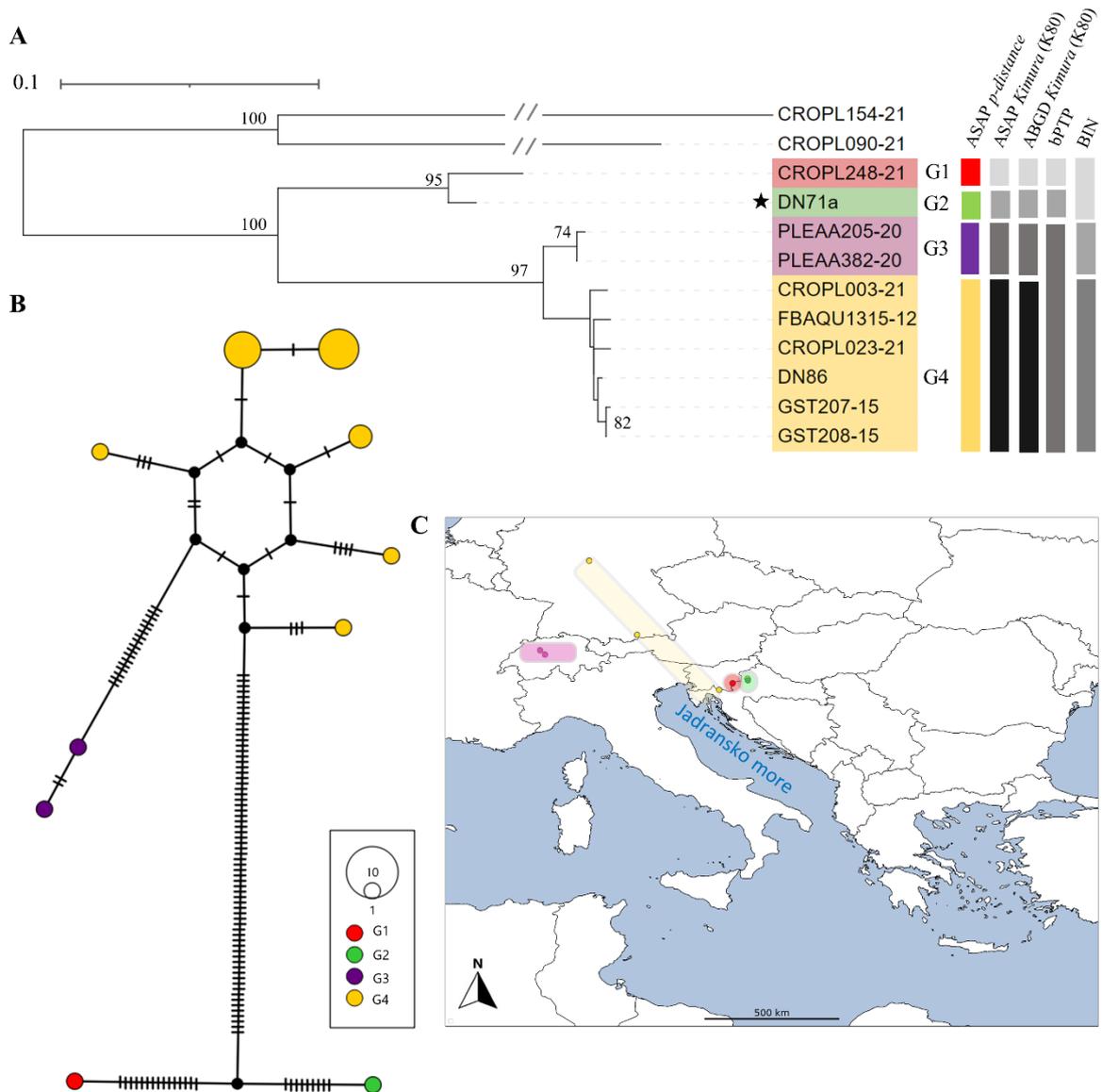
Prema metodi ASAP oba primijenjena modela, *p-distance* i *Kimura* (K80) ts/tv, s najvećom vjerojatnošću grupiraju sljedove u dvije (*asap score* = 1,50) ili u četiri (*asap score* = 2,50) grupe. Analizom sljedova pomoću alata ABGD prema modelu *Kimura* (K80) ts/tv sekvencije čine dvije skupine pri vrijednostima maksimalne udaljenosti od $P = 2,15^{-2}$ do $P = 7,74^{-3}$, odnosno četiri skupine pri vrijednosti maksimalne udaljenosti $P = 4,64^{-3}$. Analizom sekvencija pomoću alata bPTP nastaju tri skupine, pri čemu jednu čini uzorak DN71a, drugu uzorak CROPL248-21 (obje morfološki determinirane kao *Leuctra* sp. ZB), a treću svi ostali analizirani uzorci determinirani kao *Leuctra prima*. Uzorcima DN71a i CROPL248-21 dodijeljen je BIN (AEK8671), a vrsti *Leuctra prima* dva, od čega prvu čine uzorci PLEAA382-20 i PLEAA205-20 (G4, BIN: AEE0093), a drugi BIN svi ostali uzorci.

Filogenetička analiza (Slika 10.A) potvrđuje monofiletsko podrijetlo vrste *Leuctra prima* i odvaja je od neopisane vrste *Leuctra* sp. ZB. Dodatno, na stablu je svaka od ovih vrsta podijeljena na 2 odvojene skupine (grane) uz podržanost iznad 95% (95%, 97%). Navedene 4 grupe označene su oznakama G1-G4, pri čemu neopisana vrsta *Leuctra* sp. ZB objedinjuje grupe G1 (CROPL248-21) i G2 (DN71a), a vrsta *Leuctra prima* obuhvaća grupe G3 i G4. Haplotipovi koji odgovaraju grupama iz filogenetskog stabla uočavaju se i na prikazanoj filogenetskoj mreži (Slika 10.B).

Grupe G1-G4 međusobno su odvojene većim brojem mutacijskih koraka. Grupe G1 i G2 međusobno odvaja 24 mutacijskih koraka, a od najbližeg pripadnika skupine G4 udaljene su 85 (za grupu G1), odnosno 79 (za grupu G2) mutacijskih koraka. Grupa G3 od najbližeg je pripadnika skupine G4 udaljena 22 mutacijska koraka. Najviše uzorkovanih jedinki vrste

Leuctra prima prikupljeno je na području Njemačke i pripada grupi G4. Grupa G3 obuhvaća jedinke prikupljene na području Švicarske, dok grupu G4 čine jedinke iz Hrvatske i Njemačke (Slika 10.C).

Raspon unutarvrstne nekorrigirane odvojene genetske udaljenosti za analizirane sekvence (Tablica 5) je u intervalu od 0 % do 13,55 %. Maksimalna genska udaljenost je između grupa G1 i G3. Genska udaljenost grupa G1 i G2 od grupa G3 i G4 je u intervalu od 12,02 % i 12,32 %. Unutar grupa, najveća genska udaljenost iznosi 1,37 %. Između grupa koje pripadaju istoj vrsti najmanja genska udaljenost iznosi 3,20 % za vrstu *Leuctra prima*, odnosno 3,65 % za vrstu *Leuctra* sp. ZB.



Slika 10. Filogeografska analiza populacija vrste *Leuctra prima* i neopisane vrste *Leuctra* sp. ZB temeljena na genskom bilježu *COI* duljine 658 pb. **A** - ML filogenetsko stablo. Terminali filogenetskog stabla odgovaraju BOLD identifikacijskim oznakama prema Tablici P8, odnosno terenskim brojevima za jedinice prikupljene u ovom istraživanju (oznaka zvjezdica). Brojevi na čvorovima prikazuju podržanost grana (*bootstrap* vrijednosti), a grane s podržanošću većom od 70% smatraju se pouzdanima. Duljina grana sukladna je broju supstitucijskih promjena. Obojenost kodova označava podjelu vrste na grupe/linije prema podržanosti u filogenetskom stablu. Stupci u nijansama sive predstavljaju rezultate primjene metoda razgraničavanja vrsta, redoslijedom: ASAP – uz primjenu *p*-udaljenosti kao parametra, ASAP – uz primjenu modela *Kimura* (K80), ABGD – uz primjenu modela *Kimura* (K80), te rezultati metode bPTP i dodjeljivanja BIN-ova u okviru BOLD baze. Kao vanjske grupe za ukorjenjivanje stabla korišteni su slijedovi gena *COI* vrsta *Perla pallida* (CROPL090-19) i *Isoperla grammatica* (CROPL154-21) preuzeti iz BOLD baze. **B** – Filogenetska mreža dobivena metodom statističke parsimonije (TCS mreža). Veličina krugova u TCS mreži odgovara učestalosti haplotipova, crne točke predstavljaju haplotipove

koji nedostaju (neuzorkovane ili izumrle haplotipove), dok okomite crtice označavaju broj mutacijskih koraka. Boja grupa odgovara obojenosti kodova u filogenetskom stablu. C – Geografska distribucija analiziranih haplotipova prema Tablici P6. Koordinate su preuzete iz baza BOLD i GenBank. Obojenost pojedine koordinate odgovara bojama grupa iz filogenetskog stabla i mreže.

Tablica 5. Rasponi unutarvrstnih nekorigiranih udvojenih genskih udaljenosti (engl. *p-distance, uncorrected pairwise distance*) unutar i između grupa vrsta *Leuctra prima* (G3, G4) i neopisane vrste *Leuctra* sp. ZB (G1, G2) odvojenih na filogenetskom stablu i mreži (Slike 10.A i 10.B). Maksimalna genska udaljenost unutar grupa označena je žutom bojom, a raspon genske udaljenosti između grupa bijelom.

	G1	G2	G3	G4
G1	0 %			
G2	3,65 %	0 %		
G3	12,79 % - 13,55 %	12,02 % - 12,94 %	1,37 %	
G4	12,18 % - 12,32 %	12,79 % - 12,94 %	3,20 % - 3,65 %	0,30 %

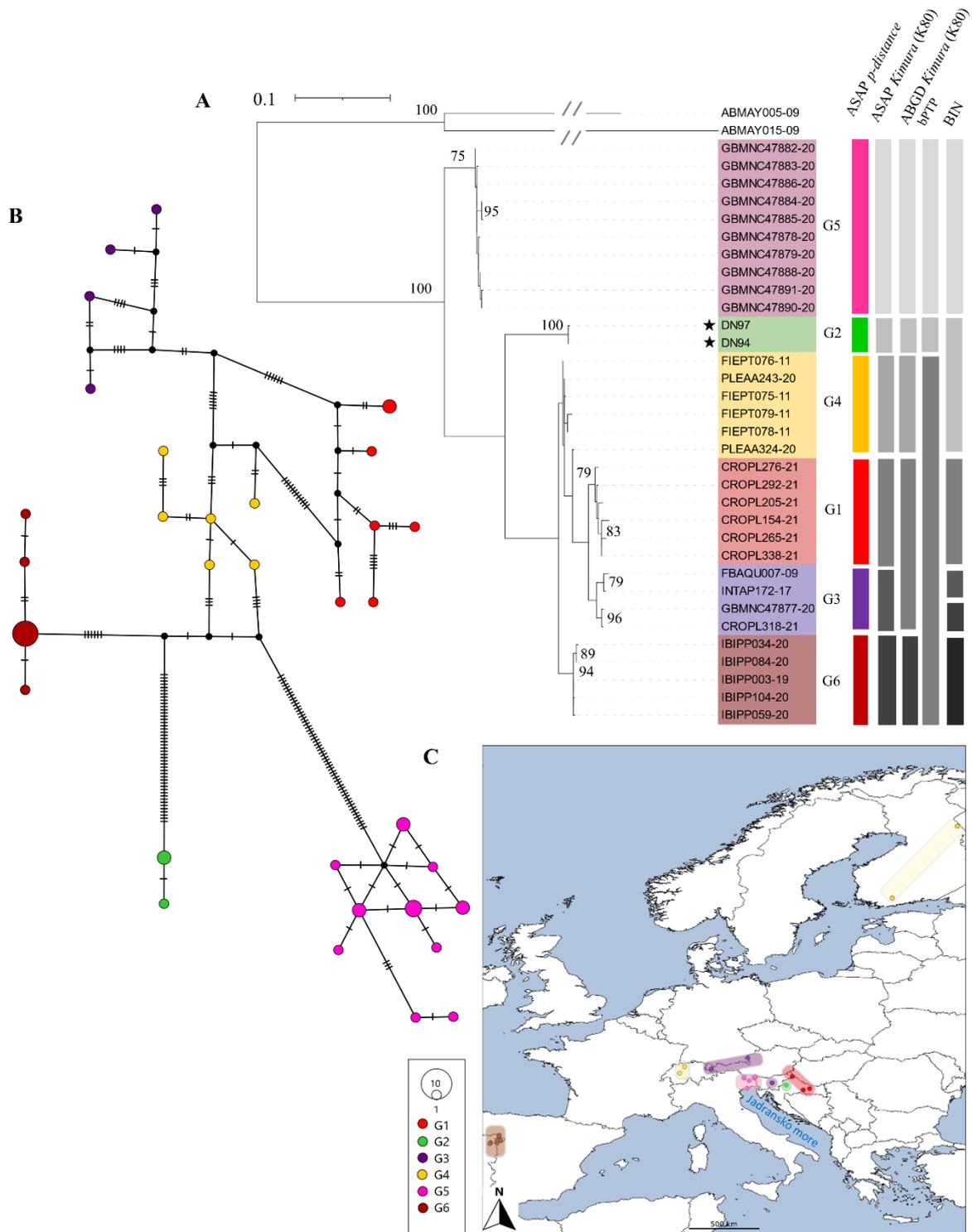
4.1.4 *Isoperla grammatica*

Prema rezultatima metode ASAP uz primjenu modela *p-distance* sljedovi se s najvećom vjerojatnošću grupiraju u 6 grupa (vrijednost *asap-score* = 2,00), odnosno u 3 grupe (vrijednost *asap-score* = 3,50). Primjena modela *Kimura* (K80) ts/tv metode ASAP rezultirala je istom podjelom: sljedovi se grupiraju u 6 grupa (vrijednost *asap-score* = 2,50), odnosno u tri grupe (vrijednost *asap-score* = 3,00). Analizom sljedova pomoću alata ABGD prema modelu *Kimura* (K80) ts/tv sekvencije se grupiraju u 6 skupina pri vrijednosti maksimalne udaljenosti $P = 2,78^{-3}$, odnosno u 5 grupa pri vrijednostima maksimalne udaljenosti $P = 7,74^{-3}$ i $P = 4,64^{-3}$. Analizom sekvenci pomoću alata bPTP sekvencije se grupiraju u 3 skupine. Algoritam za podjelu sekvencija na BIN-ove identičan je podjeli prema metodi ASAP (modeli *p-distance* i *Kimura* (K80) ts/tv), uz dodatnu razdiobu grupe 3 na 2 BIN-a (uzorci CROPL318-21 i GBMNC47877-20, te INTAP172-17 i FBAQU007-09). Dodijeljeni BIN-ovi su: AAY9655, AEH6396, AEG4373 (haplotipovi GBMC47877-20 i CROPL318-21), AEC9627, ACJ0709, AAK4351 (haplotipovi FBAQU007-09 i INTAP172-17).

Iz topologije filogenetskog stabla (Slika 11.A) uočava se podjela u 5 grupa označenih oznakama G1-G3, G5-G6 s podržanošću većom od 70 %. Grupa označena s G4 (haplotipovi FIEPT075-11, FIEPT076-11, FIEPT078-11, FIEPT079-11, PLEAA243-20 i PLEAA324-20) prikazuje 6 linija slabe podržanosti. Na filogenetskoj mreži (Slika 11.B) vidljivo je postojanje grupa haplotipova koje odgovaraju grupama filogenetskog stabla i koje su odvojene različitim brojem mutacijskih koraka (od 10 do preko 60), što ukazuje na veliku genetsku raznolikost vrste. Međusobne udaljenosti haplotipova unutar grupa su u intervalu od 1 do 11 mutacijskih koraka.

Grupe G1 i G2 obuhvaćaju uzorke iz Hrvatske. Grupa G2 obuhvaća jedinke prikupljene kao dio ovog istraživanja, a grupu G1 čine uzorci prikupljeni na području Međimurja i Slavonije. Grupe G1 i G2 odvojene su većim brojem mutacijskih koraka. Grupa G3 obuhvaća uzorke iz alpske regije Slovenije, Italije, Austrije i Njemačke te se dijeli u dvije podgrupe s velikom podržanošću na način da se uzorci iz Italije i Slovenije (*bootstrap* podržanost 96) te uzorci iz Austrije i Njemačke (*bootstrap* podržanost 79) grupiraju zajedno (Slika 11.C). Najmanje podržana grupa G4 obuhvaća uzorke iz Švicarske, a filogenetski odnosi među tim jedinkama nisu razriješeni. Grupa G5 obuhvaća uzorke iz Sjeverne Italije, a grupa G6 uzorke iz Austrije.

Vrijednost unutarvrzne nekorigirane udvojene genske udaljenosti za vrstu *Isoperla grammatica* (Tablica 6) nalazi se u intervalu od 0 % do 11,7 %. Maksimalna genska udaljenost u iznosu od 11,7 % zabilježena je za haplotipove GBMNC47885-20 i CROPL154-21. Rasponi genskih udaljenosti između odvojenih grupa iznose od 9,95 % do 11,7 % za najudaljenije grupe (G1 i G5) te od 1,55 % do 2,78 % za najrodnije grupe (G6 i G4). Unutar grupa, najveća genska udaljenost iznosi 1,71 %.



Slika 11. Filogeografska analiza populacija vrste *Isoperla grammatica* temeljena na genskom bilježu *COI* duljine 658 pb. **A** - ML filogenetsko stablo. Terminali filogenetskog stabla odgovaraju BOLD identifikacijskim oznakama prema Tablici P9, odnosno terenskim brojevima za jedinice prikupljene u ovom istraživanju (oznaka zvjezdica). Brojevi na čvorovima prikazuju podržanost grana (*bootstrap* vrijednosti), a grane s podržanošću većom od 70% smatraju se pouzdanima. Duljina grana sukladna je broju supstitucijskih promjena. Obojenost kodova označava podjelu vrste na grupe/linije prema podržanosti u filogenetskom stablu. Stupci u nijansama sive predstavljaju

rezultate primjene metoda razgraničavanja vrsta, redosljedom: ASAP – uz primjenu p -udaljenosti kao parametra, ASAP – uz primjenu modela *Kimura* (K80), ABGD – uz primjenu modela *Kimura* (K80), te rezultati metode bPTP i dodjeljivanja BIN-ova u okviru BOLD baze. Kao vanjske grupe za ukorjenjivanje stabla korišteni su slijedovi gena *COI* vrsta *Stenacron interpunctatum* (ABMAY015-09) i jedinke porodice Heptageniidae (ABMAY005-09) preuzeti iz BOLD baze. **B** – Filogenetska mreža dobivena metodom statističke parsimonije (TCS mreža). Veličina krugova u TCS mreži odgovara učestalosti haplotipova, crne točke predstavljaju haplotipove koji nedostaju (neuzorkovane ili izumrle haplotipove), dok okomite crtice označavaju broj mutacijskih koraka. Boja grupa odgovara obojenosti kodova u filogenetskom stablu. **C** – Geografska distribucija analiziranih haplotipova prema Tablici P6. Koordinate su preuzete iz baza BOLD i GenBank. Obojenost pojedine koordinate odgovara bojama grupa iz filogenetskog stabla i mreže.

Tablica 6. Rasponi unutarvrstnih nekorrigiranih udvojenih genskih udaljenosti (engl. *p-distance*, *uncorrected pairwise distance*) unutar i između grupa G1-G6 vrste *Isoperla grammatica* odvojenih na filogenetskom stablu i mreži (Slike 11.A i 11.B). Maksimalna genska udaljenost unutar grupa označena je žutom bojom, a raspon genske udaljenosti između grupa bijelom

	G1	G2	G3	G4	G5	G6
G1	1,71 %					
G2	9,02 % - 10,3 %	0,16 %				
G3	2,33 % - 3,42 %	8,71 % - 9,49 %	1,71 %			
G4	2,49 % - 4,51 %	7,93 % - 8,55 %	2,49 % - 4,20 %	1,71 %		
G5	9,95 % - 11,7 %	9,64 % - 10,4 %	9,80 % - 11,0 %	9,33 % - 10,4 %	1,09 %	
G6	4,51 % - 5,61 %	8,55 % - 9,02 %	3,89 % - 4,67 %	1,55 % - 2,78 %	10,1 % - 11,0 %	0,47 %

4.2 Filogenetičke i filogeografske analize odabranih vrsta iz reda tulari (Trichoptera)

Od ukupnog broja dostupnih sekvencija genskog biljega *COI* odabranih vrsta tulara u bazama podataka BOLD i GenBank u daljnjoj analizi korištene su sekvencije duljine 658 pb (Tablica 7). Navedeni sljedovi s eksperimentalno dobivenim sekvencijama u okviru ovog istraživanja raspoređeni su u haplotipove (Tablice P10, P11, P12 i P13, u prilogu) koji su razvrstani u grupe, tj. potencijalne buduće vrste, koristeći metode za razgraničavanje vrsta: ASAP (modeli *Simple Distance* i *Kimura (K80) ts/tv*), ABGD (model *Kimura (K80) ts/tv*), alat bPTP i sustav BIN. Detaljne podjele dobivene metodama za razgraničavanje vrsta i njihova podržanost opisane su u narednim poglavljima individualno za svaku vrstu.

Filogenetski odnosi među jedinkama analiziranih vrsta tulara prikazani su filogenetskim stablima (Slike 12.A, 13.A, 14.A i 15.A) konstruiranim metodom najveće vjerojatnosti (ML). Učestalosti i međusobni odnosi haplotipova prikazani su filogenetskim mrežama (Slike 12.B, 13.B, 14.B i 15.B). Geografska rasprostranjenost haplotipova prikazana je na kartama Europe (Slike 12.C, 13.C, 14.C i 15.C).

Tablica 7. Broj dostupnih sekvencija genskog biljega *COI* (N_{baze}) odabranih vrsta tulara u bazama podataka BOLD i GenBank, uz broj korištenih sekvencija duljine 658 pb (N_{658}) i broj eksperimentalno dobivenih sekvencija u ovom istraživanju (N_{Medv}). Sekvencije svake vrste podijeljene su u određen broj haplotipova (N_{haplot}). Broj sekvencija u bazama podataka zabilježen je na dane pristupa (od 17. do 20. svibnja 2022).

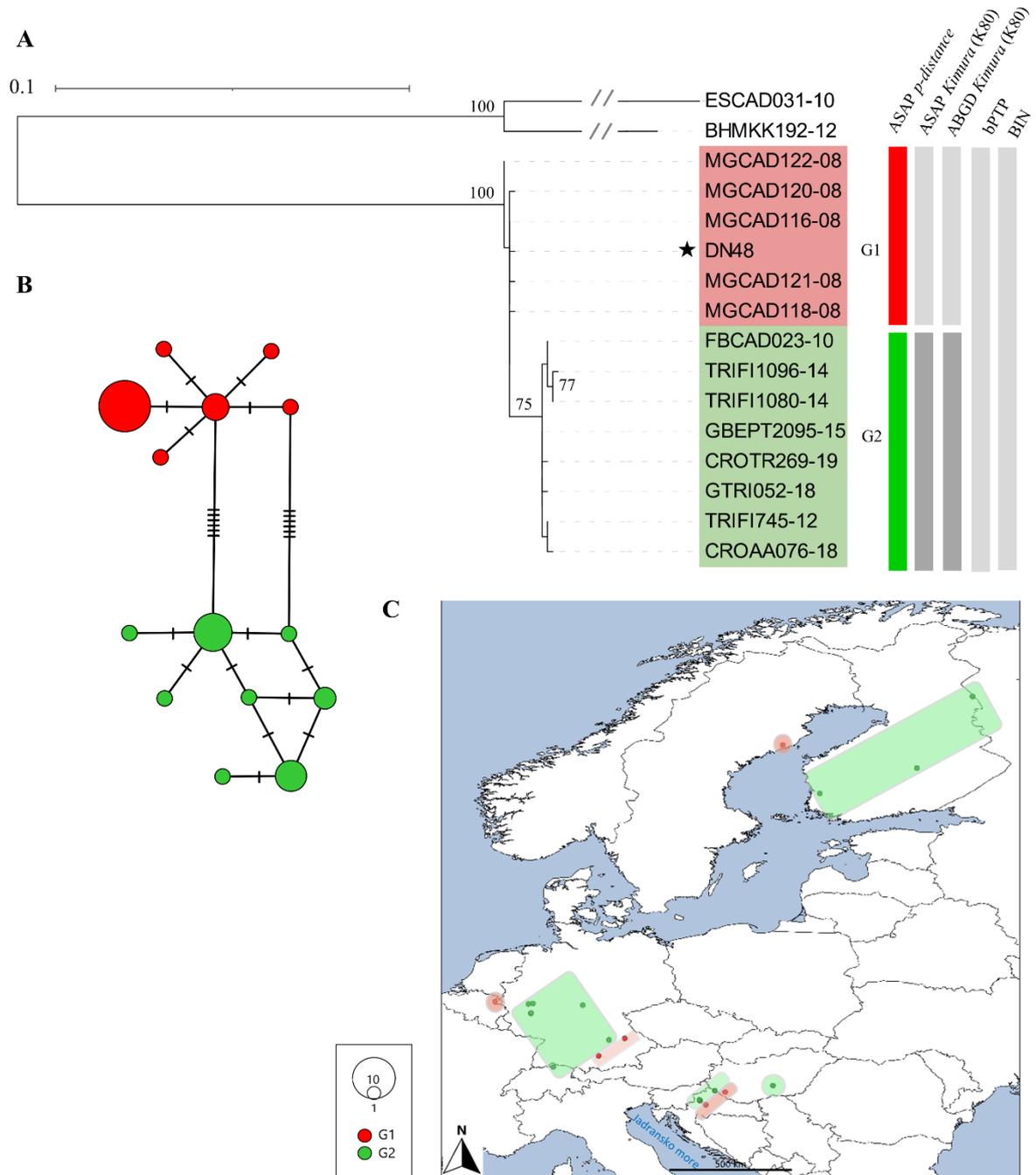
Red	Vrsta	N_{baze}	N_{658}	N_{Medv}	N_{haplot}
Trichoptera	<i>Hydropsyche contubernalis</i>	47	34	1	14
	<i>Limnephilus flavicornis</i>	50	41	1	12
	<i>Philopotamus montanus</i>	79	55	1	26
	<i>Wormaldia occipitalis</i>	40	32	6	23

4.2.1 *Hydropsyche contubernalis*

Prema rezultatima metode ASAP uz primjenu modela *p-distance* sljedovi se s najvećom vjerojatnošću grupiraju u dvije skupine (vrijednost *asap-score* = 1,50) dok ostale podjele ne pokazuju zadovoljavajuću razinu značajnosti. Prema modelu *Kimura* (K80) ts/tv metode ASAP sljedovi se grupiraju u dvije grupe (vrijednost *asap-score* = 1,50), odnosno u 4 grupe (vrijednost *asap-score* 2,50). Analizom sljedova pomoću alata ABGD prema modelu *Kimura* (K80) ts/tv sekvencije se grupiraju u dvije skupine pri vrijednostima maksimalne udaljenosti $P = 2,78^{-3}$ i $P = 1,67^{-3}$ odnosno u 14 grupa pri vrijednosti maksimalne udaljenosti $P = 1,00^{-3}$. Analizom sekvencija pomoću alata bPTP i podjelom u BIN-ove sekvencije se grupiraju zajedno tvoreći jedan BIN (AAC0455).

Iz topologije filogenetskog stabla konstruiranog metodom najveće vjerojatnosti (ML) (Slika 12.A) uočava se podjela u dvije grupe označene oznakama G1 i G2, pri čemu se G2 odvaja kao monofiletska skupina s *bootstrap* podrškom koja iznosi 75. Grupa G1 obuhvaća uzorke iz Njemačke, Hrvatske, Mađarske, Belgije, Mongolije i Švedske te uključuje i uzorak vrste *H. contubernalis* prikupljen u ovom istraživanju (Slika 12.C). Grupa G2 obuhvaća uzorke iz Hrvatske, Finske, Njemačke, Švicarske i Mađarske te sadrži podgrupu uzoraka iz Finske sa značajnom podržanošću (TRIFI1096-14, TRIFI1080-14) od 77 %. Haplotipovi prikazani na filogenetskoj mreži (slika 12.B) odgovaraju grupama iz filogenetskog stabla. Grupe su odvojeni manjim brojem mutacijskih koraka. Skupina G1 odvojena je od skupine G2 sa 6 mutacijskih koraka, a između haplotipova u istoj grupi brojevi mutacijskih koraka nalaze se u rasponu od 1 do 4 mutacijska koraka.

Vrijednost unutarvrzne nekorrigirane udvojene genske udaljenosti za vrstu *Hydropsyche contubernalis* (Tablica 8) nalazi se u intervalu od 0,15% do 1,52%. Unutar grupa maksimalna genska udaljenost iznosi 0,61%.



Slika 12. Filogeografska analiza populacija vrste *Hydropsyche contubernalis* temeljena na genskom biljevu *COI* duljine 658 pb. **A** - ML filogenetsko stablo. Terminali filogenetskog stabla odgovaraju BOLD identifikacijskim oznakama prema Tablici P10, odnosno terenskim brojevima za jedinice prikupljene u ovom istraživanju (oznaka zvjezdica). Brojevi na čvorovima prikazuju podržanost grana (*bootstrap* vrijednosti), a grane s podržanošću većom od 70% smatraju se pouzdanima. Duljina grana sukladna je broju supstitucijskih promjena. Obojenost kodova označava podjelu vrste na grupe/linije prema podržanosti u filogenetskom stablu. Stupci u nijansama sive predstavljaju rezultate primjene metoda razgraničavanja vrsta, redoslijedom: ASAP – uz primjenu *p*-udaljenosti kao parametra, ASAP – uz primjenu modela *Kimura* (K80), ABGD – uz primjenu modela *Kimura* (K80), te rezultati metode bPTP i dodjeljivanja BIN-ova u okviru BOLD baze. Kao vanjske grupe za ukorjenjivanje stabla

korišteni su slijedovi gena *COI* vrsta *Philopotamus montanus* (ESCAD031-10) i *Wormaldia occipitalis* (BHMKK192-12) preuzeti iz BOLD baze. **B** – Filogenetska mreža dobivena metodom statističke parsimonije (TCS mreža). Veličina krugova u TCS mreži odgovara učestalosti haplotipova, crne točke predstavljaju haplotipove koji nedostaju (neuzorkovane ili izumrle haplotipove), dok okomite crtice označavaju broj mutacijskih koraka. Boja grupa odgovara obojenosti kodova u filogenetskom stablu. **C** – Geografska distribucija analiziranih haplotipova prema Tablici P6. Koordinate su preuzete iz baza BOLD i GenBank. Obojenost pojedine koordinate odgovara bojama grupa iz filogenetskog stabla i mreže.

Tablica 8. Rasponi unutarvrstnih nekorigiranih udvojenih genetskih udaljenosti (eng. *p-distance, uncorrected pairwise distance*) unutar i između grupa G1-G2 vrste *Hydropsyche contubernalis* odvojenih na filogenetskom stablu i mreži (Slike 12.A i 12.B). Maksimalna genska udaljenost unutar grupa označena je žutom bojom, a raspon genske udaljenosti između grupa bijelom

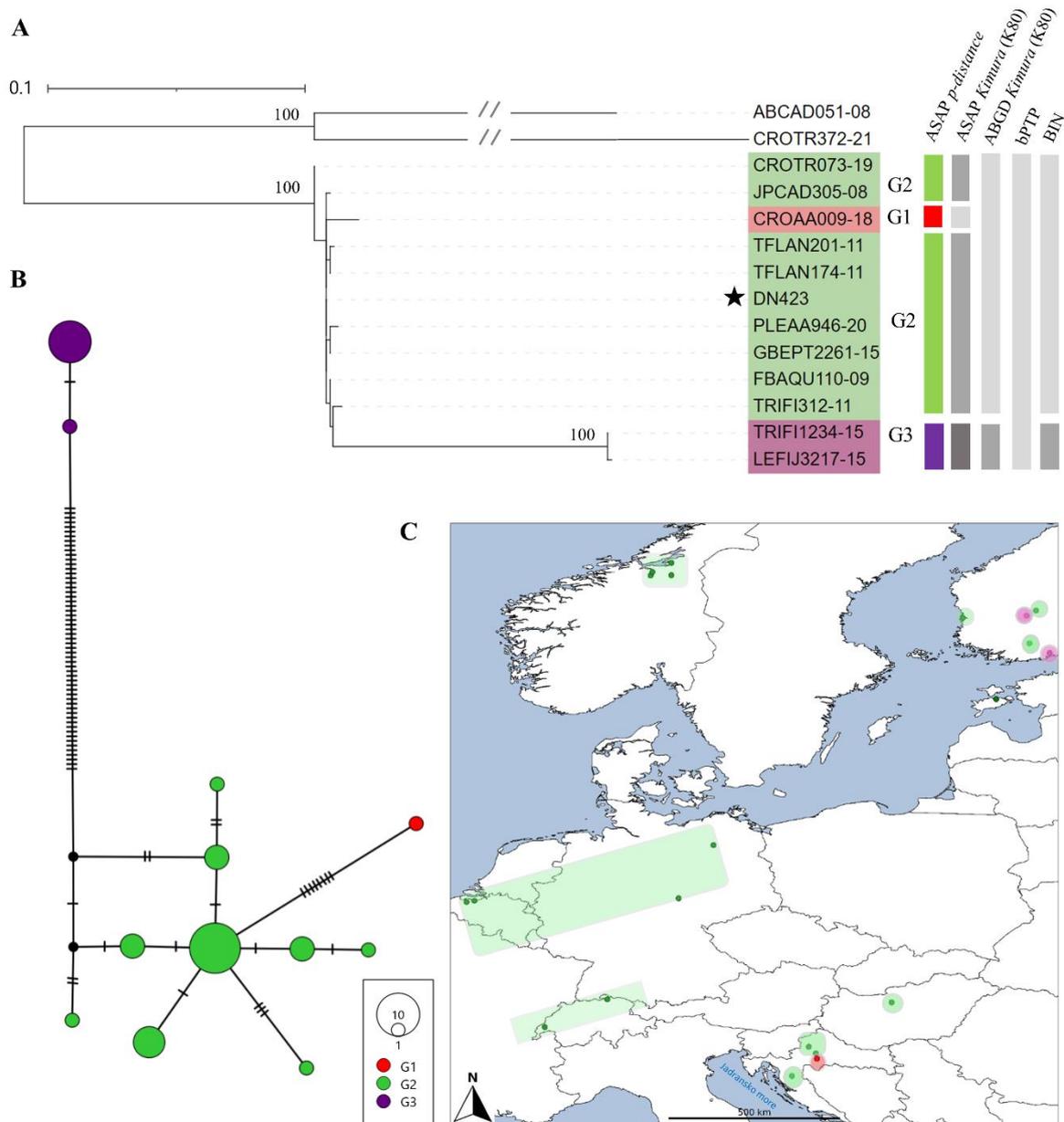
	G1	G2
G1	0,30 %	
G2	0,91 % - 1,52 %	0,61 %

4.2.2 *Limnephilus flavicornis*

Prema metodi ASAP oba primijenjena modela *p-distance* i *Kimura* (K80) ts/tv s najvećom vjerojatnošću grupiraju sljedove u tri (*asap score* = 2,00) ili u 5 grupa (*asap score* = 3,50). Analizom sljedova pomoću alata ABGD prema modelu *Kimura* (K80) ts/tv sekvencije čine dvije skupine pri vrijednostima maksimalne udaljenosti od $P = 5,99^{-2}$ do $P = 4,64^{-3}$, odnosno tri skupine pri vrijednosti maksimalne udaljenosti $P = 2,78^{-3}$. Analizom sekvenci pomoću alata bPTP ne dolazi do razgraničavanja sekvencija u zasebne skupine. Sekvencijama su dodijeljena 2 BIN-a, od čega je haplotipovima TRIFI1234-15 i LEFIJ3217-15 dodijeljen BIN: AAE6317, a svim preostalim uzorcima BIN: AAD1006.

Iz topologije filogenetskog stabla (Slika 13.A) i filogenetske mreže (Slika 13. B) uočava se podijeljenost vrste na 2 grupe (G3 i G2), a unutar grupe G2 sekvencija CROAA009-18 (grupa G1, lokalitet Sisak) pokazuje tendenciju divergencije od ostalih uzoraka. Time je vrsta odijeljena na grupe podržane metodom ASAP (*p-distance* i *Kimura* (K80) ts/tv). Izuzev navedenog uzorka grupe G1, svi sljedovi iz Hrvatske dio su skupine G2. Grupa G2 objedinjuje uzorke iz čitave Europe (Njemačka, Mađarska, Finska, Norveška, Estonija, Hrvatska, Švicarska i Belgija). Grupi G3 čine jedinice prikupljene sa sjevera Europe: iz Belgije i Finske (Slika 13.C). Grupa G3 od ostalih je odvojena većim brojem mutacijskih koraka (57), dok je grupa G1 od sebi najrodnije grupe G2 odvojena sa svega 8 mutacijskih koraka.

Raspon unutarvrstne nekorrigirane odvojene genetske udaljenosti za vrstu *Limnephilus flavicornis* (Tablica 9) je u intervalu od 0 % do 10,03 %. Maksimalna genetska udaljenost zabilježena je za haplotipove LEFIJ3217-15 (G3) i CROAA009-18 (G1). Grupa G3 od ostalih je grupa odvojena genskom udaljenosti u intervalu od 8,97 % do 10,03 %. Unutar grupa najveća genska udaljenost iznosi 1,06 %.



Slika 13. Filogeografska analiza populacija vrste *Limnephilus flavicornis* temeljena na genskom bilježu *COI* duljine 658 pb. **A** - ML filogenetsko stablo. Terminali filogenetskog stabla odgovaraju BOLD identifikacijskim oznakama prema Tablici P11, odnosno terenskim brojevima za jedinice prikupljene u ovom istraživanju (oznaka zvjezdica). Brojevi na čvorovima prikazuju podržanost grana (*bootstrap* vrijednosti), a grane s podržanošću većom od 70% smatraju se pouzdanima. Duljina grana sukladna je broju supstitucijskih promjena. Obojenost kodova označava podjelu vrste na grupe/linije prema podržanosti u filogenetskom stablu. Stupci u nijansama sive predstavljaju rezultate primjene metoda razgraničavanja vrsta, redoslijedom: ASAP – uz primjenu *p*-udaljenosti kao parametra, ASAP – uz primjenu modela *Kimura* (K80), ABGD – uz primjenu modela *Kimura* (K80), te rezultati metode bPTP i dodjeljivanja BIN-ova u okviru BOLD baze. Kao vanjske grupe za ukorjenjivanje stabla korišteni su slijedovi gena *COI* vrsta *Molanna flavicornis* (ABCAD051-08) i *Sericostoma flavicorne* (CROTR372-21) preuzeti iz BOLD baze. **B** – Filogenetska mreža dobivena metodom statističke parsimonije (TCS mreža). Veličina krugova u TCS mreži odgovara učestalosti haplotipova, crne točke predstavljaju haplotipove

koji nedostaju (neuzorkovane ili izumrle haplotipove), dok okomite crtice označavaju broj mutacijskih koraka. Boja grupa odgovara obojenosti kodova u filogenetskom stablu. C – Geografska distribucija analiziranih haplotipova prema Tablici P6. Koordinate su preuzete iz baza BOLD i GenBank. Obojenost pojedine koordinate odgovara bojama grupa iz filogenetskog stabla i mreže.

Tablica 9. Rasponi unutarvrstnih nekorigiranih udvojenih genetskih udaljenosti (engl. *p-distance*, *uncorrected pairwise distance*) unutar i između grupa G1-G3 vrste *Limnephilus flavicornis* odvojenih na filogenetskom stablu i mreži (Slike 12.A i 12.B).. Maksimalna genska udaljenost unutar grupa označena je žutom bojom, a raspon genske udaljenosti između grupa bijelom

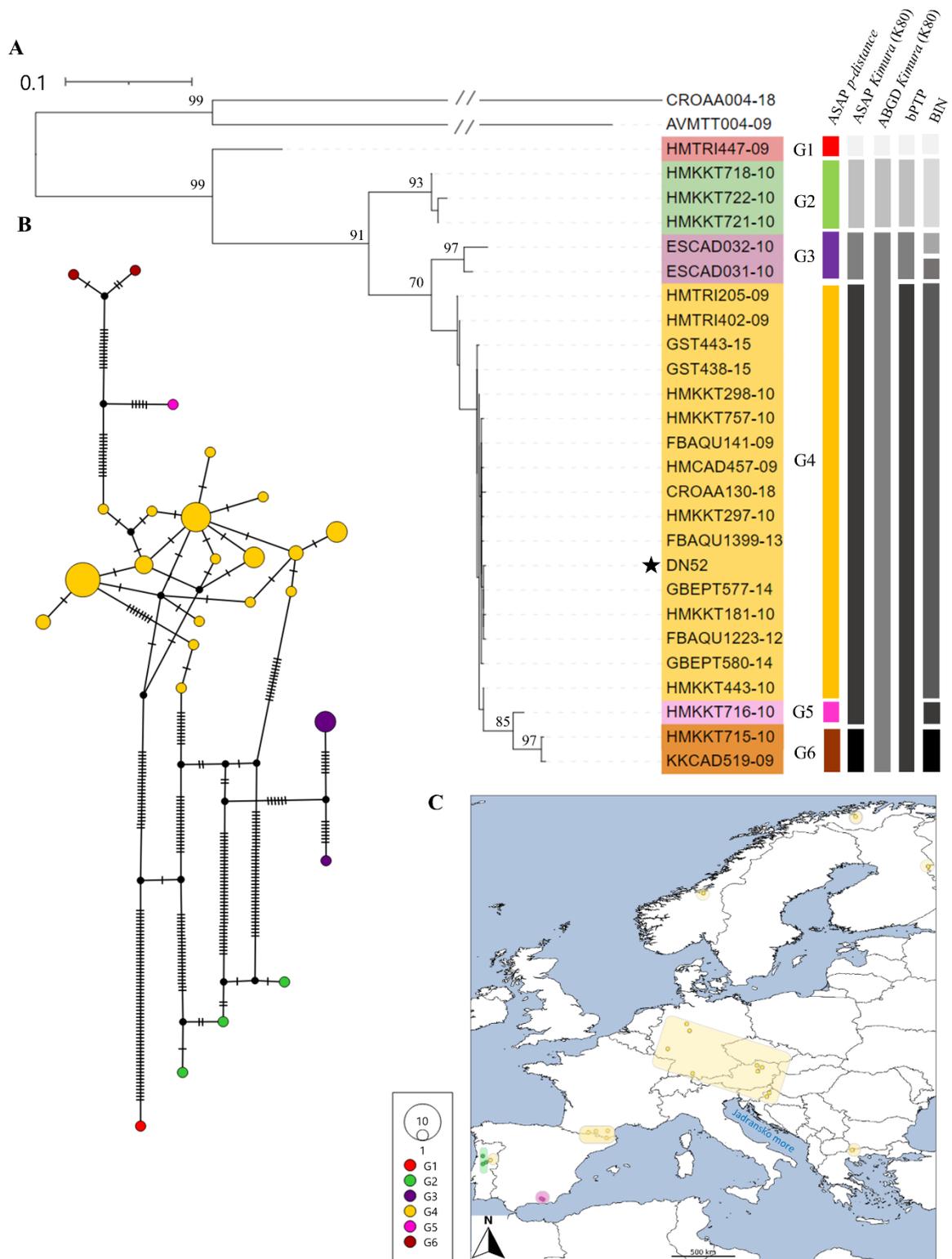
	G1	G2	G3
G1	0 %		
G2	1,22 % - 1,82 %	1,06 %	
G3	9,88 % - 10,03 %	8,97 % - 9,73 %	0,15 %

4.2.3 *Philopotamus montanus*

Prema metodi ASAP i uz primjenu modela *p-distance*, analizirani uzorci s najvećom se vjerojatnošću grupiraju u 6 (*asap score* = 1,50) ili u 8 grupa (*asap score* = 1,50). Prema metodi ASAP i uz primjenu modela *Kimura* (K80) ts/tv analizirani uzorci s najvećom se vjerojatnošću grupiraju u 5 (*asap score* = 1,50) ili u 6 grupa (*asap score* = 2,00). Analizom sljedova pomoću alata ABGD prema modelu *Kimura* (K80) ts/tv sekvencije čine tri skupine pri vrijednostima maksimalne udaljenosti $P = 5,99^{-2}$ i $P = 3,59^{-2}$, odnosno 6 skupina pri vrijednosti maksimalne udaljenosti $P = 1,29^{-2}$. Analizom sekvencija pomoću alata bPPTP sljedovi se odvajaju u 4 skupine. Sekvencijama je dodijeljeno 7 BIN-ova (AAC8185, AAO1569, AAC8183, AAO1568, AAC8185, AAM2370, AAM2371).

Iz topologije filogenetskog stabla (Slika 14.A) uočava se podjela u 6 grupa (označene oznakama G1-G6) s podržanošću većom od 70 %. Podjela je u skladu s particijima dobivenim metodom ASAP (*p-distance* i *Kimura* (K80) ts/tv). Grupa G1 obuhvaća haplotip iz Rusije, grupa G2 sljedove uzoraka iz Portugala, a grupa G3 sljedove uzoraka iz Španjolske (Slika 14.C). Na području Portugala prikupljena je i sekvencija iz grupe G5 koja je od portugalskih uzoraka grupe G2 udaljena velikim brojem mutacijskih koraka. Grupa G4 obuhvaća uzorke prikupljene širom Europe (Austrija, Grčka, Norveška, Rumunjska, Njemačka, Finska, Španjolska, Francuska, Norveška i Hrvatska), uključujući i sekvenciju uzorka s Medvednice. Grupa G6 obuhvaća sljedove uzoraka prikupljeni na području Francuske i Španjolske. Sve grupe međusobno su odvojene većim brojem mutacijskih koraka. Najveći broj mutacijskih koraka (Slika 14.B) zabilježen je između grupa G1 i G6 i iznosi 110, a najmanji između grupa G4 i G5 te iznosi 18.

Raspon unutarvrnsne nekorrigirane odvojene genetske udaljenosti za vrstu *Philopotamus montanus* (Tablica 10) je u intervalu od 0,15 % do 13,53 %. Maksimalna vrijednost genske udaljenosti zabilježena je za haplotipove KKCAD519-09 (G6) i HMTRI447-09 (G1). Grupa G1 (haplotip HMTRI447-09) najviše je odvojena od ostalih grupa, s vrijednosti genske udaljenosti od 12,31 % do 13,53 %. Najmanja genska udaljenost zabilježene je između grupa G5 i G6 i iznosi od 2,74 % do 2,89 %. Unutar grupa, najveća genska udaljenost iznosi 2,13 %.



Slika 14. Filogeografska analiza populacija vrste *Philopotamus montanus* temeljena na genskom bilježu *COI* duljine 658 pb. **A** - ML filogenetsko stablo. Terminali filogenetskog stabla odgovaraju BOLD identifikacijskim oznakama prema Tablici P12, odnosno terenskim brojevima za jedinice prikupljene u ovom istraživanju (oznaka zvjezdica). Brojevi na čvorovima prikazuju podržanost grana (*bootstrap* vrijednosti), a grane s podržanošću većom od 70% smatraju se pouzdanima. Duljina grana sukladna je broju supstitucijskih promjena. Obojenost kodova označava podjelu vrste na grupe/linije prema podržanosti u filogenetskom stablu. Stupci u nijansama sive

predstavljaju rezultate primjene metoda razgraničavanja vrsta, redosljedom: ASAP – uz primjenu p-udaljenosti kao parametra, ASAP – uz primjenu modela *Kimura* (K80), ABGD – uz primjenu modela *Kimura* (K80), te rezultati metode bPTP i dodjeljivanja BIN-ova u okviru BOLD baze. Kao vanjske grupe za ukorjenjivanje stabla korišteni su slijedovi gena *COI* vrsta *Glossosoma discophorum* (CROAA004-18) i *Hydroptila spatulata* (AVMTT004-09) preuzeti iz BOLD baze. **B** – Filogenetska mreža dobivena metodom statističke parsimonije (TCS mreža). Veličina krugova u TCS mreži odgovara učestalosti haplotipova, crne točke predstavljaju haplotipove koji nedostaju (neuzorkovane ili izumrle haplotipove), dok okomite crtice označavaju broj mutacijskih koraka. Boja grupa odgovara obojenosti kodova u filogenetskom stablu. **C** – Geografska distribucija analiziranih haplotipova prema Tablici P6. Koordinate su preuzete iz baza BOLD i GenBank. Obojenost pojedine koordinate odgovara bojama grupa iz filogenetskog stabla i mreže. Položaj grupe G1 (Rusija) nije označen na karti.

Tablica 10. Rasponi unutarvrstnih nekorrigiranih udvojenih genetskih udaljenosti (engl. *p-distance*, *uncorrected pairwise distance*) unutar i između grupa G1-G6 vrste *Philopotamus montanus* odvojenih na filogenetskom stablu i mreži (Slike 14.A i 14.B). Maksimalna genska udaljenost unutar grupa označena je žutom bojom, a raspon genske udaljenosti između grupa bijelom

	G1	G2	G3	G4	G5	G6
G1	0 %					
G2	12,31 % - 12,61 %	1,06 %				
G3	12,61 % - 12,92 %	7,75 % - 8,66 %	2,13 %			
G4	12,31 % - 12,61 %	4,10 % - 6,38 %	4,10 % - 5,62 %	1,98 %		
G5	12,46 %	8,21 % - 8,36 %	5,78 % - 6,28 %	2,74 % - 4,10 %	0 %	
G6	13,22 % - 13,53 %	8,51 % - 8,81 %	5,62 % - 5,93 %	3,65 % - 4,71 %	2,74 % - 2,89 %	0,46 %

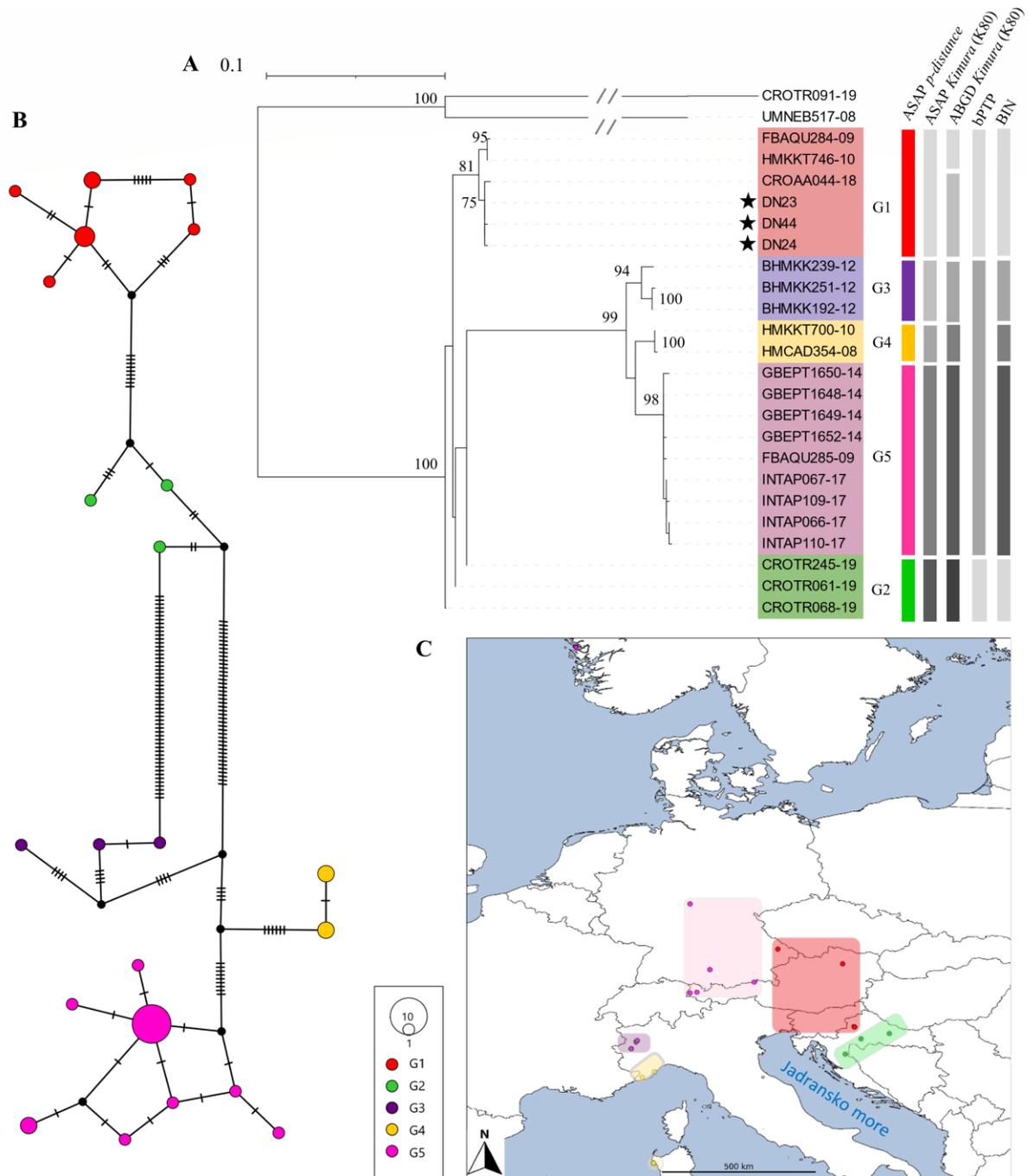
4.2.4 *Wormaldia occipitalis*

Prema metodi ASAP i uz primjenu modela *p-distance* sljedovi se s najvećom vjerojatnošću grupiraju u 5 grupa (vrijednost *asap-score* = 3,00), odnosno u dvije grupe (vrijednost *asap-score* = 3,50). Koristeći model *Kimura* (K80) ts/tv haplotipovi se grupiraju na identičan način, tj. u 5 ili u dvije grupe (vrijednost *asap-score* za obje podjele iznosi 3,00). Analizom sljedova pomoću alata ABGD prema modelu *Kimura* (K80) ts/tv sekvencije se grupiraju u 6 skupina pri vrijednostima maksimalne udaljenosti $P = 1,67^{-3}$ i $P = 2,78^{-3}$, odnosno u 4 grupe pri vrijednosti maksimalne udaljenosti $P = 2,15^{-2}$. Analizom sljedova pomoću alata bPTP sekvencije se grupiraju u dvije skupine. Algoritam baze podataka BOLD haplotipovima dodjeljuje 4 BIN-a (AAE2349, AAE2350, AAE2351, ABY2282).

Iz topologije filogenetskog stabla (Slika 15.A) uočava se podjela u 5 grupa, označene oznakama G1-G5 s podržanošću većom od 70 %, od kojih se posljednja (G2) sastoji od 3 zasebne monofiletske linije (uzorci CROTR068-19, CROTR061-19, CROTR245-19) odvojene sa slabom podržanošću i malih duljina grana. Grupe G1 i G2 obuhvaćaju uzorke iz Hrvatske, uz po jedan uzorak iz Njemačke i Italije (grupa G1), grupe G3 i G4 obuhvaćaju uzorke iz Italije, a grupa G5 uzorke iz Austrije, Njemačke i Norveške (Slika 15.C). Unutar grupe G1 postoje dvije podgrupe odvojene s velikom podržanošću od 81 %, na način da su uzorci iz Hrvatske odvojeni od onih iz Austrije i Njemačke.

Grupe haplotipova odvojene na filogenetskom stablu odgovaraju grupama koje se odvajaju i na filogenetskoj mreži (Slika 15.B). Grupe su odvojene različitim brojem mutacijskih koraka. Grupe G1 i G5 odvajaju najveći, a grupe G1 i G2 najmanji broj (9) mutacijskih koraka.

Vrijednost unutarvrzne nekorigirane odvojene genske udaljenosti za vrstu *Wormaldia occipitalis* (Tablica 11) doseže 9,76 %. Maksimalna unutarvrсна udaljenost zabilježena je između grupa G1 (haplotip CROTR068-19) i G5 (haplotip FBAQU285-09). Unutar grupa najveća genska udaljenost iznosi 1,37 %. Najmanja genska udaljenost je između grupa G1 i G2 (1,83 % - 2,74 %), te su navedene linije od ostalih grupa udaljene genskom udaljenošću višom od 8 % (8,10 % - 9,76 %).



Slika 15. Filogeografska analiza populacija vrste *Wormladia occipitalis* temeljena na genskom biljevu *COI* duljine 658 pb. **A** - ML filogenetsko stablo. Terminali filogenetskog stabla odgovaraju BOLD identifikacijskim oznakama prema Tablici P13, odnosno terenskim brojevima za jedinice prikupljene u ovom istraživanju (oznaka zvjezdica). Brojevi na čvorovima prikazuju podržanost grana (*bootstrap* vrijednosti), a grane s podržanošću većom od 70% smatraju se pouzdanima. Duljina grana sukladna je broju supstitucijskih promjena. Obojenost kodova označava podjelu vrste na grupe/linije prema podržanosti u filogenetskom stablu. Stupci u nijansama sive predstavljaju rezultate primjene metoda razgraničavanja vrsta, redoslijedom: ASAP – uz primjenu *p*-udaljenosti kao parametra, ASAP – uz primjenu modela *Kimura (K80)*, ABGD – uz primjenu modela *Kimura (K80)*, te rezultati metode bPTP i dodjeljivanja BIN-ova u okviru BOLD baze. Pravokutnici ispod oznaka bPTP i BIN koji

predstavljaju grupe G1 i G2 identične su boje te označavaju da grupe G1 i G2 pripadaju istoj particiji prema navedenim metodama. Kao vanjske grupe za ukorjenjivanje stabla korišteni su slijedovi gena *COI* vrsta *Hydropsyche instabilis* (CROTR091-19) i *Leptonema salvini* (UMNEB517-08) preuzeti iz BOLD baze. **B** – Filogenetska mreža dobivena metodom statističke parsimonije (TCS mreža). Veličina krugova u TCS mreži odgovara učestalosti haplotipova, crne točke predstavljaju haplotipove koji nedostaju (neuzorkovane ili izumrle haplotipove), dok okomite crtice označavaju broj mutacijskih koraka. Boja grupa odgovara obojenosti kodova u filogenetskom stablu. **C** – Geografska distribucija analiziranih haplotipova prema Tablici P6. Koordinate su preuzete iz baza BOLD i GenBank. Obojenost pojedine koordinate odgovara bojama grupa iz filogenetskog stabla i mreže.

Tablica 11. Rasponi unutarvrstnih nekorigiranih udvojenih genetskih udaljenosti (engl. *p-distance*, *uncorrected pairwise distance*) unutar i između grupa G1-G5 vrste *Wormaldia occipitalis* odvojenih na filogenetskom stablu i mreži (Slike 15.A i 15.B). Maksimalna genska udaljenost unutar grupa označena je žutom bojom, a raspon genske udaljenosti između grupa bijelom

	G1	G2	G3	G4	G5
G1	1,22 %				
G2	1,83 % - 2,74%	1,22 %			
G3	8,23 % - 8,84 %	8,10 % - 9,20 %	1,37 %		
G4	8,54 % - 8,99 %	8,23 % - 9,30 %	2,74 % - 3,05%	0,15 %	
G5	8,84 % - 9,45%	8,38 % - 9,76 %	2,91 % - 3,51 %	2,44 % - 2,91 %	0,61 %

5. Rasprava

Obalčari (Plecoptera) i tulari (Trichoptera) jedni su od organizama najosjetljivijih na promjene u kvaliteti vodenih staništa u kojima obitavaju. Dio su EPT skupine koja se upravo zbog niske otpornosti na onečišćenja smatra bioindikatorskom skupinom u studijama kakvoće vode i praćenja negativnog antropogenog utjecaja na okoliš. Paralelnom upotrebom metoda DNA barkodiranja i morfološke determinacije, primjenom tzv. integrativne taksonomije, utvrđeno je prisustvo 14 vrsta tulara i 14 vrsta obalčara, čime je po prvi puta dobiven uvid u bioraznolikost faune obalčara i tulara na području Parka prirode Medvednica.

Kroz filogenetske i filogeografske analize odabranih vrsta obalčara i tulara određeno je postoji li genska posebnost (uniformnost ili odvojenost) populacija prikupljenih na području Parka prirode Medvednica i razlikuju li se od ostalih europskih populacija na molekularnoj razini. Razlike i sličnosti utvrđene su korištenjem genskog biljega *COI* koji se smatra najboljim biljegom za utvrđivanje međuvrskih i unutarvrskih odnosa srodnih vrsta životinjskog svijeta (Hebert i sur., 2003b; Rodrigues i sur., 2017; Souza i sur., 2016). Korištenjem metoda za razgraničavanje vrsta (ASAP *p-distance*, ASAP *Kimura* (K80), ABGD *Kimura* (K80), bPTP, BIN) i analizirajući topologiju filogenetskih stabala (ML) i filogenetskih mreža (TCS), vrste su odijeljene na potencijalne buduće vrste (eng. *putative species*). Detaljne rasprave o razgraničenjima vrsta dane su u narednim poglavljima.

5.1 Kriptična raznolikost vrsta tulara *Limnephilus flavicornis*, *Philopotamus montanus*, *Wormaldia occipitalis* i vrste obalčara *Isoperla grammatica*

Kriptične vrste predstavljaju vrste koje ne pokazuju različitosti u morfološkim karakteristikama, no prema filogenetičkim se analizama odvajaju u zasebne, najčešće monofiletske linije. Nakon filogenetičkih analiza jedinke se često ponovno morfološki determiniraju kako bi se utvrdile razlikovne značajke, no za opisivanje novih vrsta primjenom integrativne taksonomije, a na temelju preliminarnih analiza koje su ukazale na prisutnost kriptičnih vrsta, potreban je dodatan materijal, povećan opseg terenskog istraživanja i utvrđivanje varijabilnosti na razini vrste (Pauls i sur., 2010). Rezultati filogenetskih analiza sugeriraju na postojanje kriptične raznolikosti unutar vrsta tulara *Limnephilus flavicornis*, *Philopotamus montanus*, *Wormaldia occipitalis* i vrste obalčara *Isoperla grammatica*.

5.1.1 Potencijalna simpatrijska specijacija vrste tulara *Limnephilus flavicornis*

Haplotipovi vrste *Limnephilus flavicornis* (Limnephilidae) odijeljeni su u 3 grupe, od kojih jedna (G3) pokazuje značajnu divergenciju od ostalih (Slika 13). Navedena skupina obuhvaća uzorke sa sjevera Europe i od ostalih je sekvencija udaljena genskom udaljenosti od minimalno 8,97 %. Literaturni podaci za rod *Limnephilus* pokazuju da je međuvrsna genska udaljenost u intervalu od 3,46 % do 11,58 % (Zhou i sur., 2010). Uzevši u obzir i činjenicu da maksimalna zabilježena unutarvrsna genska udaljenost za rod *Limnephilus* iznosi 4,01 % (Zhou i sur., 2010), grupa G3 predstavlja potencijalno novu vrstu. Ovi podaci sugeriraju da vrsta *Limnephilus flavicornis* pokazuje kriptičnu raznolikost. Grupa G2 proširena je širom Europe i unutar nje uzorci s Medvednice ne pokazuju divergenciju. Prostorno, areal grupe G3 preklapa se s arealom grupe G2, što sugerira potencijalnu simpatrijsku specijaciju. Simpatrijska specijacija može biti rezultat kompeticije za resurse (Dieckmann i Doebeli, 1999) i preferencijalnog križanja (Kondrashov i Kondrashov, 1999). Za potvrdu kriptične raznolikosti potrebno je napraviti dodatne morfološke analize uzoraka koji su obuhvaćeni haplotipovima LEFIJ3217-15 i TRIFI1234-15 (grupa G3) te ih usporediti s uzorcima grupe G2. Najučestaliji i najrasprostranjeniji haplotipovi čine grupu G2, koja najvjerojatnije čini ishodišnu liniju ove vrste. Mali, ali značajan broj mutacijskih koraka turopoljskog uzorka (G1, CROAA009-18) u odnosu na grupu G2 sugerira početnu fazu divergencije podvrste unutar vrste *Limnephilus flavicornis*.

5.1.2 Filogeografska kompleksnost i alopatrijska specijacija vrste *Philopotamus montanus*

Rezultati istraživanja filogenetskih i filogeografskih odnosa populacija vrste *Philopotamus montanus* (Philopotamidae) ukazuju na filogeografski iznimno kompleksnu i strukturiranu vrstu te je ustanovljeno postojanje 6 grupa (Slika 14). Najveće odstupanje od ostalih grupa pokazuje ruski uzorak (G1, HMTRI447-09). Dobivena genska udaljenost iznad 12,31 % veća je od prosječne međuvrsne udaljenosti za tulara (12,21 %, Zhou i sur., 2010), što implicira na kriptičnu raznolikost roda *Philopotamus*. Neobičan rezultat predstavljaju uzorci iz Portugala jer su grupirani u dvije filogenetski vrlo odvojene grupe (G2 i G5), s genskom udaljenosti (8,21 % - 8,36 %) koja je puno viša od prosječne (0,98 %, Zhou i sur., 2010), ali i standardno primjenjivane konzervativne vrijednosti unutarvrsne udaljenosti od 2 % (Kučinić i sur., 2020; Hebert i sur., 2003b). Iznadprosječna unutarvrsna genska udaljenost opažena je

između svih divergentnih grupa (G1-G6, Tablica 21). Grananje prikazano na stablu (Slika 14.A) podržava odvojenost grupa većim brojem mutacijskih koraka što je prikazano i na filogenetskoj mreži (Slika 14.B), te implicira na postojanje divergentnih podvrsta vrste *Philopotamus montanus*. Odijeljenost grupa u skladu je i s njihovom geografskom odvojenošću, što je u skladu s teorijom alopatrijske specijacije. Za jasniji uvid u odnose unutar roda *Philopotamus* potrebno je provesti taksonomsku reviziju roda kako bi se utvrdilo postoji li kriptična raznolikost te kako bi se standardizirale unutarvrzne i međuvrsne genske udaljenosti.

5.1.3 Unutarvrсна genska raznolikost vrste *Wormaldia occipitalis*

Wormaldia occipitalis (Philopotamidae) pokazuje visoku filogenetsku i filogeografsku strukturiranost. Ustanovljeno je postojanje 5 grupa (Tablica 19) koje se mogu rasporediti u 2 veće skupine (G1-G2 i G3-G5). Genska udaljenost između navedene dvije grupe je u intervalu od 8,10 % do 9,76 % što iznosi više od standardne unutarvrzne genske udaljenosti unutar reda (2 %) (Zhou i sur., 2010; Kučinić i sur., 2020; Hebert i sur., 2003b), ali unutar intervala za standardnu međuvrsnu gensku udaljenost (11 %) (Hebert i sur., 2003b). Filogenetska odvojenost prati geografsku distribuciju te se uzorci iz Hrvatske grupiraju zasebno (G1 i G2) u odnosu na većinu ostalih. Iz trenutno dostupnih podataka nije moguće odrediti radi li se u podvrstama vrste *Wormaldia occipitalis* ili o kriptičnoj raznolikosti ovog roda.

5.1.4 Genska strukturiranost i unutarvrсна varijabilnost vrste *Isoperla grammatica*

Istraživanja filogenetskih i filogeografskih odnosa, kao i morfološke varijabilnosti populacija obalčara vrste *Isoperla grammatica* (Perlodidae) ukazuju na to da se radi o iznimno strukturiranoj vrsti. Ustanovljeno je postojanje 6 grupa koje su odvojene i filogenetski i filogeografski. Skupine su geografski definirane: Hrvatska (G1, G2), Švicarska (G4), Italija (G5), Austrija (G6). Posljednja grupa (G3) objedinjuje uzorke iz više država koje povezuje alpska regija (Slovenija, Italija, Austrija i Njemačka). Velika genska raznolikost potvrđena je rezultatom da se uzorci iz Hrvatske grupiraju u dvije odvojene grupe (*p-distance* u intervalu 9,02 % - 10,3 %). Iako je područje koje zauzima Hrvatska malo, grupe se razlikuju po nadmorskoj visini na kojoj su jedinke uzorkovane: jedinke jedne grupe uzorkovane su na području Parka prirode Medvednica (G2), dok su jedinke druge grupe uzorkovane u nizinskoj Hrvatskoj (G1). Uzorci s alpskih prostora genetski su srodniji nizinsko-hrvatskoj liniji nego

uzorcima prikupljenima na Medvednici. Takav filogeografski odnos može sugerirati iznimnu posebnost i izoliranost populacije *Isoperla grammatica* na Medvednici ili postojanje nove vrste koju čine upravo uzorci prikupljeni ovim istraživanjem. Kako su vrijednosti genske udaljenosti između populacije s Medvednice i svih ostalih grupa u intervalu od 7,93 % do 10,4 %, što je više od maksimalne unutarvrstne genske udaljenosti zabilježene unutar roda *Isoperla* (7,82 %) (Hlebec i sur., 2021), moguće je da uzorci s Medvednice predstavljaju još do sada neopisanu vrstu. Talijanski uzorci od ostalih se grupa razlikuju u genskoj udaljenosti od 9,33 % do 11,7 %, zbog čega bi se i navedeni uzorci mogli smatrati potencijalno novom vrstom. Prosječna unutarvrstna genska udaljenost zabilježena za rod *Isoperla* iznosi 2,6 %, a prosječna udaljenost od najbližeg srodnika iznosi 9,5 % (Gill i sur., 2015). S obzirom da u interval genskih udaljenosti talijanskih (G5) i hrvatskih (G1) uzoraka ulazi najmanja prosječna međuvrstna genska udaljenost za rod *Isoperla*, dodatno se sugerira kriptična raznolikost vrste *Isoperla grammatica* i postojanje novih vrsta. Za jasnije razumijevanje filogenetskih odnosa vrste *Isoperla grammatica* potrebna je taksonomska revizija roda *Isoperla*.

5.2 Genska homogenost vrsta tulara *Hydropsyche contubernalis* i vrsta obalčara *Brachyptera seticornis*

Hydropsyche contubernalis (Hydropsychidae) molekularnom je filogenijom razgraničen na 2 grupe koje nisu geografski strukturirane (Slika 12). Uzorci prikupljeni u Mongoliji svrstavaju se u grupu zajedno s uzorcima iz Hrvatske i ostatka Europe (Njemačka, Mađarska, Belgija) što ukazuje na vrlo široki areal ove vrste. Uzevši u obzir prosječnu unutarvrstnu gensku udaljenost za Trichoptera od 0,98 % i maksimalnu zabilježenu u porodici Hydropsychidae od 5,25 % (Zhou i sur., 2010), maksimalna genska udaljenost unutar vrste *Hydropsyche contubernalis* od 1,52 % sa sigurnošću potvrđuje uniformnost ove vrste.

Obalčar vrste *Brachyptera seticornis* (Taeniopterygidae) podijeljen je u 3 grupe s maksimalnom genskom udaljenošću od 2,43 % (Slika 8, Tablica 15). Haplotipovi su udaljeni manjem brojem evolucijskih koraka, što ukazuje na to da se radi o genetski homogenoj vrsti. Dio hrvatskih uzoraka prikupljenih na području Medvednice s jedne se strane grupira s uzorcima prikupljenim u Njemačkoj i Švicarskoj (G3), dok se s druge strane grupira s uzorcima prikupljenim u Bugarskoj i Srbiji (G1). Prijelaznu populaciju između grupa iz Središnje i Jugoistočne Europe čine preostale jedinice iz Hrvatske prikupljene na područjima Medvednice i Zrinske gore. S obzirom na rezultate filogeografskih analiza dobivenih ovim istraživanjem,

može se pretpostaviti da je središnje-eurovska linija nastala divergencijom iz jugoistočno-eurovske linije (Slika 8.A), te da se migracija vrste *Brachyptera seticornis* odvijala s istoka Europe prema zapadu.

5.3 Analiza obalčara iz roda *Leuctra*

Iz roda *Leuctra* (Leuctridae) analizirani su obalčari vrsta *Leuctra braueri*, *Leuctra prima* i neopisana vrsta *Leuctra* sp. ZB. Vrsta *Leuctra braueri* podijeljena je u 3 grupe s maksimalnom genskom udaljenošću od 2,15 % (Slika 9, Tablica 12). Nalaz *Leuctra braueri* predstavlja prvi nalaz ove vrste za faunu Hrvatske. Geografska udaljenost uzoraka iz Središnje Europe (G1, G3) od hrvatskih uzoraka (G2) rezultirala je odvojenošću ovih linija i na molekularnoj razini. Manji broj mutacijskih koraka i niske genske udaljenosti unatoč geografskoj odvojenosti linija impliciraju divergenciju ove vrste kasnije u evolucijskoj prošlosti. Analiza filogenetske mreže ukazuje da hrvatski uzorci predstavljaju evolucijsko ishodište srednje-eurovske liniji (Slika 9.A) što potencijalno implicira na migraciju vrste *Leuctra braueri* s istoka ili juga Europe prema zapadu. Kako se smatra da su obalčari Europu nastanili migracijom iz Azije (Sivec, I. usmeno priopćenje, 21. lipnja 2022.), navedeni rezultat može se smatrati filogenetskom potvrdom teorije načina širenja areala.

Potvrđena je odvojenost neopisane vrste *Leuctra* sp. ZB od vrste *Leuctra prima*. Prosječna genska udaljenost između najbližih vrsta u redu Plecoptera iznosi 11,56 % (Zhou i sur., 2010), što je u skladu s rezultatima dobiven za *L. prima* i *L.* sp. ZB (12,02 % - 13,55 %). Većina metoda (ASAP *p-distance*, ASAP *Kimura* (K80), ABGD *Kimura* (K80), bPTP) razgraničava neopisanu vrstu *Leuctra* sp. ZB na dvije linije (uzorak s Medvednice i uzorak sa Žumberka), no u bazi podataka BOLD dodijeljen im je zajednički BIN. Kako su uzorci odvojeni većim brojem mutacijskih koraka, pokazana je visoka genska raznolikost ove neopisane vrste s područja Hrvatske. Uz morfološku sličnost s vrstom *Leuctra prima*, jedinka pokazuje sličnost s vrstama *Leuctra dalmoni*, *Leuctra carpathica* i *Leuctra signifera* koje su rasprostranjene na području srednje Europe i Alpa (Vincon i Múranyi, 2007; Andrikovics i Múranyi, 2001; Kovács, 2006). Manjak molekularnih podataka ovih vrsta onemogućuje determinaciju prikupljenih jedinki do razine vrste. Determinacija izvorno prikupljene jedinke *Leuctra* sp. ZB (CROPL248-21) iz istih razloga nije bila moguća (Hlebec i sur., 2022). S obzirom da su jedini barkodirani predstavnici pronađeni na području Hrvatske, riječ je vjerojatno o endemskoj vrsti sjeverozapadne Hrvatske. Detaljnijom morfološkom obradom,

umnažanjem više genskih biljega i prikupljanjem većeg broja jedinki bit će moguće opisati ovu vrstu. Dodatno, sekvenciranjem jedinki koje pripadaju vrstama *Leuctra dalmoni*, *Leuctra carpathica* i *Leuctra signifera* omogućit će se određivanje srodnosti s neopisanim jedinkama *Leuctra* sp. ZB. Vrsta *Leuctra prima* razgraničena je u 2 grupe koje ne pokazuju specifičan obrazac geografske rasprostranjenosti.

Filogenetski odnosi između vrsta iz roda *Leuctra* u velikom broju slučajeva nisu razriješeni i dolazi do preklapanja unutarvrstnih genskih udaljenosti (eng. *p-value*) s međuvrstnim (Vitecek i sur., 2017; Hlebec i sur. 2022). Problem u određivanju srodnosti je i manjak genetskih podataka za sve opisane vrste ovog roda, kao što je slučaj s vrstama *Leuctra dalmoni*, *Leuctra carpathica* i *Leuctra signifera*. Međutim, u rezultatima ovog istraživanja za vrstu *Leuctra braueri* nije došlo do preklapanja unutarvrstnih genskih udaljenosti, što ukazuje na razriješene odnose među analiziranim vrstama i ne sugerira postojanje kriptičnih vrsta. S druge strane, za vrstu *Leuctra prima* ne može se tvrditi razriješenost unutarvrstnih i međuvrstnih odnosa jer nije moguća genetska usporedba s vrstama koje dijele morfološke značajke s ovom vrstom.

5.4 Filogenetska posebnost uzoraka prikupljenih na području Parka prirode Medvednica

Filogenetske i filogeografske analize odabranih vrsta obalčara dokazuju gensku posebnost svih vrsta (*Brachyptera seticornis*, *Isoperla grammatica*, *Leuctra braueri* i *Leuctra* sp. ZB), osim vrste *Leuctra prima* prikupljenih na istraživanom području Medvednice.

Topologija filogenetskog stabla vrste *Brachyptera seticornis* ukazuje na podrijetlo srednjoeuropskih uzoraka s istoka Europe. Prilikom širenja populacije s istoka prema zapadu Europe, na Medvednici se oformila prijelazna populacija između grupa iz Središnje Jugoistočne Europe. Isti obrazac topologije filogenetskog stabla uočava se kod vrste *Leuctra braueri*. Najistočniji uzorci ove vrste prikupljeni su na području Medvednice i na filogenetskom se stablu izdvajaju kao izvorna linija ostalih srednjoeuropskih populacija.

Jedinke vrste *Leuctra braueri*, *Isoperla grammatica* i neopisane vrste *Leuctra* sp. ZB koje nastanjuju Medvednicu pokazuju gensku odvojenost od ostalih uzoraka prikupljenih u Srednjoj Europi (Njemačka, Austrija, Švicarska, Italija) i Hrvatskoj.

Populacije tulara prikupljene na području Medvednice ne pokazuju izražen filogeografski uzorak i odvojenost od uzoraka iz ostatka Europe. Kao krilati kukci, tulari mogu lako prolaziti veće udaljenosti te pojedine vrste mogu biti rasprostranjene na području cijele Europe i šire. Stoga ne postoje genetske specifičnosti usko vezane uz pojedine geografske regije i većina uzoraka analiziranih vrsta pokazuje homogenu gensku strukturu. Nasuprot tome, obalčari su loši letači (Popijač, 2007), zbog čega populacije ostaju na određenom području bez značajnog preklapanja s ostalim populacijama drugih staništa, što rezultira velikom stopom endemizma, nakupljanjem mutacija i alopatrijskom specijacijom.

5.5 Metoda DNA barkodiranja u istraživanju bioraznolikosti i konzervacijskoj biologiji

Vrste obalčara i tulara određene morfološkom determinacijom u ovom se istraživanju poklapaju s rezultatima dobivenim metodom DNA barkodiranja, što potvrđuje učinkovitost ove metode u analizama navedenih redova na području Hrvatske. Za povezivanje morfološki determiniranih jedinki sa DNA barkodovima i provođenje analiza bioraznolikosti, prvenstveno genske, ključna je sveobuhvatnost baze podataka za željenu skupinu na istraživanom području. Korištene baze podataka (BOLD, GenBank) pružale su dovoljnu količinu informacija za precizno određivanje jedinki tulara i obalčara do razine vrsta. Od 46 jedinki kojima je određen DNA barkod, nije bilo moguće precizno determinirati vrstu jedne jedinke (DN71a, *Leuctra* sp. ZB).

Međutim, metoda nailazi i na nekoliko problema. Jedno od glavnih pitanja u kontekstu metode DNA barkodiranja i određivanja taksona je postoji li uopće mogućnost jednoznačnog razgraničavanja vrsta (DeWalt, 2011). Određene vrste pokazuju veću unutarvrstu gensku raznolikost, poput vrsta *Philopotamus montanus*, *Wormaldia occipitalis* i *Isoperla grammatica*, dok druge vrste pokazuju puno nižu unutarvrstu gensku raznolikost, poput *Hydropsyche contubernalis* i *Brachyptera seticornis*. Nadalje, kod istraživanja nepoznatog područja ili skupine organizama, učinkovitost metode je znatno smanjena zbog nepostojanja referentne baze podataka tog areala ili skupine, zbog čega je nužno uključivanje taksonomskih stručnjaka i detaljna morfološka obrada. Dodatno, metodom DNA barkodiranja muzejskog materijala ili nepropisno konzerviranog materijala ne dobiva se puna duljina genskog biljega *COI* pri čemu je znatno smanjen broj sekvencija koje mogu biti uvrštene u filogenetičke analize.

Metoda je omogućila uvid u potencijalnu kriptičnu raznolikost polovice od ukupnog broja analiziranih vrsta: *Limnephilus flavicornis*, *Philopotamus montanus*, *Wormaldia occipitalis* i *Isoperla grammatica* i ukazuje na potrebu za revizijom vrsta *Isoperla grammatica* i *Philopotamus montanus* te na potrebu za detaljnijim taksonomskim analizama upitnih taksona.

Baze podataka BOLD i GenBank mogu se smatrati relevantnim za istraživanje faune tulara i obalčara Europe, a osobito je bogato sekvencirana fauna Središnje i Sjeverne Europe. Kao takva, metoda se pokazala efikasnom i pouzdanom u identifikaciji uzoraka prikupljenih na području Parka prirode Medvednica.

5.6 Usporedba metoda razgraničavanja vrsta korištenih u filogenetskim analizama

U svrhu određivanja zasebnih linija između sekvencija istih vrsta, korištene su metode za razgraničavanje vrsta: ASAP uz primjenu modela *Simple Distance* i *Kimura (K80) ts/tv*, ABGD uz primjenu modela *Kimura (K80) ts/tv*, bPTP i sustav BIN-ova.

Metoda ASAP uz primjenu različitih modela *Simple Distance* i *Kimura (K80) ts/tv* rezultira gotovo identičnim brojem grupa. Navedena metoda sve je uzorke razgraničila u najveći broj potencijalno novih vrsta, što je čini najmanje konzervativnom. Sve vrste korištenjem obaju modela raščlanjene su na isti broj grupa, osim vrsta *Leuctra braueri* i *Philopotamus montanus*, u čijem slučaju je korištenje modela *Simple Distance* rezultiralo jednom particijom više. Prema dobivenim rezultatima, metoda ABGD uz model *Kimura (K80) ts/tv* je konzervativnija metoda. Alat bPTP dijeli uzorke u veći broj particija u odnosu na metodu ASAP jedino u slučaju vrste *Wormaldia occipitalis*. Alat bPTP pokazao se kao najkonzervativnija metoda. Jedino u slučaju vrste *Philopotamus montanus* navedena metoda rezultira većim brojem particija u odnosu na ostale, u ovom slučaju u odnosu na metodu ABGD *Kimura (K80) ts/tv*. Korištenjem metode bPTP dokazana je uniformnost dvije analizirane vrste obalčara (*Brachyptera seticornis*, *Leuctra braueri*) i 2 analizirane vrste tulara (*Hydropsyche contubernalis*, *Limnephilus flavicornis*). Raščlanjivanje prema dodijeljenim BIN brojevima ukazuje na veći broj grupa u odnosu na bPTP, ali metodu čini konzervativnijom u odnosu na ABGD i ASAP.

5.7 Važnost analize bioraznolikosti tulara i obalčara na području Parka prirode Medvednica

Područje Parka prirode Medvednica obilježeno je velikim brojem potoka i izvora, ali i neposrednom blizinom grada Zagreba. Grad Zagreb prati ubrzana urbanizacija prema južnim obroncima Medvednice (Zlatar, 2013), čime gradsko onečišćenje postaje realna mogućnost negativnog utjecaja na slatkovodne tipove staništa i faunu koja u njima obitava.

Manjak prethodnih istraživanja EPT skupine onemogućava uvid u utjecaj onečišćenja tijekom 20. stoljeća koje je pratilo najveći urbani razvoj Zagreba. Broj stanovnika zabilježen 1961. godine (350 829; Nejašmić, 1994) do današnjeg se dana i više nego udvostručio (769 944; Popis stanovništva, kućanstva i stanova 2021), što je potencijalno utjecalo na osjetljivu faunu obalčara i tulara, kao i na njihova staništa.

Ovim istraživanjem dana je prva cjelovita analiza molekularnih značajka obalčara i tulara na području Medvednice, kao i osnova za daljnja sistematska istraživanja faune ovih dviju skupina na širem području Parka prirode. Stvoren je temelj za buduće analize antropogenog učinka na okoliš kroz biomonitoring obalčara i tulara na području Parka prirode Medvednica.

6. Zaključci

Na temelju rezultata dobivenih u ovom istraživanju može se zaključiti:

1. kombinacijom metoda DNA barkodiranja i morfološke analize na području Parka prirode Medvednica utvrđeno je prisustvo 14 vrsta tulara i 14 vrsta obalčara,
2. filogenetičke analize vrsta *Limnephilus flavicornis*, *Philopotamus montanus*, *Wormaldia occipitalis* i *Isoperla grammatica* temeljem genskog biljega *COI* pokazuju potencijalnu kriptičnu raznolikost i moguće postojanje novih, još neopisanih vrsta; za navedene su vrste potrebne daljnje filogenetičke analize drugih genskih biljega i detaljnija morfološka karakterizacija svih morfoloških tipova u svrhu identifikacije kriptičnih i novih vrsta,
3. migracija vrsta *Brachyptera seticornis*, *Leuctra braueri* i *Hydropsyche contubernalis* tijekom prošlosti se odvijala s istoka prema zapadu Europe,
4. vrste *Wormaldia occipitalis*, *Isoperla grammatica* i *Philopotamus montanus* karakterizira izražen filogeografski uzorak,
5. nalaz vrste *Leuctra braueri* predstavlja prvi nalaz ove vrste za faunu Hrvatske, a jedna pronađena jedinka roda *Leuctra* pokazuje najveću sličnost s još neopisanom vrstom *Leuctra* sp. ZB,
6. vrste obalčara *Brachyptera seticornis*, *Isoperla grammatica*, *Leuctra braueri* i *Leuctra* sp. ZB s Parka prirode Medvednica karakterizira genska posebnost u odnosu na ostale europske populacije,
7. metoda DNA barkodiranja pokazala se kao precizna i efikasna metoda determinacije vrsta obalčara i tulara s područja Parka prirode Medvednica,
8. baze BOLD i GenBank obogaćene su s 46 nove sekvencije genskog biljega *COI*, od čega 25 pripada primjercima iz reda obalčari i 21 primjercima iz reda tulari; unesene sekvencije svrstane su u 23 već postojeće BIN skupine unutar baze BOLD, a dvjema su dodijeljene nove BIN oznake (*Plectrocnemia conspersa*, *Limnephilus flavicornis*).

U konačnici, može se zaključiti da je hipoteza postavljena na početku istraživanja djelomično potvrđena. Među jedinkama istih vrsta prikupljenih na području Parka prirode Medvednica ne postoji značajna unutarvrstna genetska raznolikost, s obzirom da se radi o malom području istraživanja. Značajne međuvrstne genetske razlike zabilježene su između obrađenih vrsta unutar roda *Leuctra*. Istraživanjem je uočena razlika između sastava populacija

i vrsta na pojedinim lokalitetima, osobito za skupinu obalčara. Za detaljnija istraživanja faune i bioraznolikosti redova obalčara i tulara potrebno je provesti sveobuhvatno terensko istraživanje na većem broju lokaliteta te u češćim vremenskim intervalima.

7. Zahvale

Zahvaljujemo se prof. dr. sc. Mladenu Kučiniću, na pruženoj mogućnosti rada na ovom istraživanju i velikom povjerenju od početka studija. Zahvalni smo mu na pomoći i savjetima u provedbi eksperimentalnog dijela istraživanja i poticajima prilikom pisanja rada.

Posebnu zahvalu upućujemo dr. Ignacu Sivecu na svim savjetima, izrazitoj susretljivosti i prenošenju širokog znanja o obalčarima.

Najveću zahvalu dugujemo Dori Hlebec, mag. educ. biol. et chem. bez koje ovaj rad ne bi bio moguć. Pruženi savjeti, nesebična pomoć i strpljenje bili su nam neizmjerne motivacija i podrška tijekom čitavog istraživanja. Hvala na ogromnoj količini uloženog vremena u rad s nama, divnoj atmosferi uz koju smo usvojili brojna nova znanja i vještine, uspjeli prijeći sve prepreke i riješiti najteže probleme.

Rad je izrađen u okviru projekta „DNA barkodiranje bioraznolikosti hrvatske faune“ (IP-2016-06-9988) financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost.

8. Popis literature

Akamagwuna, F. C., Mensah, P. K., Nnadozie, C. F. i Odume, O. N. (2019). Evaluating the responses of taxa in the orders Ephemeroptera, Plecoptera and Trichoptera (EPT) to sediment stress in the Tsitsa River and its tributaries, Eastern Cape, South Africa. *Environmental Monitoring and Assessment*, 191, 664.

Anamthawat-Jónsson, K. (2012). *Current Topics in Phylogenetics and Phylogeography of Terrestrial and Aquatic Systems*. 1. izdanje. InTech, Rijeka.

Andrikovics S, i Murányi D. (2001). A checklist of stoneflies with remarks of published, undocumented species and two species new to the Hungarian fauna (Insecta: Plecoptera). *Folia Entomologica Hungaric*, 62, 23-35.

Avis, J. C. (2000). *Phylogeography: the history and formation of species*. Ilustrirano izdanje. Harvard University Press, Cambridge MA.

Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A. i Saunders, N. C. (1987). Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18(1), 489-522.

Bakarić, M., Tomašić, F., Zečić, Ž. i Beljan, K. (2021). Specifičnosti gospodarenja privatnim šumama u zaštićenim područjima s osvrtom na Park prirode Medvednica. *Nova mehanizacija šumarstva*, 42(1), 71-78.

Baxevanis, A. D. i Ouellete, B. F. F. (2001). *Bioinformatics: a practical guide to the analysis of genes and proteins*. 2. izdanje. Wiley-Interscience, New York.

Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J. i Sayers, E. W. (2012). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D36-D42.

Boore, J. L. (1999). Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*, 27(8), 1767-1780.

Bouchard, R.W., Jr. (2004). *Guide to aquatic macroinvertebrates of the Upper Midwest*. 1. izdanje. Regents of the University of Minnesota, Minneapolis.

Clement, M., Snell, Q., Walker, P., Posada, D., i Crandall, K. (2002). TCS: estimating gene genealogies. *Parallel and Distributed Processing Symposium, International*, 3, 184.

- Ćukušić, A., Ćuk, R., Previšić, A., Podnar, M., Delić, A. i Kučinić, M. (2017). DNA barcoding and first records of two rare Adicellaspecies (Trichoptera: Leptoceridae) in Croatia. *Biologia*, 72(7), 796-806.
- De Bruyn, A., Martin, D. P., i Lefeuvre, P. (2013). Phylogenetic Reconstruction Methods: An Overview. *Molecular Plant Taxonomy*, 257-277.
- DeWalt, R. E., Ower, G. D. (2019). Ecosystem Services, Global Diversity, and Rate of Stonefly Species Descriptions (Insecta: Plecoptera), *Insects*, 10(4), 99.
- Dieckmann, U., i Doebeli, M. (1999). On the origin of species by sympatric speciation. *Nature*, 400(6742), 354-357.
- Douglas, J. i Kirkpatrick, M. (2017). *Evolution*, 4. izdanje. Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
- Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of molecular evolution*, 17(6), 368-376.
- Fochetti, R. i de Figueroa, J. M. T. (2006). Notes on diversity and conservation of the European fauna of Plecoptera (Insecta). *Journal of Natural History*, 40(41-43), 2361-2369.
- Fochetti, R. i de Figueroa, J. M. T. (2007). Global diversity of stoneflies (Plecoptera; Insecta) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595(1), 365-377.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. i Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294-9.
- Gasparre, G. i Porcelli, A. M. (2020). *The Human Mitochondrial Genome From Basic Biology to Disease*, 1. izdanje. Elsevier Inc., London.
- Gill, B.A., J.B. Sandberg i B.C. Kondratieff. (2015). Evaluation of the morphological species concepts of 16 western Nearctic Isoperla species (Plecoptera: Perlodidae) and their respective species groups using DNA barcoding. *Illiesia*, 11(11), 130-146
- Glime, J. M. (2015). Aquatic Insects: Hemimetabolous Insects-Plecoptera. *Bryophyte Ecology*, 2(11-6), 2.

- Graf, W. i Schmidt-Kloiber, A. (2003). Plecoptera–Steinfliegen. Skriptum zum „Spezialpraktikum Plecoptera. Anleitung zur Bestimmung für Fortgeschrittene“. Institut für Hydrobiologie and Gewässermanagement – BOKU Wien, Beč.
- Grimaldi, D. A. i Engel, M. S. (2005). *Evolution of the insects*, 1. izdanje. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Hebert, P., Cywinska, A., Ball, S.L. i Dewaard, J. (2003a). Biological identification through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 270, 313-321.
- Hebert, P. D., Ratnasingham, S., i deWaard, J. R. (2003b). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological sciences*, 270(Suppl_1), S96-S99.
- Harmel, M., Skender, I., Ćurić Ban, T. i Vugrek Petljak K. (2015). Analiza pritisaka i prijetnji u Parku prirode Medvednica. Hrvatska agencija za okoliš i prirodu, Zagreb.
- Hickin, N. E. (1967). *Caddis Larvae–Larvae of the British Trichoptera*, 1. izdanje. Associated University Presses. Inc., Cranbury.
- Hlebec, D., Podnar, M., Sivec, I., Jalžić, B. i Kučinić, M. (2019). First results of DNA barcoding of Plecoptera (Insecta) and Pseudoscorpiones (Arachnida) in Croatia, 4.12. – 6.12.2019., Innsbruck, Austria (usmeno priopćenje).
- Hlebec, D., Sivec, I., Podnar, M., Skejo, J. i Kučinić, M. (2021). Morphological and molecular characterisation of the Popijač's Yellow Sally, *Isoperla popijaci* sp. nov., a new stenoendemic stonefly species from Croatia (Plecoptera, Perlodidae), *Zookeys*, 1078, 85.
- Hlebec, D., Sivec, I., Podnar, M. i Kučinić, M. (2022). DNA barcoding for biodiversity assessment: Croatian stoneflies (Insecta: Plecoptera). *PeerJ*, 10, e13213.
- Holzenthal, R., Blahnik, R., Prather, A. i Kjer, K. (2007). Order Trichoptera Kirby, 1813 (Insecta), Caddisflies. *Zootaxa*, 1668, 639-698.
- Illies, J., (1955). *Steinfliegen oder Plecoptera. Die Tierwelt Deutschlands*, 43.
- Kaćanski, D. i Zwick, P. (1970). Neue und wenig bekannte Plecopteren aus Jugoslawien. *Mitteilungen der Schweizerischen entomologischen Gesellschaft*, 43, 1-16.

Kondrashov, A. S., i Kondrashov, F. A. (1999). Interactions among quantitative traits in the course of sympatric speciation. *Nature*, 400(6742), 351-354.

Kovács, T. (2006). Data to the Hungarian distribution of Plecoptera. *Folia Historico Naturalia Musei Matraensis*, 30, 181-188.

Kučinić, M., Szivak, I., Pauls, S., Bálint, M., Delić, A. i Vučković, I. (2013). *Chaetopteryx bucar* sp n., a new species from the *Chaetopteryx rugulosa* group from Croatia (Insecta, Trichoptera, Limnephilidae) with molecular, taxonomic and ecological notes on the group. *ZooKeys*, 320, 1-28.

Kučinić, M., Ćukušić, A., Podnar, M., Landeka, M., Plavec, H., Plantak, M., Akimbekova, N. i Žalac, S. (2016). The first record of *Tinodes antonioi* Botosaneanu & Taticchi-Viganò, 1974 (Insecta, Trichoptera) in Croatia with DNA barcoding and ecological data and notice of biodiversity and distribution of the genus *Tinodes* in Croatia. *Natura Croatica*, 25 (1), 131-149.

Kučinić, M., Ćukušić, A., Žalac, S., Delić, A., Cerjanec, D., Podnar, M., Ćuk, R., Vučković, I., Previšić A., Vuković M., Stanić Koštroman S., Bukvić, V., Šalinović, A. i Plantak, M. (2020). Springs: DNA barcoding of caddisflies (Insecta, Trichoptera) in Croatia with notes on taxonomy and conservation biology. *Natura Croatica*, 29 (1), 73–98.

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. i Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947-2948.

Leigh J.W. i Bryant D. (2015). PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), 1110-1116.

Li, W.-H. (1997). *Molecular Evolution*, 1. izdanje. Sinauer Associates, Sunderland.

Letunic I. i Bork P. (2021). Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research*, 49(1), 293-296.

Lunt, D. H., Zhang, D.-X., Szymura, J. M. i Hewlitt, O. M. (1996). The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Molecular Biology*, 5(3), 153-165.

Maddison, W. P. i Maddison, D.R. (2021). Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.70 <http://www.mesquiteproject.org> (pristup: 9. lipnja 2022.)

- Malicky, H. (2004). Atlas of European Trichoptera / Atlas der Europäischen Köcherfliegen / Atlas des Trichoptères d'Europe. 2. izdanje. Springer Dordrecht, Dordrecht.
- Matoničkin, I., Habdija I. i Primc-Habdija B. (1999). Beskralježnjaci - biologija viših avertebrata. 3. prerađeno i dopunjeno izdanje. Školska knjiga, Zagreb.
- Mau, B., Newton, M. A. i Larget, B. (1999). Bayesian phylogenetic inference via Markov chain Monte Carlo methods. *Biometrics*, 55(1), 1-12.
- Miller, M.A., Pfeiffer, W. i Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 1-8.
- Monaghan, M. T., Balke, M., Gregory, T. R. i Vogler, A. P. (2005). DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1925-1933.
- Morse, J. C., Frandsen, P. B., Graf, W., i Thomas, J. A. (2019). Diversity and Ecosystem Services of Trichoptera. *Insects*, 10(5), 125.
- Muranyi, D. (2011). Balkanian species of the genus *Isoperla* Banks, 1906 (Plecoptera: Perlodidae). *Zootaxa*, 3049(1), 1-46.
- Nei, M. i Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. 1. izdanje. Oxford University Press, New York.
- Nejašmić, I. (1994). Populacijski razvitak Zagreba. *Sociologija sela*, 32 (1/2), 1-12.
- Pauls, S. U., Blahnik, R. J., Zhou, X., Wardwell, C. T., i Holzenthal, R. W. (2010). DNA barcode data confirm new species and reveal cryptic diversity in Chilean *Smicridea* (*Smicridea*) (Trichoptera:Hydropsychidae). *Journal of the North American Benthological Society*, 29(3), 1058-1074.
- Popijač, A. (2007). Raznolikost i ekologija obalčara (Insecta: Plecoptera) na području Nacionalnog parka Plitvička jezera i rijeke Cetine. unpublished Ph. D. dissertation.
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S. i Achaz, G. (2012). ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular ecology*, 21(8), 1864-1877.
- Puillandre, N., Brouillet, S. i Achaz, G. (2020). ASAP: Assemble Species by Automatic Partitioning. *Molecular Ecology Resources*.

Popis stanovništva, kućanstava i stanova 2021. – prvi rezultati, Grad Zagreb. (2022) Gradski ured za gospodarstvo, ekološku održivost i strategijsko planiranje, Odjel za statističke i analitičke poslove.

Poulton, B. C., Graham, J. L., Rasmussen, T. J. i Stone, M. L. (2015). Responses of Macroinvertebrate Community Metrics to a Wastewater Discharge in the Upper Blue River of Kansas and Missouri, USA. *Journal of Water Resource and Protection*, 7(15), 1195-1220.

Ratnasingham, S. i Hebert, P. D. N. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes*, 7(3), 355-364.

Ratnasingham, S. i Hebert, P. D. N. (2013). A DNA-Based Registry for All Animal Species: The Barcode Index Number (BIN) System. *PLoS ONE*, 8(7), e66213.

Raušer, J. (1980). Řád Pošvatky - Plecoptera. Klíč vodních larev hmyzu Rozkošný R. (ed.), 86-132.

Ravizza, C. (2002). Atlas of the Italian Leuctridae (Insecta, Plecoptera) with an appendix including Central European species. *Lauterbornia*, 44, 1-42.

Rodrigues, M. S., Morelli, K. A., i Jansen, A. M. (2017). Cytochrome c oxidase subunit 1 gene as a DNA barcode for discriminating *Trypanosoma cruzi* DTUs and closely related species. *Parasites & Vectors*, 10(1).

Saitou, N. i Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.

Schmidt, S., Schmid-Egger, C., Morinière, J., Haszprunar, G. i Hebert, P. D. N. (2015). DNA barcoding largely supports 250 years of classical taxonomy: identifications for Central European bees (Hymenoptera, Apoideapartim). *Molecular Ecology Resources*, 15(4), 985-1000.

Senta Marić, A., Andabaka, D., Zdjelarević, N. (2011). Analiza kakvoće vode potoka Črnc. *Hrvatske vode*, 19(76), 121-126.

Sivec, I. i Stark, B. P. (2002). The Species of Perla (Plecoptera: Perlidae): Evidence from Egg Morphology. *Scoplia, Journal of the Slovenian Museum of Natural History*, Ljubljana, 49, 1-33.

- Souza, H. V., Marchesin, S. R. C., i Itoyama, M. M. (2016). Analysis of the mitochondrial COI gene and its informative potential for evolutionary inferences in the families Coreidae and Pentatomidae (Heteroptera). *Genetics and Molecular Research*, 15(1).
- Stamatakis, A. (2014). RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies. *Bioinformatics*, 30 (9), 1212-1313.
- Swofford, D. L. i Berlocher, S. H. (1987). Inferring evolutionary trees from gene frequency data under the principle of maximum parsimony. *Systematic zoology*, 36(3), 293-325.
- Tamura, K., Stecher, G. i Kumar S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38, 3022-3027.
- Trivedi, S., Rehman, H., Saggu, S., Panneerselvam, C. i Ghosh, S. (2018). DNA Barcoding and Molecular Phylogeny. 1. izdanje. Springer International Publishing, Cham.
- Tszydel, M., Sztajnowski, S., Michalak, M., Wrzosek, H., Kowalska, S., Krucińska, I. i Lipp-Symonowicz, B. (2009). Structure and physical and chemical properties of fibres from the fifth larval instar of caddis-flies of the Species *Hydropsyche angustipennis*. *Fibres and Textiles in Eastern Europe*, 6(77), 7-12.
- Villesen, P. (2007). FaBox: an online toolbox for fasta sequences. *Molecular Ecology Notes*, 7 (6), 965-968.
- Vincon, G. i Múranyi, D. (2007). *Leuctra dalmoni*, a new orophilic species with wide distribution in Europe (Plecoptera). *Nouvelle Revue Francaise*, 23(3), 237-248.
- Vitecek S, Vinçon G, Graf W, Paul SU. (2017). High cryptic diversity in aquatic insects: an integrative approach to study the enigmatic *Leuctra inermis* species-group (Plecoptera). *Arthropod Systematics & Phylogeny*, 75(3), 497-521.
- Wiggins, G.B. (2004). *Caddisflies: The Underwater Architects*. 1. izdanje. University of Toronto Press, Toronto.
- Xiong, J. (2006). *Essential Bioinformatics*. 1. izdanje. Cambridge University Press, Cambridge.
- Zhang J., Kapli P., Pavlidis P. i Stamatakis A. (2013). A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*, 29(22), 2869-2876.

Zhou, X., Kjer, K. M., i Morse, J. C. (2007). Associating larvae and adults of Chinese Hydropsychidae caddisflies (Insecta:Trichoptera) using DNA sequences. *Journal of the North American Benthological Society*, 26(4), 719-742.

Zhou, X., Jacobus, L. M., DeWalt, R. E., Adamowicz, S. J., i Hebert, P. D. N. (2010). Ephemeroptera, Plecoptera, and Trichoptera fauna of Churchill (Manitoba, Canada): insights into biodiversity patterns from DNA barcoding. *Journal of the North American Benthological Society*, 29(3), 814-837.

Zlatař, J. (2013). *Urbane transformacije suvremenog Zagreba*. 1. izdanje. Plejada, Zagreb.

Zwick, P. (2004). Key to the west palaeartic genera of stoneflies (Plecoptera) in the larval stage. *Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters*, 34(4), 315-348.

9. Sažetak

Dora Kermek i Nikola Pischiutta

Integrativni pristup u istraživanju obalčara (Insecta: Plecoptera) i tulara (Insecta: Trichoptera) Parka prirode Medvednica uz komparativnu filogeografsku analizu šire rasprostranjenih vrsta

Redovi obalčara (Insecta: Plecoptera) i tulara (Insecta: Trichoptera), uz vodencvjetove, pripadaju u EPT (Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera) skupinu organizama te se zbog osjetljivosti na onečišćenja smatraju važnim bioindikatorskim organizmima. Istraživanje je po prvi puta provedeno na području Parka prirode Medvednica na čija staništa i vodenu faunu (ponajviše urbanizacijom i promjenom vodotokova) utječe neposredna blizina stanovništva grada Zagreba. Terenskim istraživanjima na 12 lokaliteta prikupljene su 64 jedinke tulara i 101 jedinka obalčara. Odrasle su jedinke determinirane do razine vrsta korištenjem morfoloških ključeva za identifikaciju i, dodatno, primjenom metode DNA barkodiranja. Metoda DNA barkodiranja temelji se na sekvenciranju standardiziranog fragmenta mitohondrijskog gena za podjedinicu I citokrom c oksidaze (*COI*) duljine 658 pb i važna je metoda za utvrđivanje genske raznolikosti i prisutnosti kriptičnih i neopisanih vrsta, povezivanje različitih životnih stadija te ujedno predstavlja temelj za buduća filogenetička i filogeografska istraživanja. Rezultati potvrđuju prisustvo 14 vrsta tulara i 14 vrsta obalčara. Analiza genetske raznolikosti i filogeografskog uzorka populacija obalčara i tulara zabilježenih na području Parka prirode Medvednica provedena je na 8 vrsta sa širim arealom rasprostranjenosti i s većim brojem dostupnih sekvencija u bazama. Filogenetičke analize vrsta *Limnephilus flavicornis*, *Philopotamus montanus*, *Wormaldia occipitalis* i *Isoperla grammatica* ukazuju na unutarvrstu varijabilnost i potencijalnu kriptičnu raznolikost. Nadalje, rezultati ukazuju da je specijacija vrsta *Brachyptera seticornis*, *Leuctra braueri* i *Hydropsyche contubernalis* započela na istoku Europe, nakon čega je uslijedilo širenje areala prema zapadu. Vrste *Wormaldia occipitalis*, *Isoperla grammatica* i *Philopotamus montanus* imaju snažno strukturiran filogeografski uzorak, dok populacije vrsta *Leuctra braueri*, *Isoperla grammatica* i neopisane vrste *Leuctra* sp. ZB prikupljenih na Medvednici, pokazuju gensku odvojenost od svih ostalih populacija. Provedenim istraživanjem stvoren je temelj za buduće proučavanje bioraznolikosti obalčara i tulara te praćenje učinka onečišćenja kroz biomonitoring navedenih skupina.

Ključne riječi: EPT grupa, bioraznolikost, zaštićeno područje, DNA barkodiranje, filogenetička analiza

10. Summary

Dora Kermek i Nikola Pischiutta

An integrative approach to study the stoneflies (Insecta: Plecoptera) and caddisflies (Insecta: Trichoptera) in Medvednica Nature Park with comparative phylogeographic analysis of widely distributed species

The orders of stoneflies (Insecta: Plecoptera) and caddisflies (Insecta: Trichoptera), together with mayflies, belong to the EPT (Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera) group and are considered important bioindicator organisms. The research was conducted for the first time in Medvednica Nature Park, whose habitats and aquatic fauna are affected by the human activity of the Zagreb city population mostly through urbanization and change of watercourses. A total of 64 caddisfly and 101 stonefly specimens were collected at 12 localities. Adult individuals were determined to the species level using morphological identification and, additionally, with DNA barcoding. The DNA barcoding method, based on the sequencing of a standardized mitochondrial gene fragment of cytochrome c oxidase subunit I (*COI*) in the length of 658 bp, is an important tool for determining genetic diversity, presence of cryptic and undescribed species and it also represents the basis for phylogenetic and phylogeographic research. The results confirmed the presence of 14 species of caddisflies and 14 species of stoneflies. The analysis of genetic diversity and phylogeographic structure of populations of stoneflies and caddisflies present in the Medvednica Nature Park was conducted on 8 species with a wider distribution range and with a larger number of sequences available in the databases. Phylogenetic analyses of the species *Limnephilus flavicornis*, *Philopotamus montanus*, *Wormaldia occipitalis*, and *Isoperla grammatica* indicate intraspecific variability and potential cryptic diversity. The speciation of the species *Brachyptera seticornis*, *Leuctra braueri*, and *Hydropsyche contubernalis* began in eastern Europe, followed by the expansion of their distribution to the west. The species *Wormaldia occipitalis*, *Isoperla grammatica*, and *Philopotamus montanus* have a firmly structured phylogeographic pattern, while the populations of *Leuctra braueri*, *Isoperla grammatica*, and undescribed species *Leuctra sp.* ZB show genetic distinctiveness compared to other populations. The conducted research created the basis for future study of the biodiversity of stoneflies and caddisflies, but also for tracking the effect of pollution through biomonitoring of these groups.

Keywords: *EPT group, biodiversity, protected area, DNA barcoding, phylogenetic analysis*

11. Životopis

Dora Kermek

Dora Kermek rođena je 18. ožujka 2001. godine u Čakovcu. Završila je prirodoslovno-matematički smjer Prve gimnazije u Varaždinu kao najbolja maturantica škole i Varaždinske županije. Preddiplomski studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu upisala je 2019. godine i trenutno pohađa treću godinu. Tijekom studija sudjeluje u organizaciji edukativnih radionica za nadarenu djecu u Udruzi Bioteka i provedbi manifestacije *Noć u muzeju* u Prirodoslovnom muzeju u Zagrebu. Rezultate istraživanja koje provodi predstavila je na *3. dinarskom simpoziju o podzemnoj biologiji (2022)*, *Simpoziju studenata bioloških usmjerenja (2022)* i *Međunarodnoj konferenciji o DNA barkodiranju i bioraznolikosti (2022)*. Od 2021. godine članica je Udruge studenata biologije – BIUS te iste godine postaje voditeljicom Sekcije za biospeleologiju. Sudjelovala je u provedbi istraživačko-edukacijskih projekata *Žumberak 2021* i *Histria 2022* te je voditeljica studentskog projekta *Podzemlje Učke 2022*. Aktivno se uključuje u rad Hrvatskog biospeleološkog društva. Uz speleologiju, od hobija ističe ronjenje s bocom i kulinarstvo.

Nikola Pischiutta

Nikola Pischiutta rođen je 2. rujna 2000. godine u Zagrebu. Završio je V. gimnaziju u Zagrebu. Tijekom srednjoškolskog obrazovanja sudjelovao je na državnom Natjecanju iz biologije (2017) u kategoriji istraživačkih radova gdje je osvojio drugo mjesto; te na *Međunarodnoj konferenciji mladih znanstvenika (2018)* gdje je osvojio srebrnu medalju. Dobitnik je nagrade Oskar znanja. Preddiplomski studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu upisao je 2019. godine i trenutno pohađa treću godinu. Tijekom studija sudjeluje u provedbi manifestacije *Noć u muzeju* u Prirodoslovnom muzeju u Zagrebu. Rezultate istraživanja koje provodi predstavio je na *Simpoziju studenata bioloških usmjerenja (2022)* i *Međunarodnoj konferenciji o DNA barkodiranju i bioraznolikosti (2022)*. Od 2021. godine član je Udruge studenata biologije – BIUS. Sudjelovao je u provedbi istraživačko-edukacijskog projekta *Histria 2022* te sudjeluje u studentskom projektu *Podzemlje Učke 2022*. Član je Šahovskog kluba Odra, a uz igranje šaha hobi mu je još i vrtlarjenje.

12. Prilozi

Tablica P1. Popis lokaliteta (L) s pripadnom nadmorskom visinom (NV), koordinatama u sustavu WGS84 (Y - zemljopisna širina, X - zemljopisna duljina), opisom lokaliteta i način prikupljanja uzoraka. Nastavak na idućoj stranici.

L	NV / m	Koordinate		Opis lokaliteta	Način prikupljanja
		Y	X		
1	378	45,865729	15,947999	dno potoka Kraljevec, pokraj staze 13 prema Kraljičinom zdencu, uz potok postoji razvijena vegetacija	pomoću entomološke mrežice ili pincetom s nasumičnih mjesta uz potok (kamenje, drvena klupa u blizini, tlo)
2	496	45,871876	15,942650	središnji dio toka potoka Kraljevec, pokraj staze 13 prema Kraljičinom zdencu, slabije razvijena vegetacija	pomoću entomološke mrežice ili pincetom s nasumičnih mjesta uz potok (mostić preko potoka, tlo)
3	523	45,876077	15,940083	početni dio toka potoka Kraljevec, pokraj staze 13, u blizini Kraljičinog zdenca, slabije razvijena vegetacija	pomoću entomološke mrežice ili pincetom s nasumičnih mjesta uz potok (mostovi na stazi)
4	401	45,878410	15,977430	dno potoka Bliznec, oko 100 m od uprave Parka, bujna vegetacija	pomoću entomološke mrežice ili pincetom ispod kamenja u potoku
5	294	45,843275	15,895981	potok Družinec, ispod slapa Ferendol, uz potok postoji vegetacija	pomoću entomološke mrežice ili pincetom ispod kamenja u potoku
6	504	45,858836	15,884428	Jambrišakovo vrelo, pokraj staze 6, muljevito dno potoka, oko potoka razvijena vegetacija i srednje visoka trava	pomoću entomološke mrežice ili pincetom ispod granja u potoku

Tablica P1. Popis lokaliteta (L) s pripadnom nadmorskom visinom (NV), koordinatama u sustavu WGS84 (Y - zemljopisna širina, X - zemljopisna duljina), opisom lokaliteta i način prikupljanja uzoraka.

L	NV / m	Koordinate		Opis lokaliteta	Način prikupljanja
		Y	X		
7	914	45,898067	15,953112	vrh Leustekovog puta, uz potok Bliznec, oko 20 m od početka Leustekove staze, oko potoka prevladava visoko drveće, niska vegetacija slabije razvijena	ljeti pomoću UV-lampe (noću), zimi ispod kamenja (bez pronađenih jedinki)
8	734	45,888492	15,966056	sredina Leustekovog puta, uz potok Bliznec i stazu na padini, oko potoka prevladava visoko drveće, niska vegetacija slabije razvijena	ljeti pomoću UV-lampe (noću), zimi je potok bez vode
9	570	45,880664	15,968692	dno Leustekovog puta, uz potok Bliznec i stazu, oko potoka prevladava visoko drveće, niska vegetacija slabije razvijena	ljeti pomoću UV-lampe (noću), zimi pincetom ispod kamenja u potoku
10	639	45,917929	15,963550	potok Jelenja voda, oko 20 m od dna Horvatovih stuba, potok se nalazi u sjeni okolnog drveća te je okružen slabo razvijenom vegetacijom	pomoću entomološke mrežice ili pincetom oko potoka i ispod kamenja u potoku
11	741	45,915286	15,965918	potok Jelenja voda, staza 39 od Horvatovih stuba prema Sljemenu, razvijena vegetacija oko potoka	pomoću entomološke mrežice ili pincetom oko potoka i ispod kamenja u potoku, ljeti i zimi bez pronađenih jedinki
12	607	45,883658	15,943486	početni dio potoka Kraljevec, iznad Kraljičinog zdenca, pokraj ceste, razvijena vegetacija oko potoka	zimi pincetom ispod kamenja u potoku

Tablica P2. Popis vrsta tulara prikupljenih na pojedinim lokalitetima (prema Tablici P1). Vrste su određene primjenom determinacijskih ključeva.

Br.	Porodica	Vrsta ili viša taksonomska kategorija i spol	Životni stadij	Broj jedinki	Lokaliteti
1	Limnephilidae	<i>Chaetopterix major</i> (McLachlan, 1876.), ♂	Imago	2	L1, L10
2	Hydropsychidae	<i>Hydropsyche conturbenalis</i> (McLachlan, 1865.), ♂	Imago	1	L7
3	Hydropsychidae	<i>Hydropsyche instabilis</i> (Curtis, 1834.), ♂	Imago	10	L7, L8, L9
4	Hydropsychidae	<i>Hydropsyche</i> sp., ♀	Imago	14	L7, L8, L9
5	Limnephilidae	<i>Limnephilus flavicornis</i> (Fabricius, 1787.), ♂	Imago	1	L9
6	Philopotamidae	<i>Philopotamus montanus</i> (Donovan, 1813.), ♂	Imago	1	L1
7	Polycentropodidae	<i>Plectrocnemia brevis</i> (McLachlan, 1871.), ♂	Imago	1	L7
8	Polycentropodidae	<i>Plectrocnemia conspersa</i> (Curtis, 1834.), ♂	Imago	1	L1
9	Polycentropodidae	Polycentropodidae (Ulmer, 1903.), ♂	Imago	1	L8
10	Ryacophilidae	Ryacophilidae (Stephens, 1836.), ♀	Imago	2	L9
11	Sericostomatidae	<i>Sericostoma flavicorne</i> (Schneider, 1845.), ♂	Imago	3	L7
12	Sericostomatidae	<i>Sericostoma</i> sp., ♀	Imago	1	L7
13	Goeridae	<i>Silo pallipes</i> (Fabricius, 1781.), ♂	Imago	1	L1
14	Psychomyiidae	<i>Tinodes unicolor</i> (Pictet, 1834.), ♂	Imago	1	L9
15	Philopotamidae	<i>Wormaldia copiosa</i> (McLachlan, 1868.), ♂	Imago	1	L4
16	Philopotamidae	<i>Wormaldia occipitalis</i> (Pictet, 1834.), ♂	Imago	11	L4, L7, L8, L9
17	Philopotamidae	<i>Wormaldia</i> sp., ♀	Imago	12	L4, L7, L8, L9
Uk.	8 porodica	12 determiniranih vrsta		64	L1,4,7,8,9,10

Tablica P3. Popis vrsta obalčara prikupljenih na pojedinim lokalitetima (prema Tablici P1). Vrste su određene primjenom determinacijskih ključeva

Br.	Porodica	Vrsta ili rod i spol	Životni stadij	Broj jedinki	Lokaliteti
1	Taeniopterygidae	<i>Brachyptera seticornis</i> (Klapálek, 1902.)	Ličinka	6	L12
2	Perlodidae	<i>Isoperla</i> sp.	Ličinka	5	L5
3	Leuctridae	<i>Leuctra braueri</i> (Kempny, 1898.), ♂	Imago	30	L1, L2, L3
4	Leuctridae	<i>Leuctra braueri</i> (Kempny, 1898.), ♀	Imago	33	L1, L2, L3
5	Leuctridae	<i>Leuctra cingulata</i> (Kempny, 1899.), ♀	Imago	4	L1
6	Leuctridae	<i>Leuctra nigra</i> (Olivier, 1811.), ♂	Imago	1	L4
7	Leuctridae	<i>Leuctra</i> sp.	Ličinka	2	L12
8	Leuctridae	<i>Leuctra</i> sp., ♂	Imago	1	L2
9	Leuctridae	<i>Leuctra signifera</i> (Kempny, 1899.), ♂	Imago	1	L2
10	Nemouridae	<i>Nemoura sciurus</i> (Aubert, 1949.), ♂	Ličinka	1	L6
11	Nemouridae	<i>Nemoura sciurus</i> (Aubert, 1949.), ♀	Ličinka	7	L6
12	Nemouridae	<i>Nemoura</i> sp.	Ličinka	1	L6
13	Perlidae	<i>Perla</i> sp.	Ličinka	2	L4, L10
14	Nemouridae	<i>Protonemura auberti</i> (Illies, 1954.), ♂	Imago	2	L10
15	Nemouridae	<i>Protonemura intricata</i> (Ris, 1902.), ♂	Imago	2	L4
16	Nemouridae	<i>Protonemura intricata</i> (Ris, 1902.), ♀	Imago	1	L4
17	Nemouridae	<i>Protonemura nitida</i> (Pictet, 1836.), ♀	Imago	1	L1
18	Nemouridae	<i>Protonemura</i> sp., ♀	Ličinka	1	L12
Uk.	5 porodica	9 determiniranih vrsta		101	L1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 12

Tablica P4. Popis prikupljenih vrsta iz reda tulara (Trichoptera) i obalčara (Plecoptera). Vrste su određene usporedbom dobivenih DNA barkodova sa postojećim sekvencijama u međunarodnim bazama (BOLD i GenBank).

Br.	Red	Porodica	Vrsta ili rod	Životni stadij	Broj jedinki	Lokaliteti
1	Trichoptera	Limnephilidae	<i>Chaetopterix major</i>	Imago	1	L1, L10
2		Hydropsychidae	<i>Hydropsyche conturbenalis</i>	Imago	1	L7
3		Hydropsychidae	<i>Hydropsyche instabilis</i>	Imago	2	L7, L8, L9
4		Limnephilidae	<i>Limnephilus flavicornis</i>	Imago	1	L9
5		Philopotamidae	<i>Philopotamus montanus</i>	Imago	1	L1
6		Polycentropodidae	<i>Plectrocnemia brevis</i>	Imago	1	L7
7		Polycentropodidae	<i>Plectrocnemia conspersa</i>	Imago	1	L1
8		Polycentropodidae	<i>Polycentropus excisus</i> (Klapálek, 1894.)	Imago	1	L8
9		Ryacophilidae	<i>Ryacophila cf. schmidinarica</i> (Krušnik i Malicky, 2000.)	Imago, ličinka	2	L9
10		Goeridae	<i>Silo pallipes</i>	Imago	1	L1
11		Psychomyiidae	<i>Tinodes unicolor</i>	Imago	1	L9
12		Philopotamidae	<i>Wormaldia copiosa</i>	Imago	2	L4
13		Philopotamidae	<i>Wormaldia occipitalis</i>	Imago	6	L4, L7, L8, L9
14	Plecoptera	Taeniopterygidae	<i>Brachyptera seticornis</i>	Ličinka	1	L12
15		Perlodidae	<i>Isoperla grammatica</i> (Poda, 1761.)	Ličinka	3	L5
16		Leuctridae	<i>Leuctra braueri</i> (Kempny, 1898.)	Imago	9	L1, L2, L3
17		Leuctridae	<i>Leuctra cingulata</i>	Imago	1	L1
18		Leuctridae	<i>Leuctra prima</i> (Kempny, 1899.)	Ličinka	1	L12
19		Leuctridae	<i>Leuctra</i> sp. ZB	Imago	1	L2
20		Nemouridae	<i>Nemoura sciurus</i>	Ličinka	1	L6
21		Perlidae	<i>Perla pallida</i> (Guérin-Méneville, 1838.)	Imago, ličinka	2	L4, L10
22		Nemouridae	<i>Protonemura auberti</i>	Imago	2	L10
23		Nemouridae	<i>Protonemura intricata</i>	Imago	2	L4
24		Nemouridae	<i>Protonemura nitida</i>	Imago	1	L1
25	Nemouridae	<i>Protonemura praecox</i> (Morton, 1894.)	Ličinka	1	L12	
Uk.	2 reda	7 porodica tulara	13 vrsta tulara	46		L1, 4, 7, 8, 9, 10
		5 porodica obalčara	12 vrsta obalčara			L1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 12

Tablica P5. Dodijeljeni BOLD-ID brojevi za sekvencije genskog biljega *COI* prikupljenih i barkodiranih tulara i obalčara. Označen je pripadajući terenski kod uzorka, vrsta određena prema bazama podataka BOLD i GenBank i dodijeljen BIN. Ukoliko je sličnost sekvencije od ostalih veća od 2 %, uzorku će biti dodijeljen novi BIN i takav je označen s „-“. Nastavak na idućoj stranici.

Red	BOLD-ID	Terenski kod sekvencije	Vrsta	BIN
Plecoptera	CROPL392-22	DN87	<i>Brachyptera seticornis</i>	AAJ5851
	CROPL395-22	DN94	<i>Isoperla grammatica</i>	AAJ9655
	CROPL396-22	DN95	<i>Isoperla grammatica</i>	AAJ9655
	CROPL397-22	DN97	<i>Isoperla grammatica</i>	AAJ9655
	CROPL375-22	DN511	<i>Leuctra braueri</i>	AAJ2415
	CROPL376-22	DN514	<i>Leuctra braueri</i>	AAJ2415
	CROPL378-22	DN55	<i>Leuctra braueri</i>	AAJ2415
	CROPL379-22	DN56	<i>Leuctra braueri</i>	AAJ2415
	CROPL380-22	DN57	<i>Leuctra braueri</i>	AAJ2415
	CROPL385-22	DN72	<i>Leuctra braueri</i>	AAJ2415
	CROPL386-22	DN73	<i>Leuctra braueri</i>	AAJ2415
	CROPL387-22	DN75	<i>Leuctra braueri</i>	AAJ2415
	CROPL389-22	DN77	<i>Leuctra braueri</i>	AAJ2415
	CROPL377-22	DN54	<i>Leuctra cingulata</i>	AAK9204
	CROPL391-22	DN86	<i>Leuctra prima</i>	ACB1947
	CROPL384-22	DN71a	<i>Leuctra sp. ZB</i>	AEK8671
	CROPL394-22	DN91	<i>Nemoura sciurus</i>	AED4647
	CROPL390-22	DN85	<i>Perla pallida</i>	AEB9929
	CROPL383-22	DN63	<i>Perla pallida</i>	AEB9929
	CROPL381-22	DN61	<i>Protonemura auberti</i>	AAH7653
	CROPL382-22	DN62	<i>Protonemura auberti</i>	AAH7653
	CROPL373-22	DN21	<i>Protonemura intricata</i>	AAM9758
	CROPL374-22	DN26	<i>Protonemura intricata</i>	AAM9758
	CROPL388-22	DN76	<i>Protonemura nitida</i>	AED9051
CROPL393-22	DN88	<i>Protonemura praecox</i>	AEH7722	
Trichoptera	CROTR399-22	DN71b	<i>Chaetopteryx major</i>	AAN3995
	CROTR397-22	DN48	<i>Hydropsyche contubernalis</i>	AAC0455
	CROTR388-22	DN42	<i>Hydropsyche instabilis</i>	ABZ1867
	CROTR389-22	DN420	<i>Hydropsyche instabilis</i>	ABZ1867
	CROTR391-22	DN423	<i>Limnephilus flavicornis</i>	-
	CROTR398-22	DN52	<i>Philopotamus montanus</i>	AAC8183
	CROTR380-22	DN12	<i>Plectrocnemia conspersa</i>	-
	CROTR392-22	DN43	<i>Plectrocnemia brevis</i>	AAL4388

Tablica P5. Dodijeljeni BOLD-ID brojevi za sekvencije genskog biljega *COI* prikupljenih i barkodiranih tulara i obalčara. Označen je pripadajući terenski kod uzorka, vrsta određena prema bazama podataka BOLD i GenBank i dodijeljen BIN. Ukoliko je sličnost sekvencije od ostalih veća od 2 %, uzorku će biti dodijeljen novi BIN i takav je označen s „-“.

Red	BOLD-ID	Terenski kod sekvencije	Vrsta	BIN
Trichoptera	CROTR396-22	DN45	<i>Polycentropus excisus</i>	AAN2884
	CROTR394-22	DN441	<i>Rhyacophila cf. schmidinarica</i>	AEN9609
	CROTR400-22	DN910	<i>Rhyacophila cf. schmidinarica</i>	AEN9609
	CROTR381-22	DN13	<i>Silo pallipes</i>	AAD0972
	CROTR386-22	DN310	<i>Tinodes unicolor</i>	AAN9522
	CROTR384-22	DN25	<i>Wormaldia copiosa</i>	AAD2090
	CROTR385-22	DN28	<i>Wormaldia copiosa</i>	AAD2090
	CROTR382-22	DN23	<i>Wormaldia occipitalis</i>	AAE2350
	CROTR383-22	DN24	<i>Wormaldia occipitalis</i>	AAE2350
	CROTR395-22	DN442	<i>Wormaldia occipitalis</i>	AAE2350
	CROTR390-22	DN421	<i>Wormaldia occipitalis</i>	AAE2350
	CROTR387-22	DN413	<i>Wormaldia occipitalis</i>	AAE2350
	CROTR393-22	DN44	<i>Wormaldia occipitalis</i>	AAE2350

Tablica P6. Haplotipovi genskog biljega *COI* vrste *Brachyptera seticornis* korišteni u filogeografskoj analizi, uz navedeno područje uzorkovanja. Sljedovi su preuzeti iz baza BOLD i GenBank, a prikazani su BOLD-ID (BOLD identifikacijska oznaka) oznakom. Vrste prikupljene u okviru ovog istraživanja označene su terenskim brojem DN. Nastavak na idućoj stranici.

Br.	Oznaka haplotipa	Broj sekvencija u haplotipu	BOLD-ID	Država
1	BGMAY490-11	2	BGMAY490-11	Bugarska
			BGMAY502-11	Srbija
2	BGMAY500-11	1	BGMAY500-11	Srbija
3	BGMAY501-11	1	BGMAY501-11	Srbija
4	CROPL014-21	1	CROPL014-21	Hrvatska, Medvednica
5	CROPL046-21	1	CROPL046-21	Hrvatska, Zrinska gora
6	CROPL049-21	1	CROPL049-21	Hrvatska, Zrinska gora
7	CROPL055-21	1	CROPL055-21	Hrvatska, Medvednica
8	CROPL139-21	2	CROPL139-21	Hrvatska, Papuk
			CROPL149-21	Hrvatska, Kaptol
9	GBMND82057-21	1	GBMND82057-21	Njemačka
10	GBMND82058-21	1	GBMND82058-21	Njemačka
11	GBMND82059-21	1	GBMND82059-21	Njemačka
12	GBMND82063-21	4	GBMND82063-21	Njemačka
			GBMND82067-21	Njemačka
			GBMND82069-21	Njemačka
			GBMND82077-21	Njemačka
13	GBMND82064-21	1	GBMND82064-21	Njemačka
14	GBMND82066-21	1	GBMND82066-21	Njemačka
15	GBMND82079-21	1	GBMND82079-21	Njemačka
16	GBMND82080-21	1	GBMND82080-21	Njemačka
17	GBMND82084-21	1	GBMND82084-21	Njemačka
18	GBMND82088-21	1	GBMND82088-21	Njemačka
19	GBMND82093-21	1	GBMND82093-21	Njemačka

Tablica P6. Haplotipovi genskog biljega *COI* vrste *Brachyptera seticornis* korišteni u filogeografskoj analizi, uz navedeno područje uzorkovanja. Sljedovi su preuzeti iz baza BOLD i GenBank, a prikazani su BOLD-ID (BOLD identifiacijska oznaka) oznakom. Vrste prikupljene u okviru ovog istraživanja označene su terenskim brojem DN.

Br.	Oznaka haplotipa	Broj sekvencija u haplotipu	BOLD-ID	Država
20	FBAQU1304-12	33	FBAQU1304-12	Njemačka
			GBEPT301-14	Njemačka
			GBMND82052-21	Njemačka
			GBMND82053-21	Njemačka
			GBMND82054-21	Njemačka
			GBMND82055-21	Njemačka
			GBMND82056-21	Njemačka
			DN87	Hrvatska, Medvednica
			GBMND82060-21	Njemačka
			GBMND82061-21	Njemačka
			GBMND82062-21	Njemačka
			GBMND82065-21	Njemačka
			GBMND82068-21	Njemačka
			GBMND82070-21	Njemačka
			GBMND82071-21	Njemačka
			GBMND82072-21	Njemačka
			GBMND82073-21	Njemačka
			GBMND82074-21	Njemačka
			GBMND82075-21	Njemačka
			GBMND82076-21	Njemačka
			GBMND82078-21	Njemačka
			GBMND82081-21	Njemačka
			GBMND82082-21	Njemačka
			GBMND82083-21	Njemačka
			GBMND82085-21	Njemačka
			GBMND82086-21	Njemačka
			GBMND82087-21	Njemačka
GBMND82089-21	Njemačka			
GBMND82090-21	Njemačka			
GBMND82091-21	Njemačka			
GBMND82092-21	Njemačka			
GBMND82094-21	Njemačka			
PLEAA161-20	Švicarska			
Uk.	20 haplotipova	57 sekvencija		5 država

Tablica P7. Haplotipovi genskog biljega *COI* vrste *Leuctra braueri* korišteni u filogeografskoj analizi, uz navedeno područje uzorkovanja. Sljedovi su preuzeti iz baza BOLD i GenBank, a prikazani su BOLD-ID (BOLD identifiacijska oznaka) oznakom. Vrste prikupljene u okviru ovog istraživanja označene su terenskim brojem DN. Nastavak na idućoj stranici.

Br.	Oznaka haplotipa	Broj sekvencija u haplotipu	BOLD-ID	Država
1	FBAQU194-09	1	FBAQU194-09	Njemačka
2	FBAQU331-09	12	FBAQU331-09	Njemačka
			GBEPT1008-14	Njemačka
			GBEPT2302-15	Njemačka
			GBEPT2359-15	Njemačka
			GBEPT2364-15	Njemačka
			GBEPT2371-15	Njemačka
			GBMIX1524-15	Njemačka
			GBMIX1528-15	Njemačka
			GBMIX1531-15	Njemačka
			GBMIX2475-15	Njemačka
			GBMIX2485-15	Njemačka
			GBMIX2465-15	Njemačka
3	GBEPT2353-15	6	GBEPT2353-15	Njemačka
			GBEPT2354-15	Njemačka
			GBEPT2355-15	Njemačka
			GBEPT2356-15	Njemačka
			GBEPT2357-15	Njemačka
			GBEPT2358-15	Njemačka
4	GBMIX1667-15	5	GBMIX1667-15	Njemačka
			INTAP035-17	Austrija
			INTAP036-17	Austrija
			INTAP037-17	Austrija
			PLEAA096-20	Švicarska
5	GBMIX2463-15	1	GBMIX2463-15	Njemačka
6	GBMNC47659-20	1	GBMNC47659-20	Italija
7	GBMNC47660-20	1	GBMNC47660-20	Italija
8	DN77	1	DN77	Hrvatska
9	DN56	1	DN56	Hrvatska
10	DN72	3	DN72	Hrvatska
			DN511	Hrvatska
			DN57	Hrvatska

Tablica P7. Haplotipovi genskog biljega *COI* vrste *Leuctra braueri* korišteni u filogeografskoj analizi, uz navedeno područje uzorkovanja. Sljedovi su preuzeti iz baza BOLD i GenBank, a prikazani su BOLD-ID (BOLD identifikacijska oznaka) oznakom. Vrste prikupljene u okviru ovog istraživanja označene su terenskim brojem DN.

Br.	Oznaka haplotipa	Broj sekvencija u haplotipu	BOLD-ID	Država
11	DN75	1	DN75	Hrvatska
12	DN73	1	DN73	Hrvatska
13	DN514	1	DN514	Hrvatska
14	DN55	1	DN55	Hrvatska
15	GMGRI255-13	1	GMGRI255-13	Njemačka
16	GST167-15	1	GST167-15	Njemačka
17	INTAP038-17	1	INTAP038-17	Austrija
18	PLEAA170-20	1	PLEAA170-20	Švicarska
19	PLEAA413-20	1	PLEAA413-20	Švicarska
Uk.	19 haplotipova	41 sekvencija		5 država

Tablica P8. Haplotipovi genskog biljega *COI* vrsta *Leuctra prima* i *Leuctra* sp. ZB korišteni u filogeografskoj analizi, uz navedeno područje uzorkovanja. Sljedovi su preuzeti iz baza BOLD i GenBank, a prikazani su BOLD-ID (BOLD identifikacijska oznaka) oznakom. Vrste prikupljene u okviru ovog istraživanja označene su terenskim brojem DN.

Br.	Oznaka haplotipa	Broj sekvencija u haplotipu	BOLD-ID	Država
1	CROPL248-21	1	CROPL248-21	Hrvatska, Žumberak
2	DN86	2	DN86	Hrvatska, Medvednica
			CROPL016-21	Hrvatska, Medvednica
3	DN71a	1	DN71a	Hrvatska, Medvednica
4	CROPL003-21	1	CROPL003-21	Hrvatska, Gorski kotar
5	CROPL023-21	1	CROPL023-21	Hrvatska, Medvednica
6	FBAQU1315-12	1	FBAQU1315-12	Njemačka
7	GST207-15	6	GST207-15	Njemačka
			GST209-15	Njemačka
			GST212-15	Njemačka
			GST214-15	Njemačka
			GST218-15	Njemačka
			GST220-15	Njemačka
8	GST208-15	5	GST208-15	Njemačka
			GST210-15	Njemačka
			GST215-15	Njemačka
			GST217-15	Njemačka
			GST219-15	Njemačka
9	PLEAA205-20	1	PLEAA205-20	Švicarska
10	PLEAA382-20	1	PLEAA382-20	Švicarska
Uk.	10 haplotipova	20 sekvencija		3 države

Tablica P9. Haplotipovi genskog biljega *COI* vrste *Isoperla grammatica* korišteni u filogeografskoj analizi, uz navedeno područje uzorkovanja. Sljedovi su preuzeti iz baza BOLD i GenBank, a prikazani su BOLD-ID (BOLD identifikacijska oznaka) oznakom. Vrste prikupljene u okviru ovog istraživanja označene su terenskim brojem DN. Nastavak na idućoj stranici.

Broj	Oznaka haplotipa	Broj sekvencija u haplotipu	BOLD-ID	Država
1	CROPL154-21	1	CROPL154-21	Hrvatska, Slavonija
2	CROPL205-21	1	CROPL205-21	Hrvatska, Međimurje
3	CROPL265-21	1	CROPL265-21	Hrvatska, Slavonija
4	CROPL276-21	2	CROPL276-21	Hrvatska, Slavonija
			CROPL342-21	Hrvatska, Slavonija
5	CROPL318-21	1	CROPL318-21	Slovenija, blizu Ljubljane
6	CROPL338-21	1	CROPL338-21	Hrvatska, Slavonija
7	CROPL292-21	1	CROPL292-21	Hrvatska, Slavonija
8	DN94	2	DN94	Hrvatska, Medvednica
			DN95	Hrvatska, Medvednica
9	DN97	1	DN97	Hrvatska, Medvednica
10	FBAQU007-09	1	FBAQU007-09	Njemačka
11	FIEPT075-11	1	FIEPT075-11	Finska
12	FIEPT076-11	1	FIEPT076-11	Finska
13	FIEPT078-11	1	FIEPT078-11	Finska
14	FIEPT079-11	1	FIEPT079-11	Finska
15	GBMNC47877-20	1	GBMNC47877-20	Italija
16	GBMNC47878-20	1	GBMNC47878-20	Italija
17	GBMNC47879-20	3	GBMNC47879-20	Italija
			GBMNC47880-20	Italija
			GBMNC47881-20	Italija
18	GBMNC47882-20	1	GBMNC47882-20	Italija
19	GBMNC47883-20	1	GBMNC47883-20	Italija
20	GBMNC47884-20	1	GBMNC47884-20	Italija
21	GBMNC47885-20	1	GBMNC47885-20	Italija
22	GBMNC47886-20	2	GBMNC47886-20	Italija
			GBMNC47887-20	Italija
23	GBMNC47888-20	2	GBMNC47888-20	Italija
			GBMNC47889-20	Italija

Tablica P9. Haplotipovi genskog biljega *COI* vrste *Isoperla grammatica* korišteni u filogeografskoj analizi, uz navedeno područje uzorkovanja. Sljedovi su preuzeti iz baza BOLD i GenBank, a prikazani su BOLD-ID (BOLD identifikacijska oznaka) oznakom. Vrste prikupljene u okviru ovog istraživanja označene su terenskim brojem DN.

Broj	Oznaka haplotipa	Broj sekvencija u haplotipu	BOLD-ID	Država
24	GBMNC47890-20	1	GBMNC47890-20	Italija
25	GBMNC47891-20	2	GBMNC47891-20	Italija
			GBMNC47892-20	Italija
26	IBIPP003-19	6	IBIPP003-19	Portugal
			IBIPP035-20	Portugal
			IBIPP036-20	Portugal
			IBIPP053-20	Portugal
			IBIPP058-20	Portugal
			IBIPP085-20	Portugal
27	IBIPP059-20	1	IBIPP059-20	Portugal
28	IBIPP084-20	1	IBIPP084-20	Portugal
29	IBIPP034-20	1	IBIPP034-20	Portugal
30	IBIPP104-20	1	IBIPP104-20	Portugal
31	INTAP172-17	1	INTAP172-17	Austrija
32	PLEAA243-20	1	PLEAA243-20	Švicarska
33	PLEAA324-20	1	PLEAA324-20	Švicarska
Uk.	33 haplotipa	45 sekvencija		8 država

Tablica P10. Haplotipovi genskog biljega *COI* vrste *Hydropsyche contubernalis* korišteni u filogeografskoj analizi, uz navedeno područje uzorkovanja. Sljedovi su preuzeti iz baza BOLD i GenBank, a prikazani su BOLD-ID (BOLD identifikacijska oznaka) oznakom. Vrste prikupljene u okviru ovog istraživanja označene su terenskim brojem DN. Nastavak na idućoj stranici.

Broj	Oznaka haplotipa	Broj sekvencija u haplotipu	BOLD-ID	Država
1	DN48	11	DN48	Hrvatska, Medvednica
			CROAA006-18	Hrvatska, Turopolje
			FBCAD024-10	Njemačka
			FBCAD025-10	Njemačka
			GBEPT2094-15	Njemačka
			GBEPT2140-15	Njemačka
			GBEPT2141-15	Njemačka
			GBEPT2144-15	Njemačka
			JPCAD449-08	Mađarska
			TFLAN138-11	Belgija
			TFLAN139-11	Belgija
2	CROAA076-18	2	CROAA076-18	Hrvatska, Međimurje
			TRIFI591-11	Finska
3	CROTR269-19	1	CROTR269-19	Hrvatska, Medvednica
4	FBCAD023-10	1	FBCAD023-10	Njemačka
5	GBEPT2095-15	6	GBEPT2095-15	Njemačka
			GBEPT2105-15	Njemačka
			GBEPT820-14	Njemačka
			GTRI065-18	Njemačka
			JPCAD448-08	Mađarska
			PLEAA646-20	Švicarska
6	GTRI052-18	1	GTRI052-18	Njemačka
7	MGCAD116-08	3	MGCAD116-08	Mongolija
			MGCAD117-08	Mongolija
			UMNEB444-08	Švedska
8	MGCAD118-08	1	MGCAD118-08	Mongolija
9	MGCAD120-08	1	MGCAD120-08	Mongolija
10	MGCAD121-08	1	MGCAD121-08	Mongolija

Tablica P10. Haplotipovi genskog biljega *COI* vrste *Hydropsyche contubernalis* korišteni u filogeografskoj analizi, uz navedeno područje uzorkovanja. Sljedovi su preuzeti iz baza BOLD i GenBank, a prikazani su BOLD-ID (BOLD identifikacijska oznaka) oznakom. Vrste prikupljene u okviru ovog istraživanja označene su terenskim brojem DN.

Broj	Oznaka haplotipa	Broj sekvencija u haplotipu	BOLD-ID	Država
11	MGCAD122-08	1	MGCAD122-08	Mongolija
12	TRIFI1080-14	4	TRIFI1080-14	Finska
			TRIFI1081-14	Finska
			TRIFI1082-14	Finska
			TRIFI1083-14	Finska
13	TRIFI1096-14	1	TRIFI1096-14	Finska
14	TRIFI745-12	1	TRIFI745-12	Finska
Uk.	14 haplotipa	35 sekvencija		8 država

Tablica P11. Haplotipovi genskog biljega *COI* vrste *Limnephilus flavicornis* korišteni u filogeografskoj analizi, uz navedeno područje uzorkovanja. Sljedovi su preuzeti iz baza BOLD i GenBank, a prikazani su BOLD-ID (BOLD identifiacijska oznaka) oznakom. Vrste prikupljene u okviru ovog istraživanja označene su terenskim brojem DN. Nastavak na idućoj stranici.

Br.	Oznaka haplotipa	Broj sekvencija u haplotipu	BOLD-ID	Država
1	DN423	13	DN423	Hrvatska
			CROAA008-18	Hrvatska, Turopolje
			GBEPT2108-15	Njemačka
			GBEPT791-14	Njemačka
			GBEPT792-14	Njemačka
			GBEPT793-14	Njemačka
			JPCAD303-08	Mađarska
			JPCAD304-08	Mađarska
			JPCAD306-08	Norveška
			LEFIJ3164-15	Finska
			LEFIJ3165-15	Estonija
			TRIFI1145-15	Finska
			UMNEA435-08	Norveška
2	CROAA009-18	1	CROAA009-18	Hrvatska, Sisak
3	CROTR073-19	1	CROTR073-19	Hrvatska, Lika
4	FBAQU110-09	3	FBAQU110-09	Njemačka
			LEFIJ3167-15	Finska
			TRIFI1258-15	Finska
5	GBEPT2261-15	3	GBEPT2261-15	Njemačka
			GBEPT790-14	Njemačka
			PLEAA947-20	Švicarska
6	JPCAD305-08	5	JPCAD305-08	Norveška
			JPCAD307-08	Norveška
			ODTRI052-14	Norveška
			TRDTR180-15	Norveška
			TRDTR181-15	Norveška

Tablica P11. Haplotipovi genskog biljega *COI* vrste *Limnephilus flavicornis* korišteni u filogeografskoj analizi, uz navedeno područje uzorkovanja. Sljedovi su preuzeti iz baza BOLD i GenBank, a prikazani su BOLD-ID (BOLD identifikacijska oznaka) oznakom. Vrste prikupljene u okviru ovog istraživanja označene su terenskim brojem DN.

Br.	Oznaka haplotipa	Broj sekvencija u haplotipu	BOLD-ID	Država
7	LEFIJ3217-15	9	LEFIJ3217-15	Finska
			LEFIJ3218-15	Finska
			LEFIJ3219-15	Finska
			LEFIJ3221-15	Finska
			LEFIJ3222-15	Finska
			TRIFI1128-15	Finska
			TRIFI1232-15	Finska
			TRIFI1233-15	Finska
			TRIFI1236-15	Finska
8	PLEAA946-20	1	TRIFI1236-15	Finska
9	TFLAN174-11	3	TFLAN174-11	Belgija
			TFLAN177-11	Belgija
			TFLAN245-11	Belgija
10	TFLAN201-11	1	TFLAN201-11	Belgija
11	TRIFI1234-15	1	TRIFI1234-15	Belgija
12	TRIFI312-11	1	TRIFI312-11	Finska
Uk.	12 haplotipa	41 sekvencija		8 država

Tablica P12. Haplotipovi genskog biljega *COI* vrste *Philopotamus montanus* korišteni u filogeografskoj analizi, uz navedeno područje uzorkovanja. Sljedovi su preuzeti iz baza BOLD i GenBank, a prikazani su BOLD-ID (BOLD identifiacijska oznaka) oznakom. Vrste prikupljene u okviru ovog istraživanja označene su terenskim brojem DN. Nastavak na idućoj stranici.

Br.	Oznaka haplotipa	Broj sekvencija u haplotipu	Šifra slijeda (BOLD-ID)	Država
1	DN52	1	DN52	Hrvatska, Medvednica
2	CROAA130-18	1	CROAA130-18	Hrvatska, Zagorje
3	ESCAD031-10	4	ESCAD031-10	Španjolska
			ESCAD033-10	Španjolska
			ESCAD034-10	Španjolska
			ESCAD035-10	Španjolska
4	ESCAD032-10	1	ESCAD032-10	Španjolska
5	FBAQU1223-12	1	FBAQU1223-12	Njemačka
6	FBAQU1399-13	1	FBAQU1399-13	Njemačka
7	FBAQU141-09	8	FBAQU141-09	Njemačka
			FINNT058-12	Norveška
			GBEPT579-14	Njemačka
			HMKKT026-10	Rumunjska
			HMKKT720-10	Francuska
			HMTRI424-09	Španjolska
			TRDTR065-14	Norveška
			TRDTR066-14	Norveška
8	GBEPT577-14	2	GBEPT577-14	Njemačka
			GBEPT578-14	Njemačka
9	GBEPT580-14	1	GBEPT580-14	Njemačka
10	GST438-15	11	GST438-15	Njemačka
			GST439-15	Njemačka
			GST440-15	Njemačka
			GST444-15	Njemačka
			GST445-15	Njemačka
			GST446-15	Njemačka
			GST447-15	Njemačka
			GST448-15	Njemačka
			GST449-15	Njemačka
			GST451-15	Njemačka
			GST450-15	Njemačka
11	GST443-15	2	GST443-15	Njemačka
			GST453-15	Njemačka

Tablica P12. Haplotipovi genskog biljega *COI* vrste *Philopotamus montanus* korišteni u filogeografskoj analizi, uz navedeno područje uzorkovanja. Sljedovi su preuzeti iz baza BOLD i GenBank, a prikazani su BOLD-ID (BOLD identifikacijska oznaka) oznakom. Vrste prikupljene u okviru ovog istraživanja označene su terenskim brojem DN.

Br.	Oznaka haplotipa	Broj sekvencija u haplotipu	Šifra slijeda (BOLD-ID)	Država
12	HMCAD457-09	4	HMCAD457-09	Austrija
			HMKKT953-11	Austrija
			TRIFI625-11	Finska
			TRIFI626-11	Finska
13	HMKKT181-10	4	HMKKT181-10	Austrija
			HMKKT444-10	Austrija
			HMKKT445-10	Austrija
			HMKKT446-10	Austrija
14	HMKKT297-10	1	HMKKT297-10	Rumunjska
15	HMKKT298-10	3	HMKKT298-10	Rumunjska
			HMKKT784-10	Grčka
			TRDTR067-14	Norveška
16	HMKKT443-10	1	HMKKT443-10	Austrija
17	HMKKT715-10	1	HMKKT715-10	Francuska
18	HMKKT716-10	1	HMKKT716-10	Portugal
19	HMKKT718-10	1	HMKKT718-10	Portugal
20	HMKKT721-10	1	HMKKT721-10	Portugal
21	HMKKT722-10	1	HMKKT722-10	Portugal
22	HMKKT757-10	1	HMKKT757-10	Austrija
23	HMTRI205-09	1	HMTRI205-09	Grčka
24	HMTRI402-09	1	HMTRI402-09	Grčka
25	HMTRI447-09	1	HMTRI447-09	Rusija
26	KKCAD519-09	1	KKCAD519-09	Španjolska
Uk.	26 haplotipa	56 sekvencija		11 država

Tablica P13. Haplotipovi genskog biljega *COI* vrste *Wormaldia occipitalis* korišteni u filogeografskoj analizi, uz navedeno područje uzorkovanja. Sljedovi su preuzeti iz baza BOLD i GenBank, a prikazani su BOLD-ID (BOLD identifikacijska oznaka) oznakom. Vrste prikupljene u okviru ovog istraživanja označene su terenskim brojem DN.

Broj	Oznaka haplotipa	Broj sekvencija u haplotipu	Šifra slijeda (BOLD-ID)	Država
1	BHMKK192-12	1	BHMKK192-12	Italija
2	BHMKK239-12	1	BHMKK239-12	Italija
3	BHMKK251-12	1	BHMKK251-12	Italija
4	CROAA044-18	1	CROAA044-18	Hrvatska, Medvednica
5	CROTR061-19	1	CROTR061-19	Hrvatska, Slavonija
6	CROTR068-19	1	CROTR068-19	Hrvatska, Plitvička jezera
7	CROTR245-19	1	CROTR245-19	Hrvatska, Petrinja
8	DN44	1	DN44	Hrvatska, Medvednica
9	DN24	2	DN24	Hrvatska, Medvednica
			DN413	Hrvatska, Medvednica
10	DN442	3	DN442	Hrvatska, Medvednica
			DN23	Hrvatska, Medvednica
			DN421	Hrvatska, Medvednica
11	FBAQU284-09	1	FBAQU284-09	Njemačka
12	FBAQU285-09	1	FBAQU285-09	Njemačka
13	GBEPT1648-14	9	GBEPT1648-14	Njemačka
			GST507-15	Njemačka
			GST508-15	Njemačka
			GST509-15	Njemačka
			GST510-15	Njemačka
			GST511-15	Njemačka
			GST512-15	Njemačka
			GST514-15	Njemačka
ZMBN266-16	Norveška			
14	GBEPT1649-14	2	GBEPT1649-14	Njemačka
			GBEPT1651-14	Njemačka
15	GBEPT1650-14	2	GBEPT1650-14	Njemačka
			GBEPT1653-14	Njemačka
16	GBEPT1652-14	1	GBEPT1652-14	Njemačka
17	HMCAD354-08	2	HMCAD354-08	Italija
			HMCAD355-08	Italija
18	HMKKT700-10	2	HMKKT700-10	Italija
			HMKKT737-10	Italija
19	HMKKT746-10	1	HMKKT746-10	Austrija
20	INTAP066-17	1	INTAP066-17	Austrija
21	INTAP067-17	1	INTAP067-17	Austrija
22	INTAP109-17	1	INTAP109-17	Austrija
23	INTAP110-17	1	INTAP110-17	Austrija
Uk.	23 haplotipa	38 sekvencija		4 države