

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
i
Institut Ruđer Bošković, Zagreb

Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij
ZAŠTITA PRIRODE I OKOLIŠA

GORAN VIGNJEVIĆ

Molekularna identifikacija i distribucija vrsta
komaraca *Anopheles maculipennis* kompleks
u Hrvatskoj

Doktorska disertacija

Osijek, 2014.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
i
Institut Ruđer Bošković, Zagreb

Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij
ZAŠTITA PRIRODE I OKOLIŠA

GORAN VIGNJEVIĆ

Molekularna identifikacija i distribucija vrsta
komaraca *Anopheles maculipennis* kompleks
u Hrvatskoj

Doktorska disertacija predložena Sveučilišnom Vijeću za
poslijediplomske interdisciplinarne doktorske studije u svrhu stjecanja
akademske stupnja doktora znanosti na Sveučilišnom
poslijediplomskom interdisciplinarnom doktorskom studiju Zaštita
prirode i okoliša

Osijek, 2014.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Institut Ruđer Bošković, Zagreb
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij
ZAŠTITA PRIRODE I OKOLIŠA

Doktorska disertacija

UDK:

Znanstveno područje: Prirodne znanosti ili Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biologija

MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA I DISTRIBUCIJA VRSTA KOMARACA *ANOPHELES MACULIPENNIS* KOMPLEKS U HRVATSKOJ

Goran Vignjević, prof.biol. i kem.

Doktorski disertacija je izrađena na Odjelu za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Mentor: izv.prof. dr. sc. Enrih Merdić, Odjel za biologiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Komentor: prof. dr. sc. Đurđica Ugarković, Institut Ruđer Bošković, Zagreb

Kratki sažetak doktorske disertacije:

U okviru ovog istraživanja obuhvaćen je kompleks sestrinskih vrsta *Anopheles maculipennis*. Kriptične vrste unutar kompleksa identificirane su pomoću molekularnih metoda baziranih na osnovi lančane reakcije polimerazom ITS2 regije ribosomalne DNA, što se potvrdilo dobrom metodom za razdvajanje vrsta. Ukupno su identificirane četiri vrste iz istraživanog kompleksa: *Anopheles messeae*, *Anopheles maculipennis*, *Anopheles melanoon* i *Anopheles daciae*. Posljednje navedena je nova vrsta za faunu komaraca Hrvatske, dok je za vrstu *An. melanoon* ovo prvi nalaz nakon revidiranja vrste *An. subalpinus* te uvođenja sinonima s vrstom *An. melanoon*. Među identificiranim vrstama u Hrvatskoj najrasprostranjenija je vrsta *An. maculipennis* koja pokriva cijelo područje Hrvatske, vrsta *An. messeae* rasprostranjen je u kontinentalnom dijelu i u dolini rijeke Neretve, *An. melanoon* je utvrđena na području Istre i južne Dalmacije, dok je vrsta *An. daciae* rasprostranjena na području Slavonije i Baranje, te u Lici. Nalaz ove vrste u Lici predstavlja znatno proširenje areala ove vrste na jug. Osim identifikacije i distribucije za vrste je opisan preferirani tip staništa za ličinačke stadije, odnosno preferirane domačine u odraslom stadiju. Filogenetskim analizama nisu utvrđene osjetne međupopulacijske varijacije kod identificiranih vrsta na području Hrvatske, a genetička udaljenost populacija iz Hrvatske s populacijama iz ostatka Europe i Male Azije je vrlo mala.

Broj stranica: 84

Broj slika: 34

Broj tablica: 4

Broj literaturnih navoda: 115

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: komarci, *Anopheles maculipennis*, molekularna identifikacija, ITS međugenska regija, ITS2

Datum obrane: 17.11.2014.

Povjerenstvo za obranu:

- 1. izv.prof.dr.sc. Mladen Kučinić**, izvanredni profesor Biološkog odsjeka Prirodoslovno matematičkog fakulteta u Zagrebu
- 2. izv.prof.dr.sc. Enrih Merdić**, izvanredni profesor Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, mentor i član;
- 3. prof.dr.sc. Đurđica Ugarković**, znanstvena savjetnica Instituta Ruđer Bošković i naslovna profesorica Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, komentor i član

Rad je pohranjen u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Ruder Bošković Institute, Zagreb
University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of
Environmental Protection and Nature Conservation

PhD thesis

UDK:

Scientific Area: Natural science or Biotechnical Sciences

Scientific Field: Biology

MOLECULAR IDENTIFICATION AND DISTRIBUTION OF MOSQUITO SPECIES *ANOPHELES MACULIPENNIS* COMPLEX IN CROATIA

Goran Vignjević

Thesis performed at: Department of Biology, University Josip Juraj Strossmayer of Osijek

Supervisor: Enrih Merdić, Full Professor, Department of Biology, University Josip Juraj Strossmayer of Osijek

Co-supervisor: Đurđica Ugarković, Full Professor, Ruder Bošković Institute, Zagreb

Summary

The main objective in this study was to identify species within *Anopheles maculipennis* complex. Cryptic species within complex are identified with molecular methods based on polymerase chain reaction of ITS2 region ribosomal DNA which have confirmed as a good diagnostic tool for species identification. A total of four species within examined complex were identified: *Anopheles messeae*, *Anopheles maculipennis*, *Anopheles melanoon* and *Anopheles daciae*. Latest is the new species for Croatian mosquito fauna, while for *An. melanoon* this is first record and confirmation of species since *An. subalpinus* is formally synonymised with *An. melanoon*. Among identified species *An. maculipennis* is most widespread species covering almost whole Croatian territory, *An. messeae* is widespread in continental, lowland part and Neretva river delta, *An. melanoon* is confirmed for Istria and southern Dalmatia while *An. daciae* is confirmed in Slavonia, Baranya and Lika regions. Confirmation of this species in Lika represents most southern occurrence and significant spread of this species areal. Besides identification and distribution for the identified species, preferred habitat and feeding pattern are described. Phylogenetic analyses provided no significant intraspecific or interspecific variation among populations in Croatia and among the populations from the rest of the Europe and Middle East.

Number of pages: 84

Number of figures: 34

Number of tables: 4

Number of references: 115

Original in: Croatian

Key words: mosquitoes, *Anopheles maculipennis*, molecular identification, second internal transcribed spacer, ITS2

Date of thesis defense: 17 November 2014

Reviewers:

1. Mladen Kučinić, PhD, Full Professor, Department of Biology, Faculty of Science, University of Zagreb;
2. Enrih Merdić, PhD, Full Professor, Department of Biology, University Josip Juraj Strossmayer of Osijek;
3. Đurđica Ugarković, PhD, Full Professor, Institute Ruder Bošković, Zagreb

Thesis deposited at: National and University Library in Zagreb, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Zahvala

Veliku zahvalu dugujem svom mentoru izv.prof.dr.sc. Enrihu Merdiću na prije svega ukazanom povjerenju, a zatim i dugogodišnjoj potpori i pomoći pri izradi ovog rada te razumijevanju i podršci pomoću kojih sam lakše kročio kroz znanost.

Zahvaljujem i svojoj komentorici prof.dr.sc. Đurđici Ugarković koja me uvijek rado primila u Zagrebu i bila spremna dati savjete i odgovore na moja pitanja.

Hvala i mom najdražem timu – „timu Komarci“ koji su uvijek bili tu da pomognu i podijele kako teške tako i sretne trenutke.

Posebno hvala mojoj „cimerici“ dr.sc. Nataši Turić na uzajamnom bodrenju i pomaganju, terenima, raspravama i svakodnevnom ugodnom druženju.

Najljepše zahvaljujem i dr.sc. Zorani Katanić, dr.sc. Rosemary Vuković i doc.dr.sc. Ivni Štolfa na nesebičnom pomaganju, savjetima i ugodnim laboratorijskim trenutcima koji su mi olakšali dugotrajne analize.

Od srca zahvaljujem mojoj Ozani bez koje teško da bih stigao do ovog cilja i koja mi je svojom vjerom i ljubljavlju ulijevala snagu na tom dugom putovanju. Puno dugujem i Eni čiji me osmijeh hrabri i ispunjava.

Hvala i svim članovima moje nove obitelji, a najveću zahvalnost dugujem svojim roditeljima i bratu koji su me oduvijek podupirali, razumjeli i jednostavno činili život jednostavnijim i ugodnijim.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Hipoteze i ciljevi rada.....	3
2. LITERATURNI PREGLED	4
2.1. Malarični komarci - <i>Anophles maculipennis</i> kompleks	4
2.1.1. Taksonomski položaj i klasifikacija malaričnih komaraca	4
2.2. Biološke značajke malaričnih komaraca	7
2.3. Distribucija i pregled povijesnih istraživanja vrsta komaraca <i>Anopheles maculipennis</i> kompleks u Hrvatskoj.....	12
2.4. Tehnike i metode raspoznavanja vrsta unutar kompleksa <i>Anopheles maculipennis</i> .	16
3. MATERIJALI I METODE	18
3.1. Područje istraživanja.....	18
3.2. Uzorkovanje ličinki	22
3.3. Uzorkovanje odraslih komaraca	24
3.4. Izolacija DNA	25
3.5. Određivanje koncentracije i čistoće DNA.....	26
3.6. Umnažanje ITS2 odsječka rDNA lančanom reakcijom polimeraze	27
3.6.1. Horizontalna elektroforeza u agaroznom gelu	28
3.7. Sekvenciranje ITS2 odsječka	29
3.8. Analiza sekvenci i filogenetska analiza	29
4. REZULTATI.....	32
4.1. Vrsta <i>Anopheles messeae</i> Falleroni, 1926	35
4.2. Vrsta <i>Anopheles daciae</i> Linton, Nicolescu & Harbach, 2004.....	39
4.3. Vrsta <i>Anopheles maculipennis</i> s.s. Meigen, 1818	42
4.4. Vrsta <i>Anopheles melanoon</i> Hackett, 1934.....	46
4.5. Filogenetske analize identificiranih vrsta	49
5. DISKUSIJA.....	56

6. ZAKLJUČCI.....	67
7. LITERATURA.....	68
8. ŽIVOTOPIS	75

1. UVOD

Komarci (Culicidae) se nalaze u centru svjetskih entomoloških istraživanja prvenstveno zbog njihovog medicinskog značenja kao prijenosnika mnogih opasnih bolesti kao što su malarija, žuta i dengue griznica, encefalitis i filarijaza. Upravo zbog toga je komarac proglašen najopasnijom životinjom na svijetu – nijedna druga ne prouzrokuje toliki broj smrtnih slučajeva kod ljudi. Vrlo su uspješni organizmi zahvaljujući svojoj sposobnosti adaptiranja različitim staništima. Može ih se pronaći u cijelom svijetu, osim u pustinjama i trajno zaleđenim predjelima.

Najpoznatiji i najistraživaniji rod među komarcima je nedvojbeno rod *Anopheles* i to isključivo zbog utjecaja koji ima na zdravlje ljudi. Naime, u svijetu su komarci iz roda *Anopheles* najpoznatiji pod grupnim imenom malarični komaraci. Malarija je bolest koja se prenosi isključivo ubodom malaričnog komarca zaraženog parazitom *Plasmodium sp.* Prema posljednjim procjenama Svjetske zdravstvene organizacije u 2012. godini je bilo 207 milijuna slučajeva zaraze malarijom od čega je 627 000 ljudi umrlo (WHO, 2013).

No, ne prenose svi malarični komarci malariju. Od 465 vrsta (Harbach, 2013) koliko ih trenutno broji rod *Anopheles* samo 41 vrsta se smatra dominantnim vektorskim vrstama (Sinka et al., 2010a), odnosno onima koji predstavljaju opasnost po ljudsko zdravlje. Razlog ovome je velika divergentnost vrsta unutar samog roda i iako morfološki slične ove vrste imaju različite biološke karakteristike među kojima je i vektorski kapacitet – sposobnost prijenosa uzročnika bolesti.

Unutar roda *Anopheles* se nalazi kompleks sestrinskih vrsta *Anopheles maculipennis* kojem pripadaju europske, palearktičke vrste malaričnih komaraca. U kompleksu se trenutno nalazi deset vrsta (Harbach, 2004; 2013; Linton, 2004; Nicolescu et al., 2004) od kojih četiri, odnosno pet mogu biti vektori malarije. Peta vrsta, je novije opisana – *Anopheles daciae*, te se pretpostavlja njena mogućnost prijenosa malarije, ali nije još potvrđena.

Klimatske promjene koje se događaju širom svijeta te globalno zatopljenje omogućuju povećanje broja vrsta komaraca u Europi. Širenje areala i migracije vrsta uslijed zatopljenja nije novi pojam kako za biljke tako i za životinje (Bradley et al., 2010; Dukes i Mooney, 1999; Pejchar i Mooney, 2009). Određene vrste migratornih europskih leptira pomaknuli su svoju sjevernu granicu migriranja čak i do 240 kilometara (Parmesan et al., 1999) postoji

opravdana sumnja kako bi se to moglo dogoditi i s komarcima i bolestima koje prenose (Epstein, 2001; Khasnis i Nettleman, 2005; Kuhn et al., 2002; Reeves et al., 1994).

Prva istraživanja pripadnika porodice Culicidae na prostorima bivše Jugoslavije potječu iz 20-ih i 30-ih godina 20. stoljeća i bila su uglavnom orijentirana na vrste roda *Anopheles* (Božičić, 1980) zbog epidemije malarije. Malarija je u Jugoslaviji eradikirana nakon II svjetskog rata i od tada opada interes za istraživanje malaričnih komaraca. Krajem 70-ih i početkom 80-ih godina prošlog stoljeća Adamović, a zatim Paulus i Merdić objavili niz radova o poznavanju vrsta *Anophelinae* u tadašnjoj Jugoslaviji. U tim radovima ukupno je nađeno pet vrsta iz kompleksa *Anopheles maculipennis* za područje Hrvatske koje su razlikovane na osnovi morfologije jaja.

Moderne metode razlikovanja vrsta unutar ovog kompleksa svakako obuhvaćaju molekularna istraživanja specifičnih genomskih markera kao što su na primjer Internal Transcribed Spacer (ITS) i InterGenic Spacer (IGS) kod ribosomalne DNA te Citokrom Oksidaze I i II te Citokrom b (COI, COII i Cyt b) kod mitohondrijske DNA. Prednost ovih metoda temeljenih na lančanoj reakciji polimerazom je što je za analize potrebno svega nekoliko nanograma DNA iz sačuvanih uzoraka (Collins i Paskewitz, 1996).

1.1. Hipoteze i ciljevi rada

Hipoteze

- o Molekurnom analizom vrsta potvrditi će se prisustvo dosad zabilježenih vrsta iz kompleksa *Anopheles maculipennis* na području Hrvatske, ali i utvrditi neke nove
- o Distribucija vrsta najviše će ovisiti o ekološkim značajkama područja
- o Područje Mediteranske Hrvatske biti će bogatije vrstama iz kompleksa *Anopheles maculipennis*
- o Dužina sekvence i sastav nukleotida unutar sekvence biti će dostatan za razlikovanje vrsta unutar kompleksa

Ciljevi rada

- Nova klasifikacija podporodice Anophelinae
- Identifikacija vrsta iz kompleksa *Anopheles maculipennis* na području Hrvatske
- Prikupljanje podataka o rasprostranjenju i staništima pojedinih vrsta
- Utvrditi efikasne metode za izolaciju DNA iz komaraca
- Optimiziranje lančane reakcije polimerazom za ITS2 regiju ribosomalne DNA kod komaraca
- Izrada ITS2 sekvenci sa slijedom nukleotida za svaku utvrđenu vrstu iz kompleksa
- Usporedba populacija na osnovi izrađenih sekvenci unutar Hrvatske i populacija iz okolnih područja radi utvrđivanja njihovih filogenetskih odnosa

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Malarični komarci - *Anopheles maculipennis* kompleks

Komarci su porodica kukaca koja je svrstana u red dvokrilaca. Porodica trenutno obuhvaća 3540 vrsta (Harbach, 2013) klasificiranih u dvije jasno odvojene podporodice - Anophelinae i Culicinae, i 112 rodova. To su tanki kukci s dugačkim nogama koje je lako prepoznati po dugačkom proboscisu i ljuskicama koje prekrivaju gotovo cijelo tijelo. Kao i svi dvokrilci komarci prolaze kroz potpunu metamorfozu, a za razvoj im je neophodna voda. Ličinke se razlikuju od drugih vodenih kukaca po nedostatku nogu i karakterističnom obliku tijela. Na zadku ličinke imaju ili par respiratornih otvora (podporodica Anophelinae) ili produženi sifon (podporodica Culicinae) preko kojih dišu na površini vode. Koloniziraju skoro sve vrste slatkovodnih vodenih tijela, trajnih i privremenih, onečišćenih i čistih, stajaćih i tekućih, velikih i malih, čak i toliko malih kao što je peteljka lista.

Svi mužjaci te ženke nekih vrsta hrane se isključivo nektarom i biljnim sokovima, no ženke većine vrsta se, za produkciju jaja, hrane krvlju živih životinja. Vrijeme letenja i hranjenja ovisi o vrsti - neke su aktivne noću, neke danju, a većina vrsta je najaktivnija u sumrak.

2.1.1. Taksonomski položaj i klasifikacija malaričnih komaraca

Podporodica Anophelinae se dijeli na tri roda - *Anopheles*, *Bironella* i *Chagasia* (Harbach, 2013), od kojih je najpoznatiji i najbrojniji rod *Anopheles* (Meigen) koji je rasprostranjen po cijelom svijetu s više od 400 opisanih vrsta, kompleksa vrsta, podvrsta i varijeteta (Becker et al., 2010). Klasifikacija roda *Anopheles* započeta je prije više od 100 godina u radovima Theobalda (Theobald, 1901) i još uvijek nije završena. Trenutno rod *Anopheles* sačinjava sedam podrodova: *Anopheles*, *Baimaia*, *Cellia*, *Kerteszia*, *Lophopodomyia*, *Nyssorhynchus* i *Stethomyia*. Kao i u prethodnom slučaju i ovdje je, zbog važnosti i brojnosti, naglasak na podrodu *Anopheles*. Taksonomske kategorije ispod nivoa podroda nemaju formalni status prema Međunarodnom propisu za zoologijsku nomenklaturu (Nomenclature, 1999) nego su više informativnog karaktera, često temeljene na površnim sličnostima i ne moraju nužno ukazivati na prirodnu povezanost. Ovakve informativne kategorije su: sekcije, serije, grupe, podgrupe i kompleksi vrsta. Prema ovoj podjeli raščlanjen je i podrod *Anopheles*. Preko

sekcije *Angusticorn* dolazi se do serije *Anopheles* u kojoj se nalazi *Maculipennis* grupa i unutar nje *Maculipennis* kompleks:

podrod *Anopheles* Meigen

Angusticorn sekcija (Reid i Knight, 1961)

Anopheles serija (Edwards, 1932)

Maculipennis grupa (Reid i Knight, 1961)

Maculipennis kompleks

artemievi Gordeyev, Zvantsov, Goryacheva,
Shaikevich & Yezhov

atroparvus van Thiel

daciae Linton, Nicolescu & Harbach

labranchiae Falleroni

maculipennis Meigen

martinius Shinagarev

melanoon Hackett

messeae Falleroni

persiensis Linton, Sedaghat & Harbach

sacharovi Favre

Slika 1. Taksonomska klasifikacija i popis vrsta *Anopheles maculipennis* kompleksa. Preuzeto i prilagođeno s www.mosquito-taxonomic-inventory.info/ (Harbach, 2014)

Kao što se može vidjeti na prethodnoj slici unutar *Maculipennis* kompleksa se nalazi deset vrsta koje su smještene u kompleks upravo zbog svoje velike morfološke sličnosti. Ovaj kompleks zapravo predstavlja reprezentativni primjer sestrinskih vrsta.

Ovako detaljna i precizna podjela i sistematizacija unutar roda *Anopheles* je posljedica velikog utjecaja kojeg ovaj rod ima na ljudsko zdravlje i zbog čega je nedvojbeno najproučavaniji rod među komarcima.

Kada je 1898. godine otkriveno da malariju prenosi komarac roda *Anopheles*, *Anopheles maculipennis* je označen kao krivac za malariju u Europi i počela je sustavna borba protiv protiv prijenosnika ove teške, ali i u velikom broju i smrtonosne bolesti. Tadašnja istraživanja koja su se bavila malaričnim komarcima i prijenosom malarije dovela su do nekih kontradiktornih zaključaka – distribucija ove vrste i pojave malarije se ne poklapaju. Ovaj „fenomen“ je svojedobno bio opisan kao – anofelizam bez malarije (Hackett, 1937). Nakon niza istraživanja dokazalo se da malarični komarci pokazuju različito ponašanje (npr. odabir staništa, izbor domaćina, rojenje) na različitim područjima, što je u konačnici dovelo do zaključka kako je tu riječ o kompleksu vrsta od kojih su samo neke podložne zarazi i prijenosu uzročnika bolesti – *Plasmodium* sp, odnosno bolesti zvane malarija.

Prve morfološke razlike među vrstama iz ovog kompleksa utvrđene su u stadiju jaja, a zatim i neke manje razlike u stadiju ličinke. No, ostao je problem kod razlikovanja odraslih jedinki koje je bilo teško ili čak nemoguće morfološki razlikovati. Međutim, iako morfološki slične ili identične (što otežava mogućnosti precizne identifikacije) vrste unutar kompleksa mogu imati različite biološke karakteristike kao što je odabir staništa, drugačije razdoblje aktivnosti i izbora plijena, osjetljivost ili rezistentnost na neke insekticide, podložnost zarazi parazitima i sl. Ove karakteristike uvelike mogu pomoći pri određivanju kapaciteta vektora, odnosno mogućnosti prijenosa uzročnika bolesti.

Do danas je pomoću molekularnih metoda utvrđeno da se *Maculipennis* grupa sastoji ukupno od 24 vrste, a *Maculipennis* kompleks unutar nje, gdje se nalaze uglavnom europske vrste, sačinjava deset vrsta (Harbach, 2013; 2014) (slika 1.)

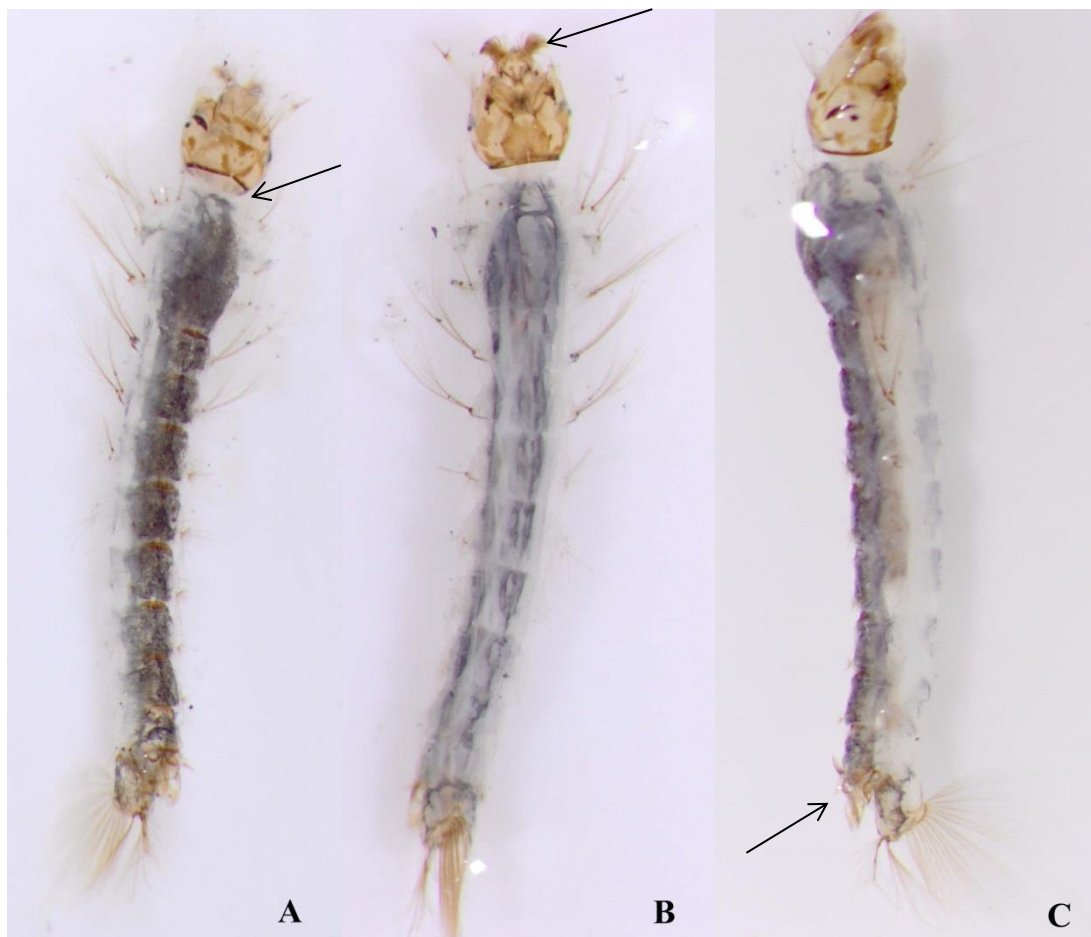
2.2. Biološke značajke malaričnih komaraca

Komarci iz roda *Anopheles* su uglavnom srednje veličine s dugim i tankim nogama te relativno uskim krilima. Obojenje im varira od sive, smeđe ili skoro crne pa do bjelkaste, blijede, ali bez metalnog sjaja (Becker et al., 2010)(Slika 2.A). Proboscis im je ravan, tanak i dugačak. Kod oba spola palpi su najčešće dugački kao i proboscis što je jedna od karakteristika roda (Slika 2.B). Krila su relativno uska, često s tamnijim i svjetlijim ljuskicama koje formiraju karakteristične točke na krilima (Slika 2.C). Dlačice ispred stigme su najčešće prisutne (Slika 2.D). Zadak je najčešće taman, prekriven raznobojnim dlačicama i uglavnom bez ljuskica.



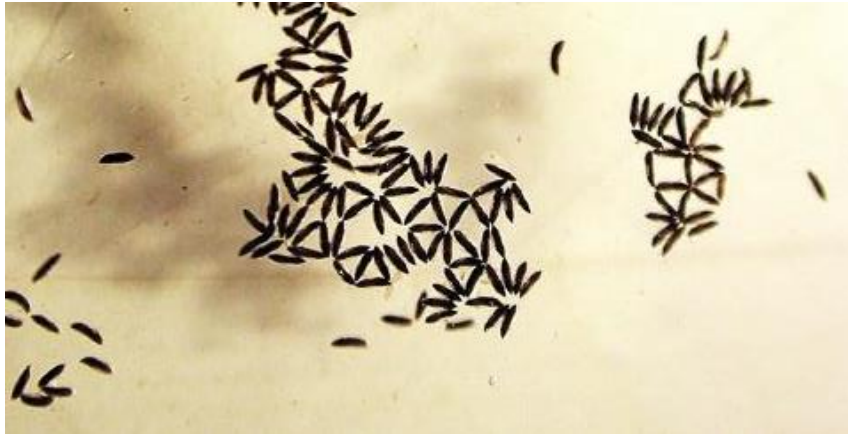
Slika 2. A, B, C i D: Osnovne morfološke značajke odraslog malaričnog komarca, *Anopheles maculipennis* s.s. Primjerak uhvaćen na lokalitetu Bijeli Vir, dolina Neretve

Ličinke komaraca iz roda *Anopheles* se obično mogu naći u prirodnim vodenim površinama i puno rjeđe u umjetnim. Preferirana mjesta za odlaganje jaja su trajna i polutrajna jezera, bare, lokve i kanali s razvijenom vodenom vegetacijom. Također ih se može naći u rižinim poljima, močvarama te rubnim dijelovima većih rijeka ili jezera gdje je protok vode reducirana. Ono što razlikuje ličinku roda *Anopheles* od drugih komaraca je njezino hranjenje. Naime, ova ličinka se hrani tankim biofilmom koji se nalazi na površini (Becker et al., 2010). U položaju hranjenja njen je položaj vodoravan, leđima okrenutim prema površini. Ličinka ima mogućnost rotacije glave u jednu i u drugu stranu za 180° što joj omogućuje pristup ustima prema površini i filtriranje hranjivih tvari (Slika 3.A,B). Zbog ovakvog položaja i načina hranjenja ličinke na kraju tijela nemaju sifon što ih čini prepoznatljivima čak i u prirodnim uvjetima (Slika 3.C).

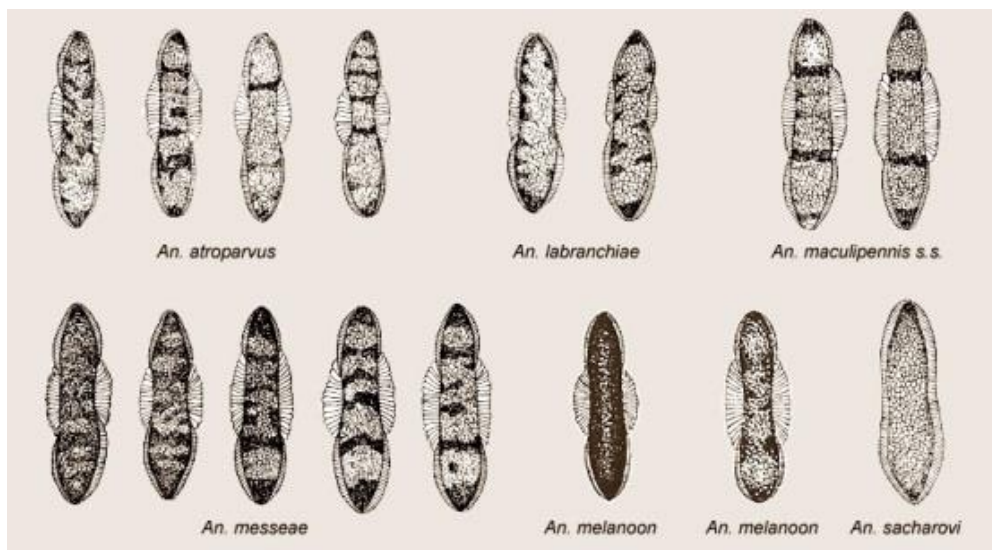


Slika 3.: Osnovne morfoške značajke ličinke komaraca vrste *Anopheles messeae*; A – dorzalno, B- ventralno, C – lateralno. Primjerak uhvaćen na lokalitetu Dunavac, stari rukavac rijeke Dunav, Ilok

Komarac malaričar svoja jajašca polaže pojedinačno, izravno na površinu vode gdje leže vodoravno. Često se zbog površinske napetosti vode i oblika jaja nekoliko jaja svojim krajevima spoji pritom stvarajući oblike poput trokutića, zvjezdica ili trakica (Slika 4.). Oblikom podsjećaju na brod, a sa strana se nalaze plovci ispunjeni zrakom. Broj plovaka je različit kod različitih vrsta. Za vrste iz kompleksa *Anopheles maculipennis* obojenje gornje površine jajašca i oblik površine zračnih plovaka je važan detalj za identifikaciju vrsta (Slika 5.).



Slika 4. Jaja komaraca iz roda *Anopheles* nalaze se pojedinačno na površini vode, no zbog površinske napetosti mogu se vršno spajati stvarajući pritom nove strukture



Slika 5. Morfološke razlike u obojenosti i obliku bočnih zračnih plovaka kod jaja najčešćih vrsta komaraca iz kompleksa *Anophles maculipennis* (preuzeto iz: The Mosquitoes of Europe – Identification and training programme (Schaffner et al., 2001))

Što se tiče ostalih bioloških čimbenika kod komaraca unutar kompleksa *Anopheles maculipennis* oni se ipak razlikuju od vrste do vrste te ih je stoga potrebno razdvojiti. U sljedećim odlomcima razmatrati će se preferirana staništa i domaćini, hibernacija te vektorske sposobnosti vrste.

Anopheles atroparvus Van Thiel, 1927. - vrsta čije se ličinke mogu naći u različitim oblicima stajaćih polutrajnih i trajnih voda. Mogu se razvijati i u slatkovodnoj i u slanoj vodi no preferiraju boćatu. Zabilježeni su i u blizini slaništa (Adamović, 1978). Stanište je uglavnom osunčano s velikom količinom algi i submerzivne vegetacije. Hiberniraju u odraslom obliku, ali s nepotpunom diapauzom. Ženka ostaje aktivna tijekom zime i može neredovito uzimati krvne obroke bez ovipozicije (Becker et al., 2010). Uglavnom su zoofilna vrsta, no rado se hrane i na ljudima. Nekad se svrstavao u primarne vektore malarije, jer dobro prenosi europski soj (Sinka et al., 2010a), ali nije u mogućnosti prenositi tropski soj *Plasmodium falciparum* (Ramsdale i Coluzzi, 1975; Vicente et al., 2011)

Anopheles artemievi Gordeyev, Zvantsov, Goryacheva, Shaikevich & Yezhov, 2005. - novopisana vrsta za koje nedostaju potpuni podatci. Pronađena je u Kirgistanu, u štali s kravama (Gordeev et al., 2005).

Anopheles messeae Faleroni, 1926. – ličinke ove vrste se gotovo isključivo nalaze u većim, svježim, slatkovodnim vodenim tijelima s gustom podvodnom vegetacijom. Pojavljuju se na rubovima rijeka, jezera, poplavnim nizinama i močvarama. Izbjegavaju staništa s puno otopljene organske tvari. Hiberniraju u odrasom obliku s potpunom diapauzom. Ženke su naročito zoofilne i gotovo isključivo se hrane na domaćim životinjama (Jetten i Takken, 1994). Osjetljiv je na uvjete: visoke temperature i male vlažnosti. Podložan je zarazi s *Plasmodium vivax*, ali ne i s tropskim sojem *P. falciparum*. Ne smatra se vektorom malarije u sjeverozapadnoj Europi (Sinka et al., 2010a).

Anopheles daciae Linton, Nicolescu & Harbach, 2004. – također novoopisana vrsta za koju nedostaju potpuni podatci. Utvrđeno je da je vrsta simpatrična s vrstom *An. messeae* te se pretpostavlja kako je za prijenos malarije koji je bio utvrđen za *An. messeae* možda ipak bila kriva vrsta *An. daciae* (Kronefeld et al., 2012; Nicolescu et al., 2004). Međutim, neophodna su nova epidemiološka istraživanja za svaku vrstu za potvrdu ovih pretpostavki. (Sinka et al., 2010a).

Anopheles labranchie Faleroni, 1926. – ličinke ove vrste mogu se naći u slatkovodnim i boćatim vodama u obalnom području. Nastanjuju priobalne močvare, zasjenjene rubove potoka, rižina polja, travnate lokve i sl. (Bettini et al., 1978). Toleriraju salinitet od čak 10g/L (Becker et al., 2010). Hiberniraju u odraslom obliku, a diapauza može biti potpuna i nepotpuna. Ženke su uglavnom antropofilne iako ponekad napadaju domaće životinje. Izrazito je endofilna vrsta i rado se skriva po ljudskim nastambama, štalama, torovima i sl. (D'Alessandro et al., 1971). *An. labranchiae* se smatra refraktornim, odnosno nezaraznim za egzotične sojeve *P. falciparum*, no postoje neki eksperimentalni dokazi slabe zaraze određenim afričkim sojevima *P. falciparum* ili *P. vivax* (Romi et al., 2001).

Anopheles maculipennis s.s. Meigen, 1818. – vrsta po kojoj je kompleks dobio ime. Ličinke se uglavnom pojavljuju u čistim vodama na višim nadmorskim visinama, no može ih se naći i u nizinama i obalnim područjima. Tipična staništa su zaklonjena mjesta u tekućim potocima, rubovima rijeka, rižina polja i umjetni bazeni. Hiberniraju potpuno u napuštenim objektima bez prisustva potencijalnog domaćina. Izrazito zoofilna vrsta koja rado napada domaće životinje, no u njihovom nedostatku hranit će se i na ljudima. Ne smatra se prijenosnikom uzročnika malarije.

Anopheles melanoon Hackett, 1934. – ličinke ove vrste preferiraju veće, stajaće vode s ponešto vegetacije. Mogu se naći u močvarama, rubovima rijeka i jezera, lokvama i barama. Hiberniraju u odraslom obliku s potpunom diapauzom. Ženke pokazuju sklonost zoofiliji i domaćim životinjama, no zabilježeno je i hranjenje na ljudima (Simsek et al., 2011). Rijetka je vrsta i nema značajan vektorski kapacitet.

Anopheles sacharovi Favre, 1903. – ova vrsta se čak i u odraslom obliku može razlikovati od ostalih vrsta u kompleksu po nešto svjetlijem mezonotumu i nekim karakteristikama krila, dok jaja nemaju plovke (Slika 5.). Ličinke se uglavnom mogu naći u otvorenim, osunčanim plitkim vodama s gustom površinskom vegetacijom, u slatkoj i slanoj vodi. Tolerantnije su na visoke temperature i salinitet od drugih vrsta iz kompleksa i razvijaju se u priobalnim močvarama, lagunama, odvodnim kanalima, rižinim poljima, barama. Ličinke su slabo pokretne i rijetko napuštaju površinu. Za hiberniranje obično traže štale i torove i povremeno se hrane tijekom zime. Ženke su oportunisti i hrane se na ljudima i na domaćim životinjama. Smatra se dominantnim vektorom malarije za područje južne Europe (Sinka et al., 2010a)

Anopheles persiensis Linton, Sedaghat & Harbach, 2003. – novije opisana vrsta nađena uz obale Kaspijskog mora, u Iranu. Budući je pronađena u torovima s domaćim životinjama vrsta se čini egzofilna i zoofilna. Mjesto pronalaska bilo je u blizini bara i rižinih polja. Prijenos malarije i vektorski kapacitet još nije određen (Sedaghat, 2009).

Anopheles martinius Shinagarev, 1926. – vrsta koje je prvotno smatrana varijetatom vrste *An. sacharovi*, a naknadno joj dodijeljen status vrste na osnovi citotaksonomskih razlika (White, 1978). Iznimno rijetka vrsta, biološke značajke, osim nalaza u Uzbekistanu i Turkemistanu (Glick, 1992; White, 1978), nisu poznate.

2.3. Distribucija i pregled povijesnih istraživanja vrsta komaraca *Anopheles maculipennis* kompleks u Hrvatskoj

Kada je Europa u pitanju, od vrsta koje pripadaju kompleksu *Anopheles maculipennis* trenutno tu obitava sedam palearktičkih vrsta: *An. maculipennis*, *An. atroparvus*, i *An. messeae* su najčešći i široko rasprostranjeni. *An. labranchiae* i *An. sacharovi* su prisutni samo na Mediteranskoj obali, *An. melanoon* u južnoj i jugozapadnoj Europi (Proft et al., 1999), *An. daciae* se „širi“ sa svojim nalazima po Europi, zasad su to zemlje: Rumunjska (Nicolescu et al., 2004), Engleska (Linton et al., 2005), Njemačka (Kronefeld et al., 2012; Kronefeld et al., 2014; Weitzel et al., 2012) i Hrvatska. Dok su *An. martinius*, *An. artemievi* i *An. persiensis* ne-Europske vrste iz Male Azije, no i za neke od njih postoji mala mogućnost introdukcije (Patsoula et al., 2007; Simsek et al., 2011).

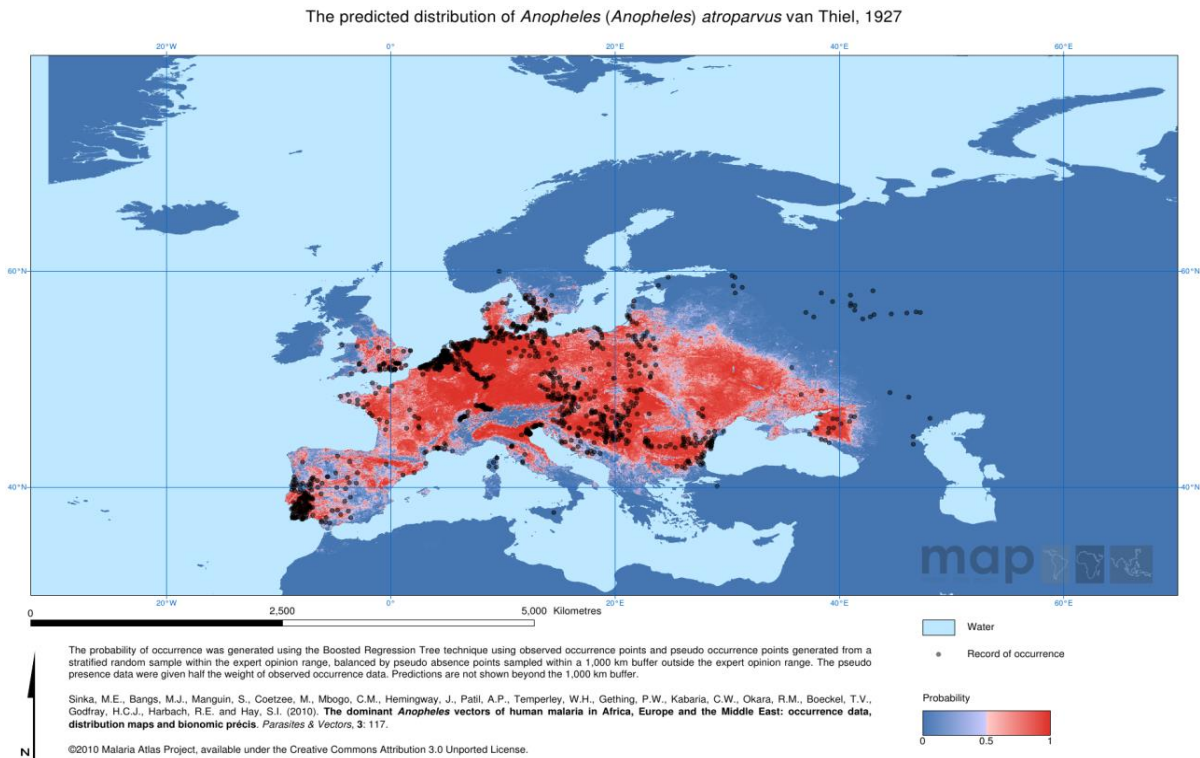
Prema povijesnim istraživanjima koje su provodili Adamović i Paulus 70-ih i 80-ih godina prošlog stoljeća na području današnje Hrvatske je na osnovi morfologije jaja ustanovljeno pet vrsta iz kompleksa *Anopheles maculipennis*, a to su: *An. maculipennis*, *An. messeae*, *An. atroparvus*, *An. sacharovi* i *An. subalpinus*. Istraživanja su bila podijeljena prema područjima što je dalo slijedeće podatke o rasprostranjenju vrsta: na području Podravine, Podunavlja i Slavonije *An. messeae* je bila dominantna vrsta, *An. maculipennis* – prisutna, a *An. atroparvus* vrlo rijetka (Adamović, 1982b), u srednjoj Posavini i u Zagrebačkoj regiji *An. messeae* je bila daleko najbrojnija vrsta dok je vrsta *An. maculipennis* bila srednje česta (Adamović i Paulus, 1984). Na području Istre pronađene su vrste *An. maculipennis* i *An. atroparvus* s tim da je $\frac{3}{4}$

brojnosti jedinki pripadalo vrsti *An. maculipennis*. Autori u ovom radu navode kako na području Istre nisu našli prethodno prijavljenu vrstu *An. sacharovi* (Adamović i Paulus, 1987). Na području Like vrsta *An. maculipennis* je također bila dominantna, dok se vrsta *An. messeae* javljala sporadično (Adamović i Paulus, 1985b). Delta rijeke Neretve bila je vrstama najbogatije područje u ovim istraživanjima te su tamo pronađene vrste *An. messeae* kao dominantna vrsta oko slatkovodnih jezera, *An. subalpinus* kao dominantna vrsta na samoj delti, *An. maculipennis* kao srednje česte vrsta i *An. sacharovi* kao rijetka vrsta nađena samo na tri lokaliteta (Adamović, 1983).

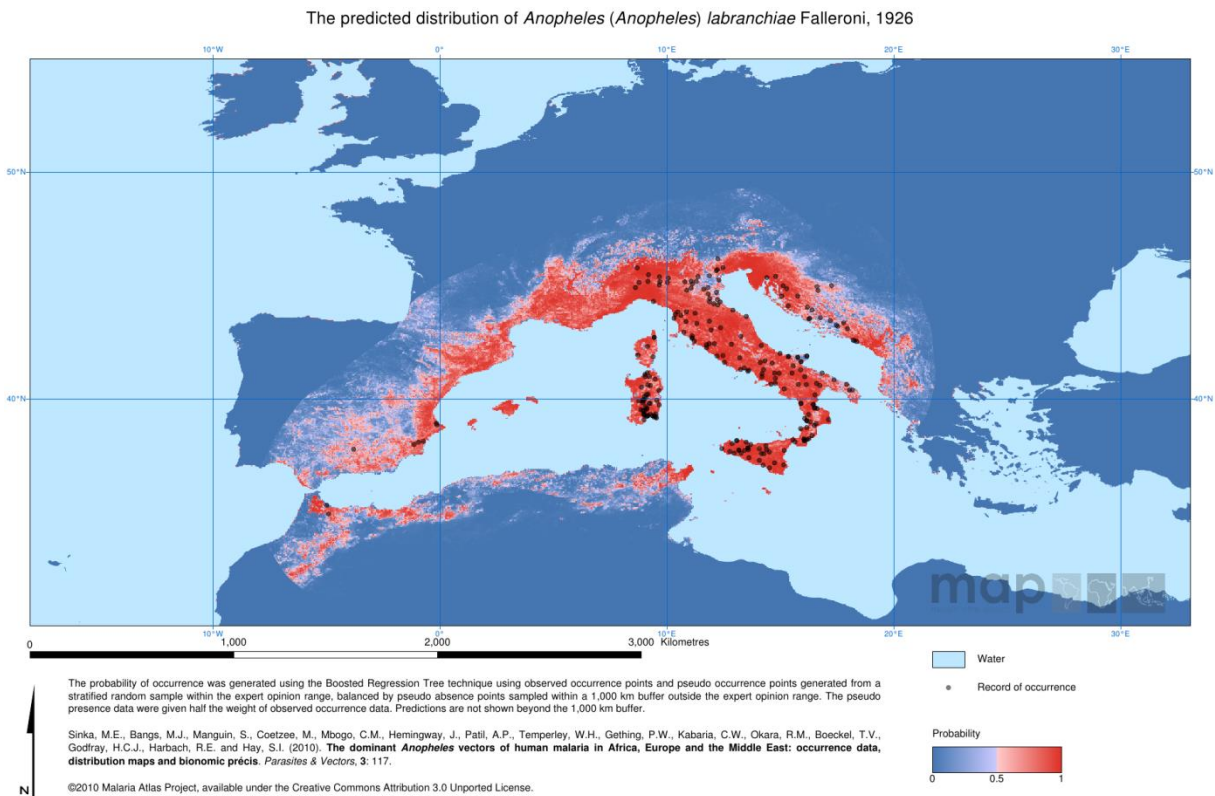
U okolici Osijeka utvrđene su dvije vrste i to dominantna *An. messeae* i prisutna *An. maculipennis* (Merdić, 1990). Sezonska dinamika ovih vrsta utvrđena je nešto kasnije (Merdić i Boca, 2004).

Proučavanje struktura zajednica komaraca u različitim staništima Dalmacije dala je slične rezultate (Romanović, 2007), pritom je zastupljenost vrsta iz kompleksa *An. maculipennis* na staništima bila 14%, dok je udio u fauni varirao od 0 do 10%. U istom istraživanju ličinke vrsta iz ovog kompleksa su najčešće pronađene u prirodnim staništima poplavnog područja i rubovima jezera, a od umjetnih staništa gotovo isključivo su se mogle naći u cisternama.

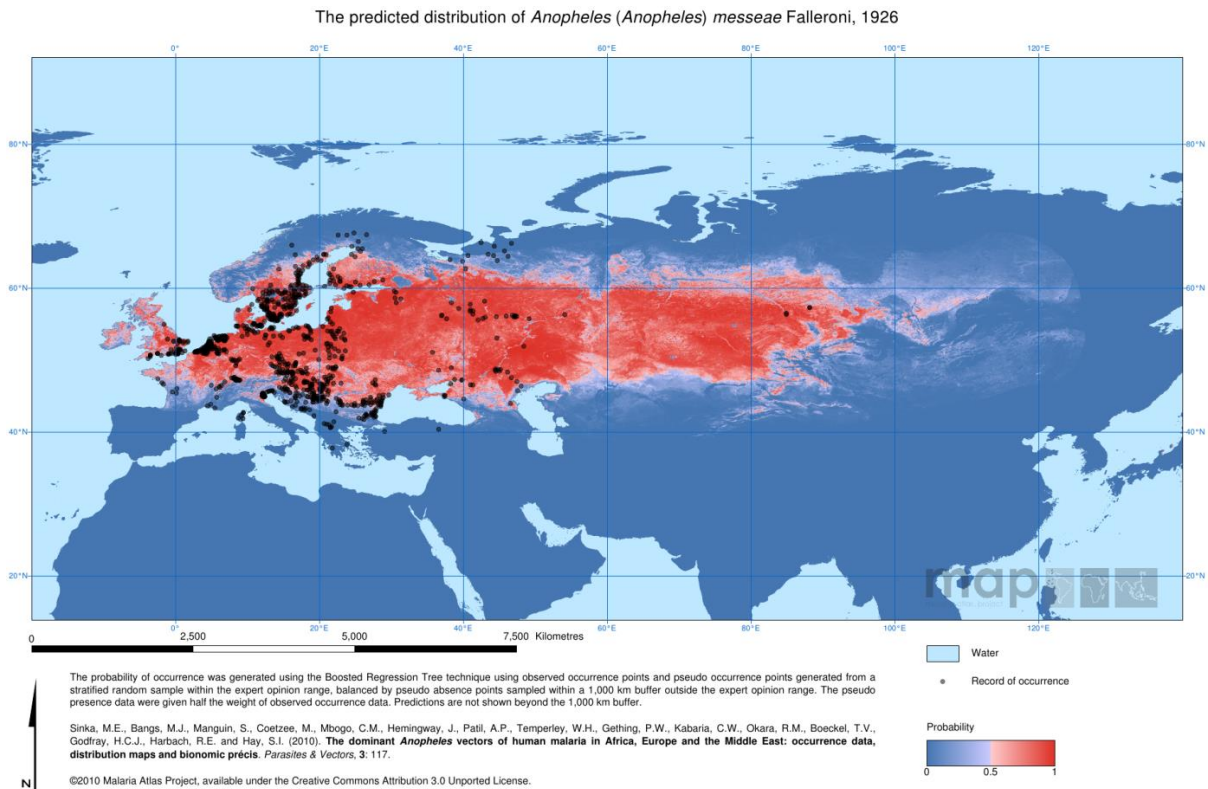
Najnovija istraživanja distribucije roda *Anopheles* rađena su u sklopu projekta MAP (Malaria Atlas Project) gdje su izračunate predikcijske karte rasprostranjenja dominantnih vrsta vektora malarije u svijetu (Sinka et al., 2010a; Sinka et al., 2010b) (Slika 6., 7., 8., 9.).



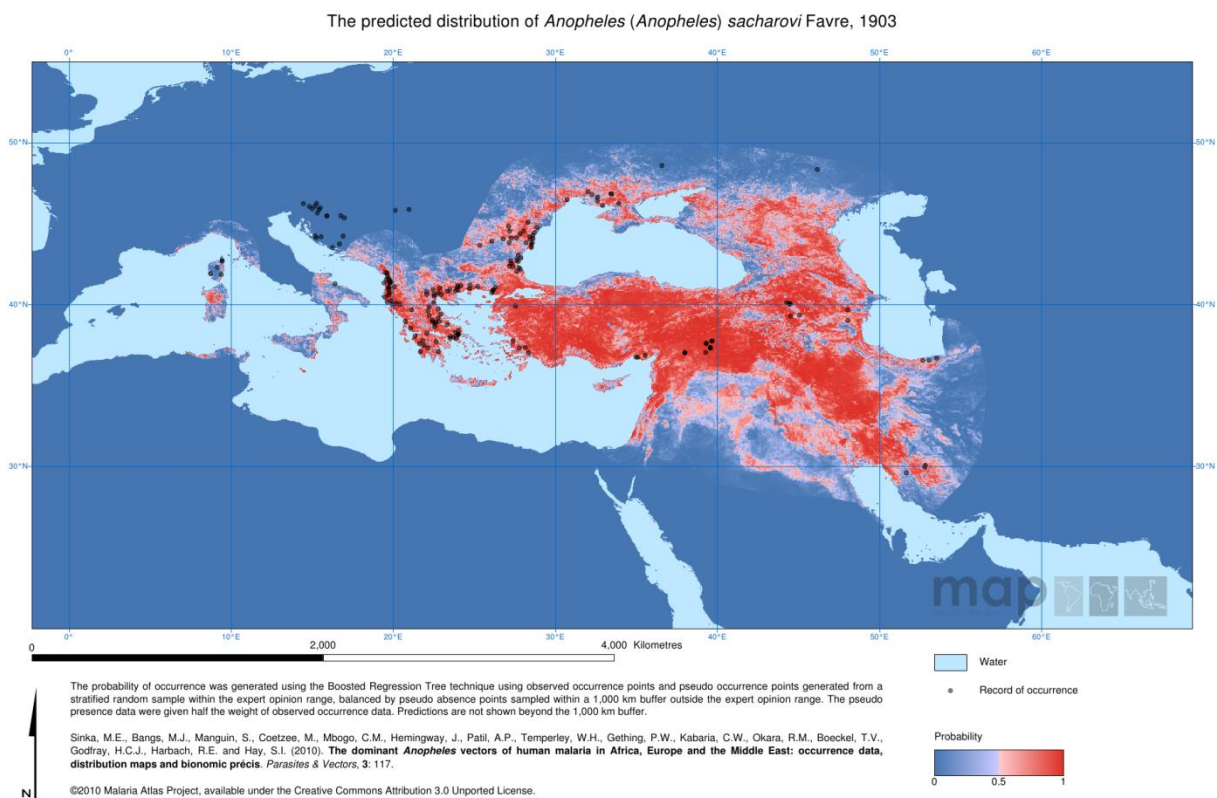
Slika 6. Predikcijska karta rasprostranjenja vrste *Anopheles atroparvus* prema podacima Malaria Atlas Projekta



Slika 7. Predikcijska karta rasprostranjenja vrste *Anopheles labranchiae* prema podacima Malaria Atlas Projekta



Slika 8. Predikcijska karta rasprostranjenja vrste *Anopheles messeae* prema podacima Malaria Atlas Projekta



Slika 9. Predikcijska karta rasprostranjenja vrste *Anopheles sacharovi* prema podacima Malaria Atlas Projekta

2.4. Tehnike i metode raspoznavanja vrsta unutar kompleksa

Anopheles maculipennis

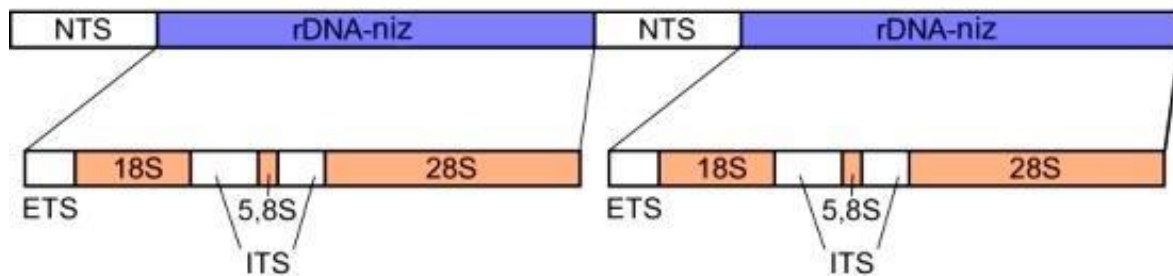
Zasada postoje dvije tradicionalne tehnike koje se često koriste za raspoznavanje sestrinskih vrsta i/ili podvrsta unutar izolacijskih mehanizama koji djeluju prije i poslije razmnožavanja (Harbach, 2013). Postreproduktivne tehnike uključuje umjetno križanje i hibridizaciju za utvrđivanje mogućnosti nastanka hibrida te njegovih karakteristika (smrtnost, sterilnost...) (Singh et al., 2010). Prereproduktivne tehnike uključuju istraživanje politenih kromosoma kod divljeg tipa i potomaka izo-ženskih linija iz laboratorijskog uzgoja kako se bi se utvrdile eventualne razlike u specifičnim sustavima prepoznavanja partnera (Sawadipanich et al., 1990).

Moderne metode razlikovanja vrsta unutar ovog kompleksa svakako obuhvaćaju molekularna istraživanja specifičnih genomskih markera. Prednost ovih metoda temeljenih na lančanoj reakciji polimerazom je što je za analize potrebno svega nekoliko nanograma DNA (Collins i Paskewitz, 1996). Međutim pojavljuju se kontraverze ukoliko se kao jedini kriterij odvajanja sestrinskih vrsta i/ili podvrsta koriste DNA sekvence određene genske regije. Naročito ukoliko nisu dovoljno istražene. Primjerice, prema usporedbi genske regije 28S-D3 *An. fluviatilis* i *An. minimus* mogu se smatrati sinonimima (Garros et al., 2005). Međutim usporedbom ITS2 i D2-D3 regija dolazi se do zaključka kako ove dvije vrste ne bi trebale biti sinonimi (Singh et al., 2006). Sličan primjer je analiza DNA sekvenci između *An. lesteri* i *An. paraliae* gdje genetička udaljenost za gen COI iznosi 0,007-0,017 s 4 do 9 nukleotidnih supstitucija dok je za iste vrste genetička udaljenost prema ITS2 regiji znatno veća – 0,04 sa 16 nukleotidnih supstitucija (Harbach, 2013).

Kod odvajanja vrsta unutar *Anopheles maculipennis* kompleksa u novije vrijeme se najčešće koriste molekularne metode koje uključuju analizu ITS2 regije (engl. Internal Transcribed Spacer) ribosomalne RNA (rRNA) (Di Luca et al., 2004).

Kod kukaca, ova DNA se sastoji od ponavljajućih transkripcijskih jedinica koje sadrže gene za 18S, 5.8S i 28S podjedinice ribosomalne RNA. ITS regije odvajaju 5.8S gene od gena za 18S i 28S podjedinicu, što znači da se u osnovi rRNA sastoji od transkripcijskih jedinica i intergenskih zona razdvajanja na kojima se ne odvija transkripcija (Slika 10.). Ponavljajuće

jedinice rRNA ne evoluiraju nezavisno već relativno ujednačenom evolucijskom stopom unutar jedinki i unutar same vrste. Za razliku od kodirajućih regija rRNA koje sadrže gene i koje su evolucijski dobro konzervirane, razdjelne regije su čini se relativno slobodne da evoluiraju, čak i kod blisko povezanih organizama. Prema tome, ITS regije se pokazaju kao korisan alat za utvrđivanje evolucijskih poveznica na različitim taksonomskim nivoima, uključujući i one recentno nastale kao što su sestrinske vrste kod komaraca (Linton et al., 2003; Marinucci et al., 1999). Čak i nasuprot drugih, često korištenih genskih markera (npr. COI) ITS2 regija je pokazala puno bolju razlučivost i mogućnost razdvajanja vrsta (Di Luca et al., 2004; Linton et al., 2002a; Patsoula et al., 2007).



Slika 10. Segment gena eukariotske ribosomalne DNA s podjedinicama 18S, 5.8S i 28S koji tvore ponavljajuću rDNA-niz; NTS – netranskribirajući dio (engl. nontranscribed spacer); ETS – vanjski transkribirajući dio (engl. external transcribed spacer); ITS – unutarnji transkribirajući dijelovi (engl. internal transcribed spacers)

Iako se od jedne kopije DNA u lančanoj reakciji polimerazom može dobiti više milijuna kopija, ovaj proces je strogo kontroliran i ovisi o nizu čimbenika (Ambriović Ristov, 2007).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Područje istraživanja

Hrvatska je europska država, zemljopisno smještena na prijelazu iz Srednje u Jugoistočnu Europu. Zemljopisno Hrvatska obuhvaća prostor koji se proteže od Panonske nizine preko Dinarskog gorja do obale Jadranskog mora. Unutrašnjost stoga ima odlike umjerene kontinentalne klime, dok na jadranskoj obali prevladava sredozemna klima. Polovicom svoga teritorija Hrvatska se nalazi u panonsko-peripanonskom prostoru, trećinom u primorskom ili jadranskom dijelu, dok ostatak čini gorski ili dinarski prostor. Shodno tome je i podjela na 3 osnovne klimatsko-vegetacijske zone: Mediteranska klimatsko-vegetacijska i ekološka zona, Panonska i peripanonska klimatsko-vegetacijska i ekološka zona, te Gorska klimatsko-vegetacijska i ekološka zona.

Za potrebe izrade ovog rada je bilo potrebno što potpunije pokriti geografske i klimatske cijeline unutar Hrvatske, no zbog velike površine koju bi trebalo obuhvatiti birana su ciljana područja s lokalitetima i staništima koje vrste iz ovog kompleksa preferiraju. Odabrana područja raspoređena su u zemljopisnim i klimatskim cjelinama Hrvatske, a obuhvaćaju prostore Dalmacije, Dalmatinske zagore, Like, Istre, područja grada Zagreba, Međimurja, zapadne i istočne Slavonije, te Baranje. Unutar svake cjeline je, ovisno o geografskim i ekološkim čimbenicima izabrano 5 do 15 lokaliteta uzorkovanja.

Uzorkovanje je obavljeno na preko 120 lokaliteta, a komarci, bilo ličinke i/ili odrasli, iz kompleksa *Anopheles maculipennis* su pronađeni na 58 lokaliteta (Tablica 1.). Unutar svakog lokaliteta posebna pozornost je posvećena mikrostaništima, te ukoliko je bilo moguće uzorkovanje je provedeno na više njih.

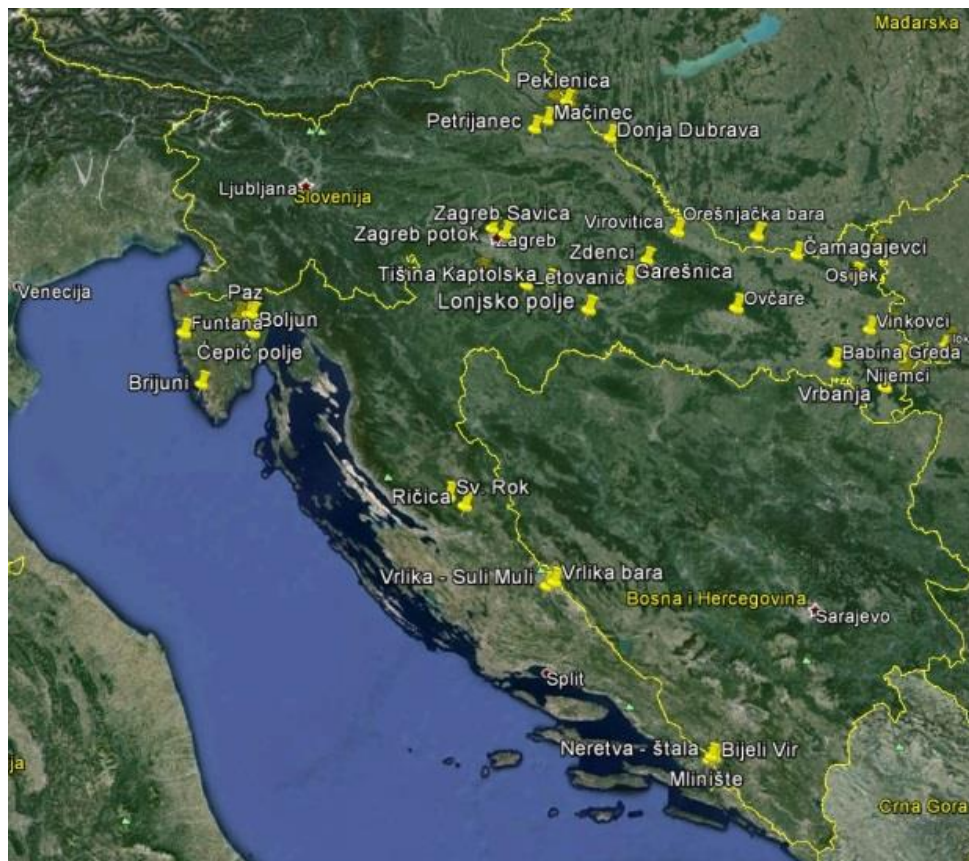
Tablica 1. Mjesta uzorkovanja komaraca iz kompleksa *Anopheles maculipennis* na području Hrvatske. Unutar svakog lokaliteta dodatno je uzorkovano na nekoliko mikrostaništa. Za svaki lokalitet uvrštene su GPS koordinate te nadmorska visina.

Regija	broj	lokalitet	koordinate (° ' ")	nmv/ m	broj uzorkovanih jedinki
Baranja	1	Čarna	45 42 28N 18 52 08E	79	12
Zagorje	2	Petrijanec	46 21 05N 06 13 36E	168	6
Međimurje	3	Žabnik	46 31 38N 16 22 32E	163	11

Međimurje	4	Žabnik - štala	47 31 35N 16 22 38E	170	30
Međimurje	5	Križovec	46 29 26N 16 29 46E	157	10
Međimurje	6	Križovec - rukavac	46 29 52N 16 29 30E	154	18
Međimurje	7	Mačinec	46 23 08N 16 19 29E	174	4
Međimurje	8	Donja Dubrava	46 18 22N 16 48 46E	133	1
Međimurje	9	Peklenica	46 29 49N 16 28 26E	164	9
Slavonija	10	Nijemci	45 08 23N 19 02 17E	83	8
Slavonija	11	Vinkovci	45 17 29N 18 49 12E	90	4
Slavonija	12	Babina Greda	45 06 40N 18 31 59E	81	3
Slavonija	13	Osijek	45 34 25N 18 40 47E	81	17
Slavonija	14	Lipovac	45 03 53N 19 04 22E	80	11
Slavonija	15	Vinkovci - Lenije	45 17 08N 18 48 04E	84	1
Slavonija	16	Ilok Dunavac	45 13 35N 19 22 45E	79	30
Slavonija	17	Ilok bare	45 13 11N 19 24 08E	93	35
Istra	18	Cerovlje	45 17 33N 14 00 52E	295	8
Istra	19	Funtana	45 10 46N 13 36 21E	1	15
Istra	20	Boljun štala	45 16 50N 14 07 30E	96	10
Istra	21	Čepić Polje 1	45 11 52N 14 07 53E	35	0
Istra	22	Čepić Polje 2	45 11 31N 14 08 12E	22	0
Istra	23	Lokva 1	44 58 21N 13 50 29E	130	0
Istra	24	Lokva 2	45 02 35N 13 45 04E	93	0
Istra	25	Lokva 3	45 26 26N 14 00 07E	496	0
Istra	26	Lokva Boljun	45 18 01N 14 07 21E	217	12
Istra	27	Dolina Raše okno 1	45 05 40N 14 01 36E	48	0
Istra	28	Dolina Raše okno 2	45 10 01N 14 04 10E	23	0
Istra	29	Dolina Raše kanal	45 03 33N 14 02 37E	7	0
Istra	30	Dolina Raše cijev	45 04 50N 14 01 38E	6	0
Istra	31	Čohilji bara	45 18 18N 14 00 54E	316	0
Istra	32	Dolina Mirne	45 20 21N 13 41 52E	2	0
Istra	33	Srbani	45 21 05N 13 38 17E	107	1
Istra	34	Paz	45 18 02N 13 57 36E	296	50
Istra	35	Brijuni	44 54 24N 13 45 28E	1	7
Istra	36	Boljun potok	45 18 06N 14 07 07E	206	0
Dalamacija	37	Neretva štala	43 00 59N 17 37 52E	2	30
Dalamacija	38	Neretva štala 2	43 01 25N 17 37 13E	0	0
Dalamacija	39	Mlinište	42 59 33N 17 36 56E	4	2
Zagora	40	Vrlika Bingo bara	43 25 28N 17 16 35E	394	0
Zagora	41	Vrlika Suli Muli	43 54 22N 16 24 21E	397	4
Zagora	42	Vrlika štala	44 54 24N 16 24 22E	396	0
Zagora	43	Žeravica - bare	43 55 37N 16 26 22E	372	0
Zagora	44	Bara Kukar - Zagora	43 47 29N 16 32 43E	438	0
Zagora	45	Izvor Cetine	43 58 37N 16 25 48E	389	0
Zagora	46	Kanjon Cetine 1	42 57 37N 16 25 48E	370	0
Zagora	47	Kanjon Cetine 2	43 38 27N 16 44 53E	295	0

Zagora	48	Kanjon Cetine 3	43 46 42N 16 37 26E	300	0
Zagora	49	Cetina - Blato	43 28 54N 16 50 24E	202	0
Zagora	50	Jezero Prančevići	43 33 13N 16 43 45E	275	0
Zagora	51	Gala	43 43 13N 16 42 32E	296	0
Zagora	52	Kanali Sinj-Otok	43 41 20N 16 41 23E	291	0
Zagora	53	Ergela Sinj	43 51 58N 16 38 25E	314	0
Zagora	54	Hrvace - štala1	43 44 50N 16 38 17E	322	0
Zagora	55	Hrvace - štala2	43 45 59N 16 37 24E	318	0
Zagora	56	Hrvace - štala3	43 45 41N 16 37 59E	301	0
Zagora	57	Hrvace - štala4	43 44 40N 16 37 21E	337	0
Zagora	58	Hrvace Miloševo jezero	43 44 44N 16 38 13E	312	0
Zagora	59	Hrvace Stipančevo jezero	43 44 40N 16 38 20E	311	0
Zagora	60	Hrvace - cdc klopka	43 44 38N 16 38 11E	309	0
Zagora	61	Knin - bare	44 02 13N 16 13 35E	220	0
Zagora	62	Knin - Šarena jezera	44 01 37N 16 13 22E	227	0
Dalamcija	63	Bijeli Vir - gornja bara	43 00 27N 17 39 27E	10	0
Dalamcija	64	Bijeli Vir - donja bara	43 00 34N 17 39 20E	5	3
Lika	65	Sv. Rok	44 24 19N 15 39 05E	660	30
Lika	66	Ričice	44 18 52N 15 47 56E	560	30
Središnja Hr	67	Pisarovina	45 34 44N 15 50 50E	110	3
Središnja Hr	68	Tišina Kaptolska	45 31 38N 16 22 18E	96	5
Središnja Hr	69	Crna Mlaka	45 35 20N 15 43 57E	107	0
Središnja Hr	70	Letovanić	45 30 27N 16 11 59E	98	0
Središnja Hr	71	Zagreb potok	45 48 19N 15 55 28E	120	5
Središnja Hr	72	Zagreb Savica	45 46 39N 16 01 27E	111	6
Slavonija	73	Lonjsko Polje 1	45 16 33N 16 56 22E	91	10
Slavonija	74	Lonjsko Polje 2	45 18 40N 16 47 57E	91	12
Slavonija	75	Lonjsko Polje 3	45 21 29N 16 45 42E	105	10
Slavonija	76	Lonjsko Polje 4	45 23 26N 16 40 46E	93	3
Slavonija	77	Lonjsko Polje 5	45 23 56N 16 41 29E	94	5
Slavonija	78	Lonjsko Polje 6	45 25 15N 16 37 12E	98	20
Slavonija	79	Lonjsko Polje 7	45 25 38N 16 38 11E	92	20
Slavonija	80	Lonjsko Polje 8	45 27 57N 16 33 06E	102	50
Slavonija	81	Lonjsko Polje 9	45 31 30N 16 32 46E	95	30
Slavonija	82	Lonjsko Polje 10	45 27 20N 16 26 26E	97	10
Slavonija	83	Orešnjačka bara	45 47 06N 17 56 42E	93	8
Slavonija	84	Mali Zdenci	45 39 52N 17 07 21E	121	2
Slavonija	85	Čamagajevci	45 41 21N 18 14 55E	92	4
Slavonija	86	Virovitica kanal	45 47 34N 17 20 16E	142	3
Slavonija	87	Virovitica ribnjaci	45 48 00N 17 19 29E	140	5
Slavonija	88	Velika Dapčevica	45 43 21N 17 16 52E	197	0
Slavonija	89	Dapčevački Brđani	45 42 57N 17 15 29E	143	1
Slavonija	90	Grubišno polje	45 42 28N 17 08 52E	152	2

Slavonija	91	Garešnica	45 33 48N 16 56 35E	111	0
Slavonija	92	Osijek 2/13	45 33 11N 18 43 29E	86	3
Dalmacija	93	Kosa	42 59 59N 17 37 43E	5	2
Dalmacija	94	Modro Oko	43 03 27N 17 30 38E	0	0
Dalmacija	95	Modro Oko - CDC	44 03 27N 17 30 38E	0	0
Dalmacija	96	Jezero Kutu - Badžula	42 57 35N 17 36 40E	11	0
Dalmacija	97	Jezero Kutu - Mislina	42 58 47N 17 36 20E	8	0
Dalmacija	98	Neretva delta - Blace	43 00 24N 17 28 57E	4	0
Dalmacija	99	Neretva delta - kamp	43 00 57N 17 28 06E	0	0
Dalmacija	100	Baćinska jezera 1	43 04 48N 17 25 56E	1	0
Dalmacija	101	Baćinska jezera 2	43 04 08N 17 25 58E	1	0
Dalmacija	102	Baćinska jezera CDC	44 04 08N 17 25 58E	1	0
Dalmacija	103	Baćinska j. - potok CDC	43 04 15N 17 26 04E	1	0
Dalmacija	104	Jezero Birina CDC	43 03 56N 17 26 33E	14	0
Dalmacija	105	Neretva plantaže CDC	43 01 11N 17 35 32E	0	0
Dalmacija	106	Neretva ušće CDC	43 01 47N 17 27 57E	0	0
Dalmacija	107	Jezero Desne CDC	43 04 01N 17 31 09E	7	0
Dalmacija	108	Desne štala	43 03 39N 17 31 58E	10	0
Dalmacija	109	Neretva - krave CDC	43 02 19N 17 38 36E	0	0
Dalmacija	110	Neretva štala 3	43 02 06N 17 37 57E	0	0
Slavonija	111	bara Zatoka	45 47 08N 17 58 33E	90	1
Slavonija	112	Budakovac	45 50 51N 17 37 30E	100	0
Slavonija	113	Ovčare	45 23 50N 17 47 22E	187	1
Slavonija	114	Osijek 8/14	45 24 26N 18 42 53E	81	20
Slavonija	115	Sarvaš	45 31 27N 18 50 37E	89	50
Međimurje	116	Pažut	46 19 26N 16 51 53E	131	0
Međimurje	117	Verak grabe	46 29 22N 16 29 59E	174	12
Međimurje	118	Kotoriba - farma	46 20 18N 16 48 32E	133	0
Međimurje	119	Mursko Središće	46 31 09N 16 25 27E	155	0
Međimurje	120	Vidovec	46 16 59N 16 13 56E	178	0
Dalmacija	121	Podobuče CDC	42 56 49N 17 17 04E	44	0
Dalmacija	122	Borje CDC	42 57 24N 17 15 35E	68	0
Dalmacija	123	Postup CDC	42 58 17N 17 14 23E	92	0
Dalmacija	124	Orebić CDC	42 58 33N 17 10 49E	14	0
Dalmacija	125	Rijeka Dubrovačka CDC	42 40 14N 18 07 42E	2	0
Dalmacija	126	Dubrovnik groblje CDC	42 38 50N 18 05 03E	30	0
Dalmacija	127	Dubrovnik Petka CDC	42 39 00N 18 04 42E	70	0



Slika 11. Karta Hrvatske s označenim reprezentativnim lokalitetima na kojima su pronađeni komarci iz kompleksa *An. maculipennis*

Prikupljanje komaraca u svrhu ovog istraživanja obavljeno je tijekom 2012., 2013. i 2014. godine. Budući jединke ove vrste prezimljuju u odraslom stadiju pojedina uzorkovanja su bila već u rano proljeće, tako da je datumski najraniji nalaz unutar jedne sezone bio u veljači, a najkasniji u listopadu. No, najveći broj uzorkovanja je ipak obavljen u vrijeme sezone kada je i najveća brojnost komaraca, odnosno od svibnja do srpnja, te u rujnu.

3.2. Uzorkovanje ličinki

Uzorkovanje ličinki se obavljalo na vodenim staništima pomoću mrežice za hvatanje ličinki promjera 25 cm (Slika 12.), te na malim i plitkim vodenim površinama pomoću staklenke.



Slika 12. Mrežica i staklenke za uzorkovanje ličinki komaraca

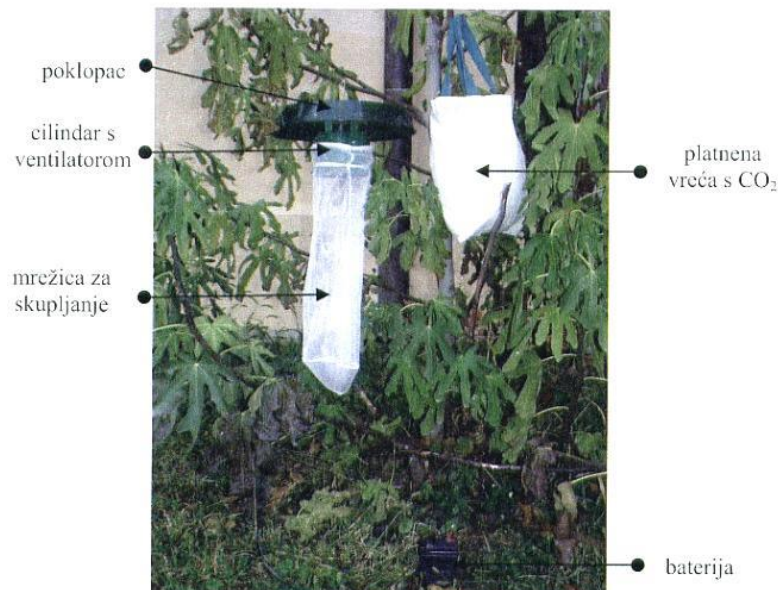
Sve uhvaćene ličinke četvrtog stadija i odrasle jedinke su nakon uzorkovanja bile pohranjene u 75-96% etanolu zbog očuvanja genetičkog materijala do analize. Ličinke prvog do trećeg ličinačkog stadija su bile prenešene u staklenci s uzorkovanom vodom do laboratorija gdje ih se uz hranjenje hranom za akvarijske ribice pokušalo uzgojiti do četvrtog stadija, a potom konzervirati u 96% etanolu.

3.3. Uzorkovanje odraslih komaraca

Odrasli komarci iz ovog kompleksa hvatani su na dva načina. Aktivno - na staništima gdje obitavaju odrasli komarci (ljudske nastambe, štale za životinje) pomoću aspiratora (Slika 13.), te pasivno - metodom CDC-klopke sa suhim ledom kao atraktantom (Silver 2008) (Slika 14.).



Slika 13. Aspirator za hvatanje odraslih komaraca



Slika 14. CDC-klopka sa suhim ledom kao atraktantom

Odrasle jedinke su nakon uzorkovanja usmrćene u hladnjaku na -20°C , determinirane i konzervirane 75-96%-tnom etanolu.

Za određivanje komaraca koje pripadaju kompleksu *Anopheles maculipennis* korišteni su identifikacijski ključevi (Becker et al., 2010; Gutsevich et al., 1974).

3.4. Izolacija DNA

Za izolaciju DNA iz komaraca korišten je komplet za izolaciju DNA (engl. DNA extraction kit) proizvođača *Invitrogen*, model *PureLink Genomic DNA mini kit* (Termo Fisher Scientific, SAD). Pri postupku izolacije slijedene su upute proizvođača uz manje prilagodbe. Prije samog postupka svi komarci su izvagani na analitičkoj vagi nakon čega se pristupilo protokolu koji je uključivao slijedeće korake:

- 1) cijeli komarac je stavljen u sterilnu tubicu te mu je dodano 180 μL pufera za razgradnju tkiva (Genomic Digestion Buffer) i 20 μL Proteinaze K
- 2) mehaničko usitnjavanje tkiva u puferu pri čemu je potrebno dobro usitniti tkivo, naročito kod odraslih komaraca gdje je prisutna čvrsta hitinska kutikula



- 3) inkubiranje tkiva u vodenoj kupelji (50-55°C) 4-24 sata uz povremeno miješanje

- 4) centrifugiranje pri maksimalnoj brzini 3 – 6 minuta na sobnoj temperaturi

- 5) supernatant se potom pažljivo prebacuje u novu sterilnu tubicu



- 6) dodati 20 μL RNase, kratko promiješati na vrtložnoj miješalici i inkubirati na sobnoj temperaturi 2 minute kako bi se uklonile eventualno zaostale RNA



- 7) dodati 200 μL pufera za lizu i vezanje DNA (Genomic Lysis/Binding Buffer) i promiješati na vrtložnoj miješalici



- 8) dodati 200 μL 96-100%-tnog etanola i promiješati na vrtložnoj miješalici 5 do 10s



- 9) kompletan produkt (cca 640 μL) prebaciti u kolonicu za ispiranje



- 10) centrifugirati pri 10 000 x g, 1 minutu na sobnoj temperaturi



- 11) baciti tubicu za prikupljanje i staviti kolonicu na novu sterilnu tubicu za prikupljanje eluata



- 12) dodati 500 μL pufera za ispiranje 1 (Genomic Washing Buffer 1)

- 13) centrifugirati pri 10 000 x g, 1 minutu na sobnoj temperaturi

- 14) baciti tubicu za prikupljanje i staviti kolonicu na novu sterilnu tubicu za prikupljanje eluata

- 15) dodati 500 μL pufera za ispiranje 2 (Genomic Washing Buffer 2)
- 16) centrifugirati pri maksimalnoj brzini, 3 minute na sobnoj temperaturi
- 17) baciti tubicu za prikupljanje i staviti kolonicu na novu sterilnu tubicu od 1,5 mL
- 18) dodati 50 μL sterilne vode (mqH_2O) i inkubirati 1 minutu na sobnoj temperaturi
- 19) centrifugirati pri maksimalnoj brzini, 1 minutu na sobnoj temperaturi
- 20) kolonice izvaditi, a tubice s eluatom spremite i čuvati na $+4^\circ\text{C}$

U koraku 18) može se koristiti i pufer za ispiranje (Genomic Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9,0, 0,1 mM EDTA)), no kod većih količina uzorka u reakciji EDTA iz pufera može inhibirati lančanu reakciju polimerazom. Stoga je za ispiranje bilo prikladnije koristiti sterilnu vodu.

3.5. Određivanje koncentracije i čistoće DNA

Mjerenje masene koncentracije ukupne DNA i čistoće u uzorku je obavljeno spektrofotometrijski – mjerenjem apsorbancije na valnoj duljini od 260 nm pomoću uređaja Nanophotometer P330 (Implen, Njemačka). Koncentracija je mjerena u 1 μl pri čemu je sterilna deionizirana voda korištena kao slijepa proba. Vrijednosti koncentracije su izražene u jedinicama $\text{ng}/\mu\text{l}$. Čistoća uzorka određena je na temelju omjera apsorbancije pri 260 nm i 280 nm (A_{260}/A_{280}). Čista DNA ima omjer A_{260}/A_{280} koji iznosi $\sim 1,9$.

Slijedi lančana reakcija polimerazom kako bi se željeni odsječak umnožio.

3.6. Umnažanje ITS2 odsječka rDNA lančanom reakcijom polimeraze

Iz uzoraka s izoliranom DNA komaraca pristupilo se izdvajanju željenog odsječka DNA molekule, u ovom slučaju ITS2 odsječka. Za ovaj korak korištene su odgovarajuće početnice (Sigma-Aldrich, Njemačka) koje se temelje na poznatom slijedu nukleotida iz gena za podjedinice ribosoma 5.8S (Forward), odnosno 28S (Reverse) u rDNA kukaca. Slijed nukleotida u početnicama je:



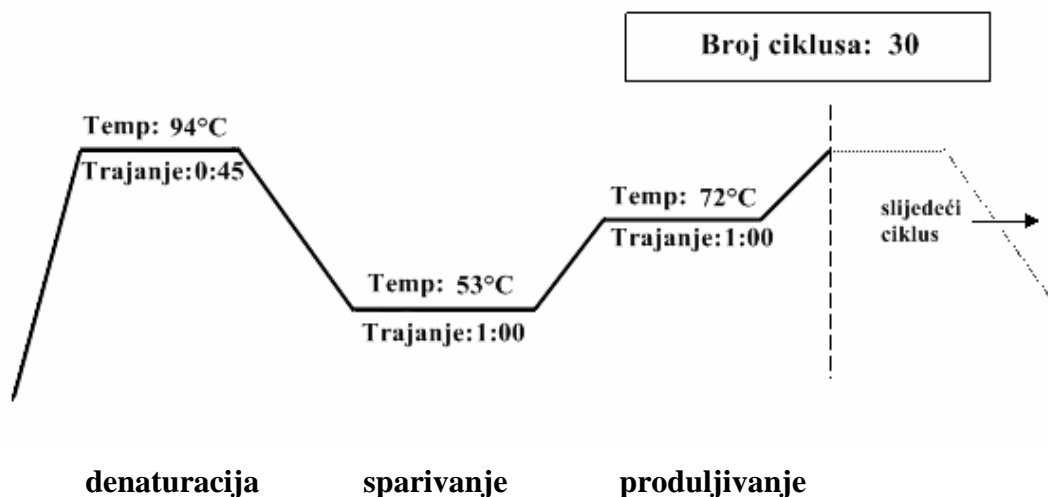
Prvenstveno, bilo je neophodno optimizirati PCR reakciju kako bi se dobio željeni produkt što uključuje usklađivanje koncentracija reaktanata i određivanja idealne temperature i vremena trajanja određenih ciklusa u samoj lančanoj reakciji polimerazom.

Sve reakcije izvedene su u 0,2 mL PCR tubicama u uređaju GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems). U prvom dijelu pokusa reakcije su rađene u ukupnom volumenu od 50 μL i u tom dijelu su korišteni GoTaq DNA polimeraza (Promega, SAD) i smjesa deoksiribonukleozid-trifosfata (dNTP) (Sigma-Aldrich, Njemačka), dok je u drugom taj volumen smanjen na 25 μL zbog uštede reagensa.

Ukupna mješavina otopina za PCR (50 μL) je sadržavala: 5 μL 1xPCR reakcijskog pufera, 4 μL 2mM MgCl_2 , 0,5 μL 0,1mM mješavine dNTP-a, 1 μL 10mM otopine svake početnice, 2 jedinice *Taq* DNA polimeraze, 5 μL uzorka i 32,7 μL mqH_2O .

U drugom dijelu pokusa je, radi pojednostavljivanja postupka, korišten EmeraldAmp® MAX PCR Master Mix (Takara Biotechnology, Japan) – mješavina reagensa za PCR koja u sebi sadrži sve neophodne reagense te joj potrebno dodati samo početnice i uzorak. U tom slučaju reakcijska smjesa (50 μL) je sadržavala 25 μL mješavine EmeraldAmp, 1 μL 10mM otopine svake početnice i 23 μL uzorka. U uzorcima gdje je koncentracija DNA bila veća od potrebne dodana je odgovarajuća količina uzorka, a ostatak se nadomjestio steriliziranom vodom. Za negativnu kontrolu je umjesto uzorka DNA korištena sterilizirana voda.

Reakcijski ciklusi su uključivali početnu denaturaciju na 94°C u trajanju od 5 minuta nakon čega je slijedilo 30 ciklusa umnažanja na 94°C - 45 sekundi (denaturacija), 53°C – 1 minuta (sparivanje početnica i kalupa), 72°C – 1 minuta (produljivanje lanca) (Slika 15.), te na kraju 7 minuta završnog produljivanja lanca na 72°C.



Slika 15. Shematski prikaz temperaturnog profila jednog ciklusa unutar primjenjene lančane reakcije polimerazom

3.6.1. Horizontalna elektroforeza u agaroznom gelu

Produkti lančane reakcije polimerazom su bili detektirani horizontalnom elektroforezom na 1 - 1,5% agaroznom gelu obojanog sa SYBR® Safe bojom za gelove (LifeTechnologies, Termo Fisher Scientific, SAD). Agarozni gel je pripremljen otapanjem agaroze u $0,5 \times$ TBE puferu (45 mM Tris-borat, 1mM EDTA, pH 8,3). U jažice gela je nanošeno 5 μ L PCR produkta, po potrebi pomiješanih s obojnim puferom za nanošenje. Kao standard za određivanje duljine odsječaka DNA korišten je GenRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas, Termo Fisher Scientific, SAD). Elektroforeza gela se odvijala u kadici u puferu $0,5 \times$ TBE i to 10-15 minuta pri naponu 30V, te 30 - 45 minuta pri konstantnom naponu 100V. Vizualizacija PCR produkata se obavljala uslijed eksitacije SYBR® Safe boje pod ultraljubičastim svjetlom.

3.7. Sekvenciranje ITS2 odsječka

Uzorci zadovoljavajuće koncentracije su potom pripremljeni za sekvenciranje (5 µL uzorka je pomiješano s 5 µL 10mM otopine početnice) te poslani u Macrogen Inc. (Amsterdam, Nizozemska) na pročišćavanje i direktno sekvenciranje. Sekvenciranje je bilo dvosmjerno, odnosno svaki je uzorak poslan i s 5.8S (Forward) i s 28S (Reverse) početnicom zbog veće pouzdanosti dobivene sekvence. Sekvenciranje je obavljeno na ABI 3730 XL Automatiziranim Sekvencerima (Applied Biosystems).

Dobivene sekvence se obrađene i sravnjene pomoću računalnih programa DNADynamo (BlueTractorSoftware Ltd.) i BioEdit 7.2.5 (Hall 1999), prilikom čega se iz dvije dobivene sekvence konzensusom kreira jedna nova sekvence koja predstavlja konačni nukleotidni slijed uzorka.

3.8. Analiza sekvenci i filogenetska analiza

Dobivene sekvence uspoređene su sa sekvencama pohranjenim u banci gena (GenBank, NCBI) primjenom algoritma BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Svaka je sekvenca podvrgnuta detaljnoj usporedbi sa sekvencama iz banke gena radi što točnijeg određivanja pripadnosti sekvence određenoj vrsti. Za višestruko sravnjivanje nukleotidnih sekvenci korišten je program CLASTALW2 uključen u program MEGA6 (Tamura i sur. 2013) uz standardne postavke programa CLASTALW2 (gap opening penalty: 15,00; gap extension penalty: 6,66). Postotak identičnosti sekvenci uzimajući u obzir i postojanje delecija i insercija, izračunavan je unutar programa BLASTN 2.2.30+ (Morgulis et al., 2008; Zhang et al., 2000). Za određivanje udjela GC baznih parova korišten je program BioEdit 7.2.5.

Za filogenetsku analizu udaljenosti parova (Pairwise distance) i primjenu metoda najveće štedljivosti (Maximum Parsimony) i najveće vjerojatnosti (Maximum likelihood) korišten je program MEGA6 (Tamura i sur. 2013). Pri rekonstrukciji filogenetskog stabla primjenom metode najveće štedljivosti korišten je TBR algoritam (Tree-Bisection-Reconnection), a analiza je obuhvatila parcijalne delecije i insercije, te kombinacije istih (opcija: partial deletion). Za statističku analizu vjerodostojnosti grupiranja korištena je metoda

samoučitavanja (Bootstrap) i to za metodu najveće štedljivosti u 1000 ponavljanja, a za metodu najveće vjerovatnosti u 100 ponavljanja. Na opisani način filogenetska stabla konstruirana su na temelju ITS2 sekvence. Osim sekvenci dobivenih u ovom istraživanju u filogenetsku analizu uključene su i ITS2 sekvence iz banke gena (GenBank, NCBI) koje su prikazane u Tablici 2.

Tablica 2. Nukleotide sekvence ITS2 odsječka rDNA komaraca iz kompleksa *An. maculipennis* preuzete iz banke gena (GenBank, NCBI)

Pristupni broj	vrsta	zemlja
AM409787.1	<i>An. messeae</i>	Rusija
AF504235.1	<i>An. messeae</i>	Engleska
AF504199.1	<i>An. messeae</i>	Engleska
EF090197.1	<i>An. messeae</i>	Engleska
AY050639.1	<i>An. messeae</i>	Rumunjska
AY648983.1	<i>An. messeae</i>	Iran
DQ243830.1	<i>An. maculipennis</i>	Iran
KM052750.1	<i>An. maculipennis</i>	Iran
AF436065.1	<i>An. maculipennis</i>	Iran
AF536332.1	<i>An. maculipennis</i>	Iran
EF612526.1	<i>An. maculipennis</i>	Iran
AF342715.1	<i>An. maculipennis</i>	Grčka
AM269738.1	<i>An. maculipennis</i>	Gruzija
AF533582.1	<i>An. maculipennis</i>	Grčka
AF455887.1	<i>An. maculipennis</i>	Grčka
AY634484.1	<i>An. daciae</i>	Rumunjska
AY634444.1	<i>An. daciae</i>	Rumunjska
JX444557.1	<i>An. daciae</i>	Njemačka
EF090201.1	<i>An. daciae</i>	Engleska
AY634406.1	<i>An. daciae</i>	Rumunjska
AY365009.1	<i>An. melanoon</i>	Njemačka
AY634504.1	<i>An. melanoon</i>	Rumunjska
AJ224330.2	<i>An. melanoon</i>	Italija
AY238411.1	<i>An. melanoon</i>	Crna Gora
AF452410.1	<i>An. melanoon</i>	Grčka

Pristupni broj	vrsta	zemlja
AF466745.1	<i>An. sacharovi</i>	Grčka
AY114211.1	<i>An. sacharovi</i>	Iran
AJ849886.1	<i>An. artemievi</i>	Kirgistan
FN908224.1	<i>An. artemievi</i>	Uzbekistan
AY634534.1	<i>An. atroparvus</i>	Rumunjska
AY634517.1	<i>An. atroparvus</i>	Rumunjska
AF436064.1	<i>An. atroparvus</i>	Iran
Z50103.2	<i>An. atroparvus</i>	Italija
AM409761.1	<i>An. atroparvus</i>	Rusija
AY050640.1	<i>An. atroparvus</i>	Iran
AF504237.1	<i>An. atroparvus</i>	Engleska
AY253849.1	<i>An. labranchiae</i>	Maroko
AY232827.1	<i>An. labranchiae</i>	Italija
Z50102.2	<i>An. labranchiae</i>	Italija
AJ224329.2	<i>An. martinius</i>	Italija
AY238406.1	<i>An. martinius</i>	Uzbekistan
AY137847.1	<i>An. persiensis</i>	Iran
AM409777.1	<i>An. persiensis</i>	Azerbajdžan
DQ243834.1	<i>An. persiensis</i>	Iran
JX889631.1	<i>An. persiensis</i>	Iran

4. REZULTATI

Tijekom razdoblja sakupljanja komaraca iz kompleksa *An. maculipennis* potrebnih za ovo istraživanje izmjenjivale su se sušne i vlažne sezone što je imalo direktnog utjecaja na broj uzorkovanih jedinki komaraca. S obzirom da se radi o vrstama koje preferiraju prirodna staništa sušne sezone su uvelike otežavale njihovo pronalaženje (Slika 16. i 17.).



Slika 16. Suho korito rijeke Boljunčice u središnjoj Istri



Slika 17. Ostatci gotovo presušene lokve, Istra

U pripremi izaslaka na teren su pomoću satelitskih snimaka unaprijed birani lokaliteti koji su upotpunjavani neposredim uvidom na terenu. Uspješnost pronalaženja ličinki na staništima koje po opisu odgovaraju vrstama bila je polovična. Na lokalitetima gdje je utvrđeno prisustvo ličinki njihova brojnost je najčešće bila mala i gustoća nije prelazila 10 ličinki po m².

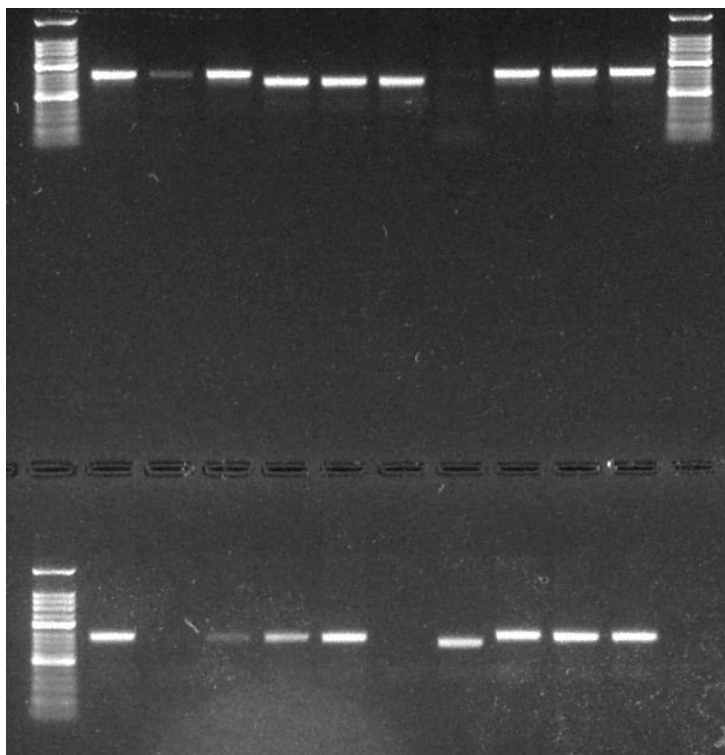
Terenskim pretraživanjem pogodnih staništa u potrazi za ličinkama te aktivnim uzorkovanjem pomoću aspiratora i CDC-klopke ukupno je na svim lokalitetima uzorkano preko tisuću jedinki komaraca. Metodom slučajnog odabira izabrano je dvije stotine jedinki iz kojih je proveden postupak izolacije DNA.

Sam postupak izolacije je davao zadovoljavajuće rezultate iako je prema uputama proizvođa kompleta za izolaciju DNA bilo potrebno 25 do 30 mg životinjskog tkiva, a komarci su težili znatno manje. Raspon težine komaraca korištenih u ovom istraživanju bio je između 1 i 6 mg - koliko su težile najveće ličinke četvrtog ličinačkog stadija, dok je masa odraslih komaraca najčešće bila između 2 i 3 mg.

Koncentracija ukupne DNA u izolatima je također znatno varirala: od 4 ng/μL do 128 ng/μL, dok je čistoća, odnosno omjer apsorbancije pri 260 i 280 nm bio u rasponu od 1,5 do 2,3. Potrebno je naglasiti kako, obrnuto očekivanjima, masa komaraca nije direktno utjecala na količinu DNA u izolatu.

U fazi umnažanja željenog odsječka DNA bilo je najviše poteškoća oko određivanja optimalnih količina reagensa potrebnih za uspješno odvijanje reakcije. Čak i kad su pronađene koncentracije i količine kemikalija u reakcijskoj smjesi ponekad bi izostao produkt reakcije što je vjerovatno bio utjecaj degradacije i lomljenja molekule DNA u uzorku (Slika 18.)

Nakon elektroforeze na agaraznom gelu rađena je detekcija produkata lančane reakcije polimerazom pomoću UV-svjetla. Prema jačini obojenja određivana je približna koncentracija produkta, te je napravljena selekcija produkata poslanih na sekvenciranje.



Slika 18. Agarozni gel s produktima lančane reakcije polimerazom i standardom

Ukupno je na postupak sekvenciranja poslan uzorak DNA iz 125 komarca što je ukupno rezultiralo s 250 sekvenci. Pregledom kromatograma, obrađivanjem i sravnjivanjem sekvenci dobiveno je 125 tzv. koncenzus sekvenci iz kojih je molekularnom identifikacijom uspješno determinirano 4 vrste komaraca iz kompleksa *An. maculipennis*.

4.1. Vrsta *Anopheles messeae* Falleroni, 1926

Najveći broj analiziranih sekvenci u ovom istraživanju pripalo je vrsti *An. messeae*. Molekularna identifikacija vrste je napravljena usporedbom dobivenih sekvenci ITS2 odsječka rDNA s istovrsnim sekvencama iz banke gena. Zbog pouzdanosti, kao referente sekvence odabrane su sekvence koje je objavio Prirodoslovni muzej iz Londona (Natural History Museum, London) gdje se i čuvaju ogledni primjerci sekvenciranih vrsta komaraca. Upravo s takvom sekvencom - AF504235.1 iz Velike Britanije je dobivena 100%-tna identičnost (Slika 19.). Osim ove, dobivena sekvenca je pokazala 100%-tnu identičnost i sa sekvencama: AF342711.1 iz Grčke, AY238413.1 iz Nizozemske, HE659702.1 iz Rusije (uz napomenu da je ova sekvenca kraća za 60 nukleotida) te 99%-tnu identičnost sa sekvencama: AY050639.1 iz Irana, FN646217.1 iz Rusije, AY238420.1 iz Crne Gore, AY365011.1 iz Njemačke, AY238412.1 iz Engleske i AF305556.1 iz Kine. Na osnovi ovih usporedbi dobivenih sekvenci, pripadajući komarci su identificirani kao vrsta *An. messeae*.

U slučaju 99%-tne identičnosti najčešće se radi o razlici u samo jednom nukleotidu što je moguće posljedica određene mutacije, no isto tako i pogreške prilikom sekvenciranja.

	10	20	30	40	50	
Lonjsko polje	
AF504235.1	ATCACTCGGC	TCGTGGATCG	ATGAAGACCG	CAGCTAAATG	CGCGTCACAA	50
	ATCACTCGGC	TCGTGGATCG	ATGAAGACCG	CAGCTAAATG	CGCGTCACAA	50
	60	70	80	90	100	
Lonjsko polje	
AF504235.1	TGTGAAC TGC	AGGACACATG	AACACCGATA	AGTTGAACGC	ATATTGCGCA	100
	TGTGAAC TGC	AGGACACATG	AACACCGATA	AGTTGAACGC	ATATTGCGCA	100
	110	120	130	140	150	
Lonjsko polje	
AF504235.1	TCGTGCGACA	CAGCTCGATG	TACACATTTT	TGAGTGCCCA	TATTTGACCC	150
	TCGTGCGACA	CAGCTCGATG	TACACATTTT	TGAGTGCCCA	TATTTGACCC	150
	160	170	180	190	200	
Lonjsko polje	
AF504235.1	ATTC AAGTCA	AACTACGTAC	CTCCGTGTAC	GTGCATGATG	ATGAAAGAGT	200
	ATTC AAGTCA	AACTACGTAC	CTCCGTGTAC	GTGCATGATG	ATGAAAGAGT	200
	210	220	230	240	250	
Lonjsko polje	
AF504235.1	TTGGAACACC	TTCCTTCTCT	TGCATTGAAA	GCGCAGCGTG	TAGCAACCCC	250
	TTGGAACACC	TTCCTTCTCT	TGCATTGAAA	GCGCAGCGTG	TAGCAACCCC	250
	260	270	280	290	300	
Lonjsko polje	
AF504235.1	AGGTTTCAAC	TTGCAAAGTG	GCCATGGGGC	TGACACCTCA	CCACCATCAG	300
	AGGTTTCAAC	TTGCAAAGTG	GCCATGGGGC	TGACACCTCA	CCACCATCAG	300
	310	320	330	340	350	
Lonjsko polje	
AF504235.1	CGTGCTGTGT	AGCGTGTTCT	GCCCAGTAAG	GTCATCGTGA	GGCGTCACCT	350
	CGTGCTGTGT	AGCGTGTTCT	GCCCAGTAAG	GTCATCGTGA	GGCGTCACCT	350
	360	370	380	390	400	
Lonjsko polje	
AF504235.1	AACGGGGAAG	CACACACTGT	TGCGCGTATC	TCGTGGTTCT	AACCCAACCA	400
	AACGGGGAAG	CACACACTGT	TGCGCGTATC	TCGTGGTTCT	AACCCAACCA	400
	410	420	430	440	450	
Lonjsko polje	
AF504235.1	TAGCAGCAGA	GGTACAAGAC	CAGCTCCTAG	CGGCGGGAGC	TCATGGGCTT	450
	TAGCAGCAGA	GGTACAAGAC	CAGCTCCTAG	CGGCGGGAGC	TCATGGGCTT	450
	460	470	480			
Lonjsko polje		
AF504235.1	CAAATAATGT	GTGACTACCC	CCTAAATTTA	AGCAT	485	
	CAAATAATGT	GTGACTACCC	CCTAAATTTA	AGCAT	485	

Slika 19. Srvnjene sekvence *An. messeae* iz Lonjskog polja i iz Prirodoslovnog muzeja u Londonu potvrđuju 100%-tnu identičnost (sekvenca AF504235.1 u banci gena ima status oglednog primjerka (engl. voucher specimen))

Ova vrsta se pokazala kao najčešće uzorkovani komarac iz kompleksa *An. maculipennis* tijekom ovog istraživanja. Rasprostranjenost ove vrste u Hrvatskoj je pretežito u kopnenom dijelu i to od granice sa Srbijom na istoku do granice sa Slovenijom na zapadu te do granice s Mađarskom na sjeveru. U mediteranskoj dijelu Hrvatske ova vrsta je pronađena samo na području delte rijeke Neretve što je ujedno i njena južna granica rasprostranjenja u Hrvatskoj (Slika 20.)



Slika 20. Zabilježena rasprostranjenost vrste *An. messeae* u Hrvatskoj. Zelenim kružnicama označena su područja gdje su zabilježene jedinke ove vrste

Staništa na kojima je vrsta uzorkovana tijekom ovog istraživanja su najčešće bila veće vodene površine prirodnog podrijetla, ponekad s izraženim poplavnim karakterom. Pronađena je na poplavnim područjima duž cijelog toka rijeka Kupe, Save, Drave i Dunava te delti Neretve (Slika 21.). Na ovim staništima pronađena je i u ličinačkom i u odraslom stadiju.



Slika 21. Jezero Kutina na području delte Neretve, tipično stanište gdje se može pronaći vrsta *Anopheles messeae*

Uz ovu vrstu se na kontinentalnom području još nalaze vrste *An. daciae* i *An. maculipennis*, dok je na delti Neretve *An. messeae* zabolježena i vrsta *An. melanoon*. Prema ovom bi se moglo zaključiti da je ova vrsta simpatrična sa svim ostalim vrstama identificiranim ovim istraživanjem, no to je zapravo slučaj samo s vrstom *An. daciae*, s kojom je vrlo slična, dok vrste *An. melanoon* i *An. maculipennis* ipak nastanjuju drugačija staništa unutar određenog većeg područja.

S vrstom *An. daciae* je potvrđena i najveća genetička sličnost. Kod obje vrste dužina sekvence ITS2 odsječka je 442 parova baza, a između sekvenci postoji 99%tna sličnost. Nešto veće razlike su prema vrstama *An. melanoon* i *An. maculipennis*.

4.2. Vrsta *Anopheles daciae* Linton, Nicolescu & Harbach, 2004

Pronalazak ove vrste predstavlja ujedno i prvi nalaz, te novu vrstu za faunu Hrvatske. Kao što je već spomenuto, vrsta *An. daciae* je vrlo slična vrsti *Ae. messeae* što se može potvrditi i malim razlikama unutar same sekvence ITS2 odsječka. Vrsta je prvi put opisana 2004. godine upravo uz pomoć molekularnih metoda te je tada u banku gena (GenBank, NCBI) spremljena njena nukleotidna sekvenca ITS2 odsječka rDNA. Sekvence dobivene u ovom istraživanju pokazale su 100%-tnu identičnost sa sekvencama (AY634406.1, AY634503.1) koje su objavljene u znanstvenom članku u kojem se opisuje *An. daciae* kao nova vrsta (Nicolescu et al., 2004) (Slika 22.). Na osnovi podudaranja sekvenci identificirana je vrsta *An. daciae* kao novi član Hrvatske faune komaraca. Stopostotna identičnost sekvence iz Hrvatske postoji još i sa sekvencama iz Engleske (AY822589.1) (Danabalan et al., 2014) i Njemačke (JX173885.1) (Kronefeld et al., 2012)

		10	20	30	40	50	
AY634503.1	
Babina Greda	CGTGGATCGA	TGAAGACCGC	AGCTAAATGC	GCGTCACAAAT	GTGAAC TGCA		50
	CGTGGATCGA	TGAAGACCGC	AGCTAAATGC	GCGTCACAAAT	GTGAAC TGCA		50
		60	70	80	90	100	
AY634503.1	
Babina Greda	GGACACATGA	ACACCGATAA	GTTGAACGCA	TATTGCGCAT	CGTGCGACAC		100
	GGACACATGA	ACACCGATAA	GTTGAACGCA	TATTGCGCAT	CGTGCGACAC		100
		110	120	130	140	150	
AY634503.1	
Babina Greda	AGCTCGATGT	ACACATTTTT	GAGTGCCCAT	ATTTGACCCA	TTCAAGTCAA		150
	AGCTCGATGT	ACACATTTTT	GAGTGCCCAT	ATTTGACCCA	TTCAAGTCAA		150
		160	170	180	190	200	
AY634503.1	
Babina Greda	ACTACGTACC	TCCGTGTACG	TGCATGATGA	TGAAAGAGTT	TGGAACACCA		200
	ACTACGTACC	TCCGTGTACG	TGCATGATGA	TGAAAGAGTT	TGGAACACCA		200
		210	220	230	240	250	
AY634503.1	
Babina Greda	TCCATTTCTT	GCATTGAAAG	CGCAGCGTGT	AGCAACCCCA	GGTTTCAACT		250
	TCCATTTCTT	GCATTGAAAG	CGCAGCGTGT	AGCAACCCCA	GGTTTCAACT		250
		260	270	280	290	300	
AY634503.1	
Babina Greda	TGCAAAGTGG	CCATGGGGCT	GACACCTCAC	CACCATCAGC	GTGCTGTGTA		300
	TGCAAAGTGG	CCATGGGGCT	GACACCTCAC	CACCATCAGC	GTGCTGTGTA		300
		310	320	330	340	350	
AY634503.1	
Babina Greda	GCGTGTTCGG	CCCAGTAAGG	TCATCGTGAG	GCGTCACCTA	ACGGGGAAGC		350
	GCGTGTTCGG	CCCAGTAAGG	TCATCGTGAG	GCGTCACCTA	ACGGGGAAGC		350
		360	370	380	390	400	
AY634503.1	
Babina Greda	ACACACTGTT	GCGCGTATCT	CGTGGTTCTA	ACCCAACCAT	AGCAGCAGAG		400
	ACACACTGTT	GCGCGTATCT	CGTGGTTCTA	ACCCAACCAT	AGCAGCAGAG		400
		410	420	430	440	450	
AY634503.1	
Babina Greda	ATACAAGACC	AGCTCCTAGC	CGCGGGAGCT	CATGGGCCTC	AAATAATGTG		450
	ATACAAGACC	AGCTCCTAGC	CGCGGGAGCT	CATGGGCCTC	AAATAATGTG		450
		460					
AY634503.1					
Babina Greda	TGACTACCCC	CTAA	464				
	TGACTACCCC	CTAA	464				

Slika 22. Srađnjene sekvence *An. daciae* iz Babine Grede i iz Prirodoslovnog muzeja u Londonu potvrđuju 100%-tnu identičnost (sekvenca AY634503.1 je publicirana u znanstvenom članku u kojem je prvi put opisana ova vrsta (Nicolescu et al., 2004))

Distribucija ove vrste je većinom na samom istoku Hrvatske, na području Slavonije i Baranje. Primjerci ove vrste pronađeni su na lokalitetima Babina Greda, Vinkovci i Park prirode Kopački rit. No, osim na ovom području vrsta je potvrđena i na lokalitetu Ričice u Lici što predstavlja najjužniji nalaz ove vrste kako za Hrvatsku tako i za ostatak Europe (Slika 23.).



Slika 23. Zabilježena rasprostranjenost vrste *An. daciae* u Hrvatskoj. Plavim kružnicama označena su područja gdje su zabilježene jedinke ove vrste

Staništa kojim su sklone jedinke ove vrste, prema rezultatima ovog istraživanja, podudaraju se s onima kod vrste *An. messeae*. U Parku prirode Kopački rit jedinke su uz uzorkovane na postaji Čarna – veći kanal sa sporo tekućom, gotovo stajaćom vodom. Kanal je zasjenjen samo s jedne strane, doke se u vodi nalazi dosta submerzivne vegetacije. U Vinkovcima je vrsta pronađena uz rijeku Bosut dok se postaja Babina Greda nalazila nedaleko od poplavnog područja rijeke Save. Lokalitet Ričice nalazi se uz jezero Ričice u Lici, u blizini Gračaca (slika 24.). Nadmorska visina lokaliteta je oko 560 metara. Jezero je veliko, otvorenog tipa, uz rubove bogato submerzivnom vegetacijom i tršćacima. Jedinke su na postajama Babina Greda, Vinkovci i Kopački rit uzorkovane pomoću CDC-klopki sa suhim ledom kao atraktantom, dok je na lokalitetu Ričice uzorkovanje obavljeno pomoću aspiratora u štali s domaćim životinjama. Zbog velike međusobne sličnosti vrste *An. daciae* i *An. messeae* su

simpatrične, no treba napomenuti kako je na lokalitetu Ričice *An. daciae* pronađena uz vrstu *An. maculipennis*.



Slika 24. Rubni dio jezera Ričice kod Gračaca, stanište gdje je uzorkovana vrsta *Anopheles daciae*

Genetska je sličnost, kako je već spomenuto, najveća s vrstom *An. messeae*, odnosno manja s vrstama *An. melanoon* i *An. maculipennis*

4.3. Vrsta *Anopheles maculipennis* s.s. Meigen, 1818

Vrstu *An. maculipennis* je bilo najjednostavnije molekularno identificirati budući banka gena (GenBank) obiluje nukleotidnim sekvencama ITS2 odsječka za ovu vrstu. Sekvence ove vrste s područja Hrvatske pokazale su 100%-tnu identičnost sa preko stotinu drugih sekvenci iste vrste. No, 100%-tnu identičnost i 100%-tno slaganje cijelom dužinom sekvence (uključujući početnice) bilo je sa sekvencama AF342713.1 i AF533582.1 iz Grčke (Slika 25.), te AY730267.1 iz Irana.

		10	20	30	40	50	
AF533582.1	
Zagreb	ATCACTCGGC	TCGTGGATCG	ATGAAGACCG	CAGCTAAATG	CGCGTCACAA		50
	ATCACTCGGC	TCGTGGATCG	ATGAAGACCG	CAGCTAAATG	CGCGTCACAA		50
		60	70	80	90	100	
AF533582.1	
Zagreb	TGTGAACTGC	AGGACACATG	AACACCGATA	AGTTGAACGC	ATATTGCGCA		100
	TGTGAACTGC	AGGACACATG	AACACCGATA	AGTTGAACGC	ATATTGCGCA		100
		110	120	130	140	150	
AF533582.1	
Zagreb	TCGTGCGACA	CAGCTCGATG	TACACATTTT	TGAGTGCCTA	TATTTGACCC		150
	TCGTGCGACA	CAGCTCGATG	TACACATTTT	TGAGTGCCTA	TATTTGACCC		150
		160	170	180	190	200	
AF533582.1	
Zagreb	AGGTCAAAC	ACGTACCTCC	GGGTACGTGC	ATGATGATGA	AAGAGTTTGG		200
	AGGTCAAAC	ACGTACCTCC	GGGTACGTGC	ATGATGATGA	AAGAGTTTGG		200
		210	220	230	240	250	
AF533582.1	
Zagreb	AACACCATCC	TTCTCTTGCA	TTGAAAACGC	AGCGTGTAGC	AACCCCAGGT		250
	AACACCATCC	TTCTCTTGCA	TTGAAAACGC	AGCGTGTAGC	AACCCCAGGT		250
		260	270	280	290	300	
AF533582.1	
Zagreb	TTCAACTTGC	AAAGTGGCCA	TGGGGCTGAC	ACCTCACCAC	CATCAGCGTG		300
	TTCAACTTGC	AAAGTGGCCA	TGGGGCTGAC	ACCTCACCAC	CATCAGCGTG		300
		310	320	330	340	350	
AF533582.1	
Zagreb	CTGTGTAGCG	TGTTCCGGCC	AGTTCGGTCA	TCGTGAGGCG	TTACCTAACG		350
	CTGTGTAGCG	TGTTCCGGCC	AGTTCGGTCA	TCGTGAGGCG	TTACCTAACG		350
		360	370	380	390	400	
AF533582.1	
Zagreb	GGGAGGCACA	CACTGTTGCG	CGTATCTCAT	GGTTACCCAA	CCATAGCAGC		400
	GGGAGGCACA	CACTGTTGCG	CGTATCTCAT	GGTTACCCAA	CCATAGCAGC		400
		410	420	430	440	450	
AF533582.1	
Zagreb	AGAGATACAA	CACCGGCTCC	TAGTAGCCCA	TGGGCCTCAA	ATAATGTGTG		450
	AGAGATACAA	CACCGGCTCC	TAGTAGCCCA	TGGGCCTCAA	ATAATGTGTG		450
		460	470				
AF533582.1	
Zagreb	ACTACCCCT	AAATTTAAGC	AT				472
	ACTACCCCT	AAATTTAAGC	AT				472

Slika 25. Sravnjene sekvence *An. maculipennis* iz Zagreba i iz Prirodoslovnog muzeja u Londonu potvrđuju 100%-tnu identičnost (sekvenca AF533582.1 u banci gena ima status ogleđnog primjerka (engl. voucher specimen))

Područje rasprostranjenja ove vrste u Hrvatskoj je zapravo najveće među identificiranim vrstama iz istraživanog kompleksa. Pronađena je u svim regijama, od granice sa Srbijom do granica sa Slovenijom i Mađarskom. U Istri je vrlo česta, a nastanjuje i Liku, Dalmatinsku zagoru te Dalmaciju i deltu Neretve. Pronađena je i na jedinom otoku obuhvaćenim ovim istraživanjem – Brijunima (Slika 26.). Ipak, nalazi ove vrste nisu bili tako učestali kao kod vrste *An. messeae*.



Slika 26. Zabilježena rasprostranjenost vrste *An. maculipennis s.s.* u Hrvatskoj. Žutim kružnicama označena su područja gdje su zabilježene jedinke ove vrste

Staništa na kojima su se pronalazile ličinke ove vrste spadaju u manje vodene površine: bare, lokve, kanali, no može se naći i uz rijeke, na poplavnim područjima. Staništa ličinki su najčešće bila izložena suncu, bez veće sjene (Slika 27.). Prema različitosti staništa, ali i po velikom području rasprostranjenja može se zaključiti da je ova vrsta vrlo prilagodljiva. To se može potkrijepiti i činjenicom da je ovo jedina vrsta iz kompleksa koja je unutar ovog istraživanja pronađena na određenom području sa svim ostalim identificiranim vrstama.

Genetski, ova vrsta se najviše razlikuje od ostalih identificiranih vrsta iz kompleksa. Ima najkraću nukleotidnu sekvencu ITS2 odsječka – 429 parova baza i najviše delecija. Sličnija je vrsti *An. melanoon* nego *An. daciae* i *An. messeae*.



Slika 27. Bara u podnožju planine Dinare koja obližnjim selima služi kao pojilo je pogodno stanište za ličinke vrste *Anopheles maculipennis s.s.* U gornjem dijelu slike strelica pokazuje smještaj bare u okolišu

4.4. Vrsta *Anopheles melanoon* Hackett, 1934

Kao i vrsta *An. daciae* i ova vrsta na određeni način predstavlja prvi nalaz za Hrvatsku. Stari popis vrsta iz kompleksa *An. maculipennis* u Hrvatskoj sadržavao je vrstu *Anopheles subalpinus*, no ne i vrstu *An. melanoon*. Recentnim molekularnim istraživanjima potvrđeno da su ove dvije vrste identične te je *An. subalpinus* formalno postao sinonim vrsti *An. melanoon*. Ovo je prvi potvrđeni nalaz nakon revidiranja taksnomonije vrste.

Sekvence koje su dobivene iz ovih komaraca pokazale su 100%-tnu identičnost sa sekvencama AY238410.1 iz Crne Gore, AF466729.1 iz Grčke (Slika 29.) i JN112971.1 iz Turske te 99%-tnu identičnost sa sekvencama AJ224330.2 iz Italije i AY365009.1 iz Njemačke. Na osnovi sekvence određenoj u Prirodoslovnom muzeju u Londonu, te visokom postotku identičnosti s ostalim sekvencama te vrste molekularno je identificirana vrsta *An. melanoon* u Hrvatskoj.



Slika 28. Dolina rijeke Neretve - stanište
vrste *Anopheles melanoon*

		10	20	30	40	50	
AF466729.1	
Neretva	ATCACTCGGC	TCGTGGATCG	ATGAAGACCG	CAGCTAAATG	CGCGTCACAA		50
		60	70	80	90	100	
AF466729.1	
Neretva	TGTGAACTGC	AGGACACATG	AACACCGATA	AGTTGAACGC	ATATTGCGCA		100
		110	120	130	140	150	
AF466729.1	
Neretva	TCGTGCGACA	CAGCTCGATG	TACACATTTT	TGAGTGCCTA	TATTTGACTA		150
		160	170	180	190	200	
AF466729.1	
Neretva	TCCAAGTCAA	ACTACGTACC	TCCGTGTACG	TGTATGATGA	TGAAAGAGTT		200
		210	220	230	240	250	
AF466729.1	
Neretva	TGGAAACACC	ATCCTTCTCT	TGCATTGAAA	GCGCAGCGTG	TAGCAGCCCC		250
		260	270	280	290	300	
AF466729.1	
Neretva	AGGTTTCAAC	TTGCAAAGTG	GCCATGGGGC	CGACACCTCA	CCACCATCAG		300
		310	320	330	340	350	
AF466729.1	
Neretva	CGTGCTGTGT	AGCGTGTTCG	GCCCAGTTTCG	GTCATCGTGA	GGCGTTACCT		350
		360	370	380	390	400	
AF466729.1	
Neretva	ATCGGGGAAG	CACACCCTGT	TGCGCGTATC	TCATGGTTAC	CTAACCATAG		400
		410	420	430	440	450	
AF466729.1	
Neretva	CAGCAGAGTT	ACAACACCAG	CTTCTAGCAG	CGGGAGCTCA	TGGGCCTCAA		450
		460	470	480			
AF466729.1	
Neretva	ATAATGTGTG	ACTACCCCTT	AAATTTAAGC	AT	482		

Slika 29. Srađnjene sekvence *An. melanoon* iz doline Neretve i iz Prirodoslovnog muzeja u Londonu potvrđuju 100%-tnu identičnost (sekvenca AF466729.1 u banci gena ima status ođlednog primjerka (engl. voucher specimen))

U Hrvatskoj ova vrsta ima najmanje rasprostranjenje u odnosu na ostale identificirane vrste iz kompleksa. Pronađena je na jednom u lokalitetu u Istri – Cerovlje, u štali s domaćim životinjama, te na delti Neretve, također u štali s domaćim životinjama (Slika 30.). Nalaz u Istri predstavlja novo nalazište ove vrste jer je u dosadašnjim istraživanjima ova vrsta u Hrvatskoj potvrđena samo na području delte Neretve i to kao tada odvojena vrsta, danas sinonim - *Anopheles subalpinus* (Slika 28.). Ličinački stadiji ove vrste komaraca u ovom istraživanju nisu pronađeni.



Slika 30. Zabilježena rasprostranjenost vrste *An. melanoon* u Hrvatskoj. Narančastim kružnicama označena su područja gdje su zabilježene jedinke ove vrste

Dužina nukleotidne sekvence ITS2 odsječka kod ove vrste je 439 parova baza, što je malo kraće od sekvenci vrsta *An. messeae* i *An. daciae*. Međutim veću sličnost u rasporedu nukleotida unutar sekvence ima s vrstom *An. maculipennis*.

4.5. Filogenetske analize identificiranih vrsta

Odabir intergenske regije ITS2 za ovo istraživanje kao alata razlučivosti vrsta unutar kompleksa *Anopheles maculipennis* potvrdilo se kao dobar izbor. Na osnovi analize nukleotidne sekvence ITS2 jasno su identificirane i određene četiri vrste iz istraživanog kompleksa. Promatrajući skupno, ITS2 sekvence iz identificiranih vrsta se bitno ne razlikuju, no ipak su dovoljno različite za odvajanje vrsta unutar kompleksa.

Interspecijijske razlike između identificiranih vrsta su relativno male. Dužina sekvence ITS2 odsječka varira od 429 kod vrste *An. maculipennis*, što je ujedno i najkraći odsječak, pa do 442 parova baza koliko su dugački odsječci kod vrsta *An. messeae* i *An. daciae*. Vrsta *An. melanoon* ima odsječak dug 439 nukleotida. Udio baznih parova GC pokazao je male varijacije: od 50,34% kod vrste *An. melanoon* do 51,36% kod vrste *An. messeae* (Tablica 3).

Tablica 3. Osnovne karakteristike nukleotidnih sekvenci ITS2 odsječka rDNA komaraca iz kompleksa *An. maculipennis*

Vrsta	dužina sekvence (parova baza)	udio pojedinih baza (%)				udio baznih parova (%)	
		A	C	G	T	G + C	A + T
<i>An.messeae</i>	442	26,24	26,47	24,89	22,40	51,36	48,64
<i>An. daciae</i>	442	26,70	26,47	24,43	22,40	50,90	49,10
<i>An. melanoon</i>	439	25,97	25,97	24,37	23,69	50,34	49,66
<i>An. maculipennis</i>	429	26,34	26,57	24,48	22,61	51,05	48,95

Nukleotidne sekvence ITS2 kod vrsta *An. messeae* i *An. daciae* pokazuju najveću sličnost među identificiranim vrstama - razlikuju se u svega 5 nukleotida, odnosno 5 pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama na mjestima baznih parova 192, 196, 198, 393 i 413. S druge strane, sekvenca vrste *An. melanoon* je kraća za tri nukleotidna para, no u njoj osim nukleotidnih polimorfizama postoje još i delecije i insercije - mjesto baznog para 130, odnosno 187. Za sekvencu vrste *An. maculipennis* znakovit je smanjen broj nukleotida – 429 što je posljedica triju skupnih delecija na mjestima 130 - 134, 370 – 373 i 416 – 421 (Slika 31.).

	10	20	30	40	50	
<i>An. messeae</i>					
	ATGAAGACCGCAGCTAAATGCGCGTCACAATGTGAACTGCAGGACACATG					50
<i>An. daciae</i>					50
<i>An. melanoon</i>					50
<i>An. maculipennis</i>					50
	60	70	80	90	100	
<i>An. messeae</i>					
	AACACCGATAAGTTGAACGCATATTGCGCATCGTGCAGACAGCTCGATG					100
<i>An. daciae</i>					100
<i>An. melanoon</i>					100
<i>An. maculipennis</i>					100
	110	120	130	140	150	
<i>An. messeae</i>					
	TACACATTTTTGAGTGCCCATATTTGACCCATTCAAGTCAAACCTACGTAC					150
<i>An. daciae</i>					150
<i>An. melanoon</i>					149
<i>An. maculipennis</i>					146
	160	170	180	190	200	
<i>An. messeae</i>					
	CTCCGTGTACGTGCATGATGATGAAAGAGTTTGGAA-CACCTTCCCTTC					199
<i>An. daciae</i>					199
<i>An. melanoon</i>					199
<i>An. maculipennis</i>					195
	210	220	230	240	250	
<i>An. messeae</i>					
	TTGCATTGAAAGCGCAGCGTGTAGCAACCCCAAGTTTCAACTTGCAAAGT					249
<i>An. daciae</i>					249
<i>An. melanoon</i>					249
<i>An. maculipennis</i>					245
	260	270	280	290	300	
<i>An. messeae</i>					
	GGCCATGGGGCTGACACCTCACCACCATCAGCGTGTGTGTAGCGTGTTC					299
<i>An. daciae</i>					299
<i>An. melanoon</i>					299
<i>An. maculipennis</i>					295
	310	320	330	340	350	
<i>An. messeae</i>					
	GGCCAGTAAGGTCATCGTGAGGCGTCACCTAACGGGGAAGCACACACTG					349
<i>An. daciae</i>					349
<i>An. melanoon</i>					349
<i>An. maculipennis</i>					345
	360	370	380	390	400	
<i>An. messeae</i>					
	TTGCGGTATCTCGTGGTTCTAACCCAACCATAGCAGCAGAGGTACAAGA					399
<i>An. daciae</i>					399
<i>An. melanoon</i>					396
<i>An. maculipennis</i>					392

Nastavak na idućoj stranici

Nastavak s prethodne stranice

```

                410      420      430      440
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
An. messeae   CCAGCTCCTAGCGGGCGGGAGCTCATGGGCCTCAAATAATGTGT 442
An. daciae   .....C..... 442
An. melanoon .....T.....A..... 439
An. maculipennis ..G.....TA.....C..... 429
  
```

Slika 31. Višestruko sravnjene sekvence ITS2 odsječka rDNA komaraca iz kompleksa *An. maculipennis* pronađenih u Hrvatskoj. Točkice predstavljaju identične nukleotide, a crtice (-) predstavljaju delecije.

Za detaljnije razlikovanje sekvenci napravljena je analiza nukleotidnih udaljenosti sekvenci (pairwise distance) – neparametarska metoda koja odražava genetičku udaljenost između sekvenci. Ta udaljenost se najčešće definira kao udio nepodudaranja baznih parova unutar sravnjenih sekvenci. I ova analiza je potvrdila najveću sličnost sekvenci vrsta *An. messeae* i *An. daciae* te najmanju sličnost sekvence *An. melanoon* u odnosu na ostale sekvence (Tablica 4.). Zbog velike sličnosti sekvenci ITS2 odječka nije bilo moguće utvrditi eventualne međupopulacijske razlike kod istraživanih vrsta komaraca.

Tablica 4. Prikaz vrijednosti nukleotidne udaljenosti (pairwise distance) između ITS2 sekvenci identificiranih vrsta. Veća vrijednost označava veću različitost sekvenci.

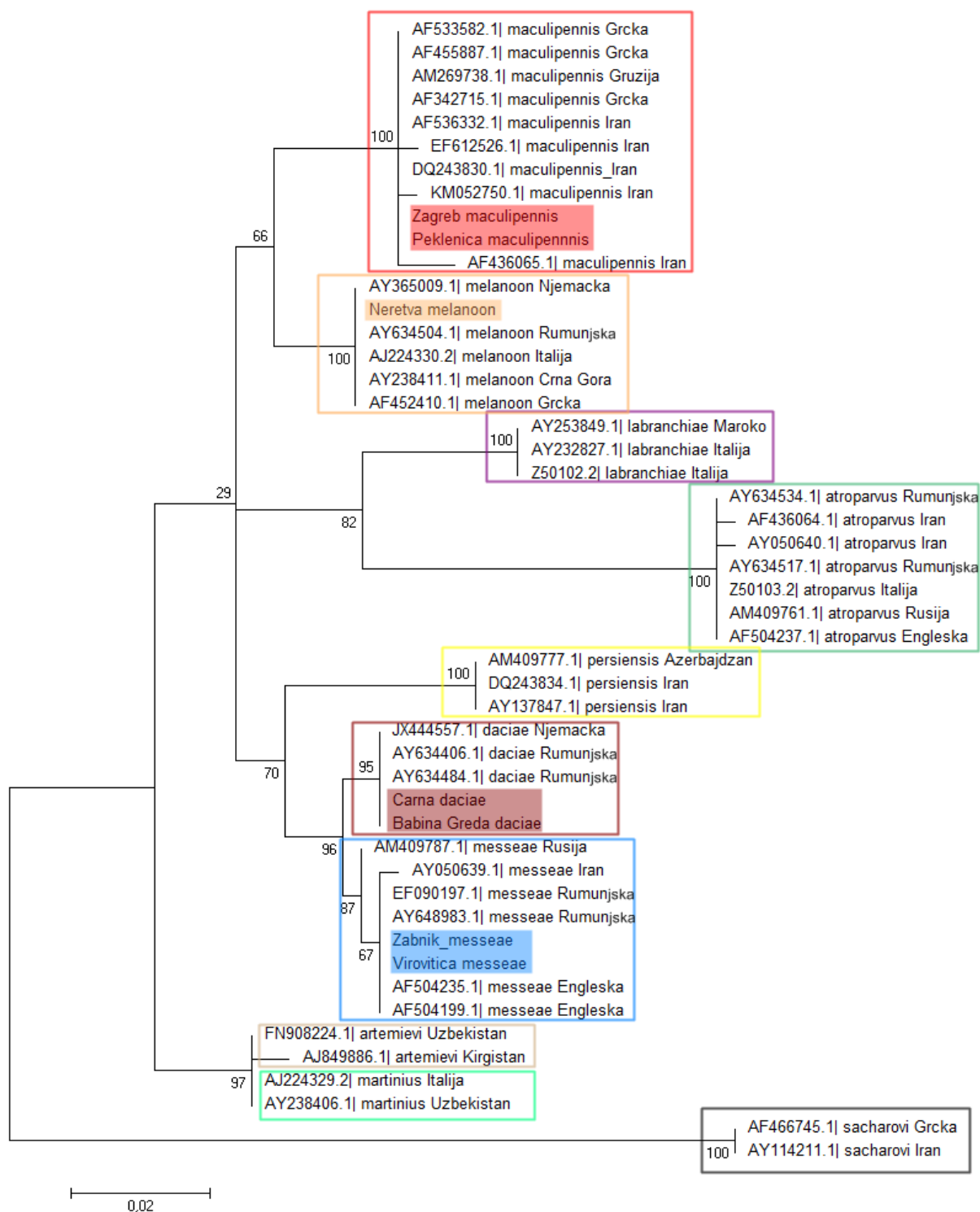
Vrsta	<i>An. messeae</i>	<i>An. daciae</i>	<i>An. maculipennis</i>	<i>An. melanoon</i>
<i>An. messeae</i>	0,0000			
<i>An. daciae</i>	0,0108	0,0000		
<i>An. maculipennis</i>	0,0378	0,0379	0,0000	
<i>An. melanoon</i>	0,0392	0,0325	0,0345	0,0000

Brojke u Tablici 4. ujedno predstavljaju i procjenu evolucijske divergencije među sekvencama (Tamura et al., 2013).

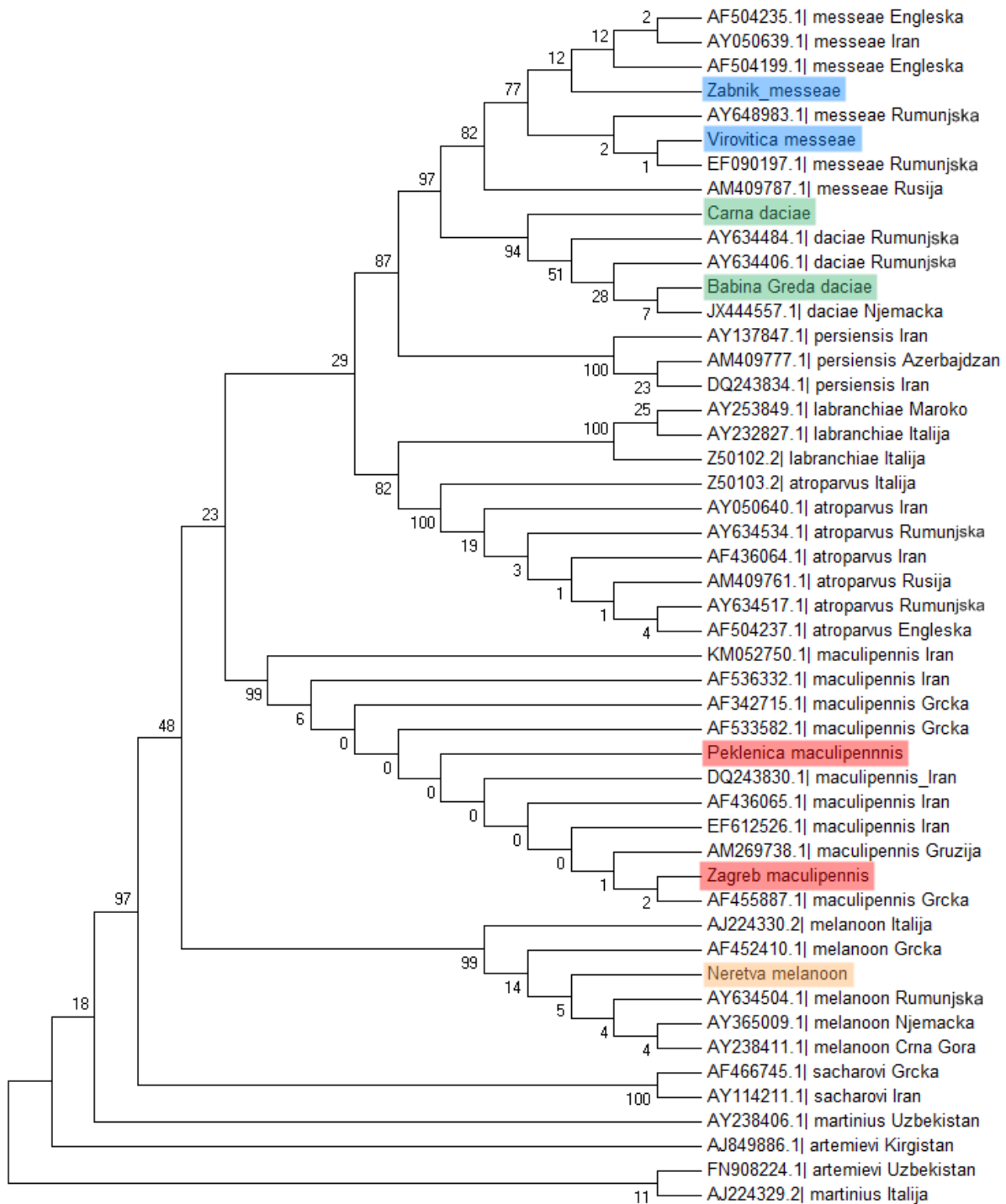
Filogenetska analiza koja se temeljila na nukleotidnoj sekvenci ITS2 odsječka rDNA pokazala je jasno odvajanje i grupiranje vrsta na filogenetskom stablu. Za potrebe analize iz banke gena (Genbank, NCBI) preuzete su sekvence navedene u Tablici 2. Sve vrste identificirane u Hrvatskoj su se odvojile u filogenetske skupine zajedno s ostalim pripadnicima iste vrste čije su sekvence preuzete iz banke gena. Jasno odvajanje vrsta potkrepljuju i visoke vrijednosti dobivene metodom samoučitavanja (bootstrap) koja za filogenetske odvojene skupine vrsta iznosi 95 – 100. Iznimka su samo novoopisane vrste *An. artemievi* i *An. martinius* koje se zbog velike međusobne sličnosti ITS2 sekvence svrstne u istu filogenetsku skupinu (Slika 32). Filogenetsko stablo je izrađeno metodom najveće vjerovatnosti uz 100 samoučitavanja. Ova metoda maksimizira vjerovatnost grupiranja određenih skupina sekvenci u te iste skupine. Razdvajanje vrsta i njihova međusobna udaljenost prikazana je na i radijalnom filogenetskom stablu (slika 33.).

Metoda najveće štedljivosti podrazumijeva najmanje evolucijskih promjena, a bira optimalno filogenetsko stablo prema točno određenom optimalnom kriteriju. Uz 1000 samoučitavanja (bootstrap) zbog dobivanja veće pouzdanosti, ovom metodom izračunato je filogenetsko stablo (Slika 34.) koje također pokazuje odvajanje vrsta unutar kompleksa, no unutar vrsta su sekvence vrlo slične ili identične pa je moguć veliki broj kombinacija svrstavanja sekvenci unutar tih skupina što za posljedicu ima male vrijednosti dobivene samoučitavanjem. Kada se unutar dobro odvojene skupine povećava broj sekvenci koje se međusobno slične vrijednosti samoučitavanja pada jer je obrnuto proporcionalan broju kombinacija po kojima se sekvence raspoređuju unutar skupine. Zbog navedenog se granjanja čija je vrijednost samoučitavanja manja od 50 ne smatraju potpuno razlučenima. Na stablu se može vidjeti kako se sekvence vrsta komaraca iz Hrvatske svrstavaju u skupine s istim vrstama čije su sekvence analizirane i naspram njih pokazuju male razlike. Upravo zbog tih malih razlika, u ovom slučaju, vidljiv je samo relativan prikaz vrsta i teško je razlučiti koje su vrste „mlađe“, a koje „starije“.

Filogenetičke i molekularne evolucijske analize su provedene u programu MEGA 6 (Hall, 2013; Tamura et al., 2011; Tamura et al., 2013)



Slika 32. Filogenetsko stablo dobiveno analizom cjelokupne sekvence ITS2 odsječka primjenom metode najveće vjerovatnosti (Maximum Likelihood). Filogenetska analiza je obuhvatila i sekvence svih vrsta iz kompleksa *Anopheles maculipennis* preuzetih iz banke gena (GenBank, NCBI). Pristupni brojevi sekvenci preuzetih iz banke gena (GenBank, NCBI) nalaze se prije, a zemlja podrijetla iza imena. Sekvence izdvojene u filogenetske skupine su uokvirene zasebnim bojama, dok su sekvence iz Hrvatske osjenčane bojom pripadajuće skupine. Dužina grana proporcionalna je broju promjena. Brojevi u čvorištu grana predstavljaju vrijednosti dobivene metodom samoučitavanja u 100 ponavljanja.



Slika 34. Filogenetsko stablo dobiveno analizom cjelokupne sekvence ITS2 odsječka primjenom metode najveće štedljivosti (Maximum Parsimony). Filogenetska analiza je obuhvatila i sekvence svih vrsta iz kompleksa *Anopheles maculipennis* preuzetih iz banke gena (GenBank, NCBI). Pristupni brojevi sekvenci preuzetih iz banke gena nalaze se na početku, a zemlja podrijetla na kraju. Sekvence komaraca iz Hrvatske trenutno nemaju pristupni broj te su osjenčani različitim bojama. Dužina grana proporcionalna je broju promjena. Brojevi u čvorištu grana predstavljaju vrijednosti dobivene metodom samoučitavanja u 1000 ponavljanja.

5. DISKUSIJA

Velika raznolikost staništa na području Hrvatske ima za posljedicu i dosada utvrđenu veliku raznolikost vrsta komaraca - 52 vrste (Klobučar et al., 2014; Klobučar et al., 2006; Merdić, 1990; Merdić et al., 2004; Žitko i Merdić, 2006), što se potvrđuje raznolikošću vrsta i unutar samog kompleksa *Anopheles maculipennis*. Ovim radom istraživani kompleks i fauna komaraca dobila je još jednog člana, a to je vrsta *Anopheles daciae* Linton, Nicolescu & Harbach. S ovom je vrstom na području Hrvatske dosad zabilježeno svih sedam palearktičkih vrsta iz kompleksa koje obitavaju na području Europe što je za zemlju relativno male površine impresivan podatak. Primjerice za usporedbu na području dobro istražene Velike Britanije obitavaju tri vrste iz kompleksa *An. maculipennis*: *Anopheles atroparvus* van Thiel; *Anopheles messeae* Falleroni i *Anopheles daciae* Linton, Nicolescu & Harbach (Linton et al., 2005).

Raspoznavanje kriptičnih vrsta kao što su kompleksi vrsta unutar porodice Anophelinae dugo je predstavljalo sistematski problem. Kada su palearktičke vrste malaričnih komaraca opisane kao vrste s „minimalnim morfološkim razlikama i naširoko simpatrične“ za razliku od neoarktičkih koje su „znatno različite i alopatrične“ (White, 1977), svi palearktički pripadnici *Maculipennis* grupe su svrstani u kompleks (Harbach, 1994). Od tada se kontinuirano, različitim metodama, otkrivaju vrste i razlike među vrstama unutar kompleksa. Metode razlikovanja vrsta kroz povijest bazirale su se na različite morfološke oznake: genitalije mužjaka, raspored dlaka kod ličinki, jaja, ljuskice na krilima, dlake kod kukuljica, no tradicionalno najraširenija metoda za raspoznavanje vrsta unutar *Anopheles maculipennis* kompleksa je morfologija jaja (Hackett i Missiroli, 1935; Jetten i Takken, 1994). Dugo je morfologija jaja bila osnovna metoda prema kojoj su se određivale vrste unutar kompleksa *Anopheles maculipennis* (Linton et al., 2003). Međutim, pokazalo se da među vrstama postoje varijacije u morfologiji jaja koje mogu dovesti do krive identifikacije (Alten et al., 2000; Linton et al., 2002a). Primjerice, smatralo se kako su crna melanička jaja karakteristika vrste *An. melanoon*, no potvrđena su i kod vrste *An. atroparvus* (Nicolescu et al., 2004). Iako se smatra da je odsutnost zračnih plovaka na jajima osobina vrste *An. sacharovi*, dokumentirana je kako prisutnost ili odsutnost plovaka ovisi o temperaturi (Jetten i Takken, 1994).

Prugavost politenih kromosoma iz žlijezda slinovnica pokazala je uspješnost kod odvajanja nekih vrsta iz kompleksa, ali ne svih – ovi kromosomi kod vrsta *An. atroparvus* i *An.*

labranchie su homosekvencijalni (Kitzmiller et al., 1967). Izoenzimske razlike omogućuju razlikovanje gotovo svih vrsta, no ne i za par *An. atroparvus* i *An. labranchie* (Cianchi et al., 1985).

Rezultati križanja su još jedan dijagnostički alat pri razdvajanju vrsta unutar kompleksa *Anopheles maculipennis* (Kitzmiller et al., 1967). Križanjem vrste *An. melanoon* i *An. messeae* gotovo 60% jaja se izleglo dajući ženke s normalno razvijenim ovarijima, ali su mužjaci imali atrofirane testise. Križanjem vrste *An. melanoon* i *An. maculipennis* iz jaja je dobiveno samo 27% ličinki čija je smrtnost bila velika, dok se križanjem vrsta *An. maculipennis* i *An. messeae* 99% jaja nije izleglo, a ostatak je uginuo prije 2. ličinačkog stadija (Kitzmiller et al., 1967).

Prema Beckeru (2010) moguće je razlikovati ličinke unutar kompleksa *Anopheles maculipennis* prema broju dlačica na abdominalnom segmentu IV i V. No zbog postojanja intraspecijskih varijacija za ovu osobinu i preklapanja između vrsta potrebno je napraviti seriju identifikacija većeg broja ličinki sa statističkim rezultatom, što posljedično onemogućava identifikaciju malog broja jedinki.

Morfometrijske metode za razlikovanje unutar i između vrsta *An. atroparvus* i *An. maculipennis* su rađene na krilima, no nisu dala zadovoljavajuće rezultate (Harbach, 2013; Vicente et al., 2011). Sličan je slučaj bio s vrstama unutar kompleksa *Anopheles dirus* (Harbach, 2013).

Kao nadopuna navednim metodama uvedena je molekularna identifikacija kriptičnih vrsta unutar roda *Anopheles* na osnovi DNA odsječaka (Collins i Paskewitz, 1996). Prednost je ove metode bila osjetljivost, pouzdanost i mogućnost velikog broja identifikacija u kratkom vremenu. Štoviše, ova metoda može se primjeniti na sve stadije razvoja, spolove, cijele uzorke ili samo njihove dijelove (Harbach, 2013). Molekularna filogenija bazirana na ITS2 odsječku rDNA za sedam vrsta iz *Anopheles maculipennis* kompleksa prvi put je primjenjena 1999. godine (Marinucci et al., 1999). Rezultati iz tog istraživanja izdvajala su vrste *An. sacharovi* i *An. martinius* što se poklapa s filogenetskim stablom dobivenim u ovom istraživanju s tim da se uz vrstu *An. martinius* svrstala i *An. artemievi* (Slika 32. i 33.) što jasno pokazuje najveću odvednost ovih vrsta unutar kompleksa *Anopheles maculipennis*. To se može potvrditi i malim morfološkim razlikama prema kojima je moguće razlikovati vrstu *An. sacharovi* od ostalih u kompleksu (Becker et al., 2010).

Trenutno ova metoda pokazuje najviše pouzdanosti i sve češće se koristi (Buchheim et al., 2011; Merget et al., 2012; Schultz et al., 2005; Wolf et al., 2005), naročito za identifikaciju većeg broja kompleksa vrsta unutar roda *Anopheles* (Gholizadeh et al., 2013; Hackett et al., 2000; Kronefeld et al., 2014; Malafronte et al., 1999; Manonmani et al., 2001; Patsoula et al., 2007; Vaulin i Novikov, 2010; Wilkerson et al., 2004). Pouzdanost raste primjenom dodatnih metoda, ali i s porastom broja sekvenci u banci gena (GenBank)(Merget et al., 2012)

Metodom molekularne identifikacije u ovom istraživanju uspješno su identifikirane uzorkovane vrste iz kompleksa *Anopheles maculipennis*, te je određena sekvenca ITS2 regije rDNA.

Sekvenca vrste *An. maculipennis s.s.* identifikirane u Engleskoj (Linton et al., 2003) imala je 472 parova baza, uključujući i početnice (43 bazna para) što je identično dužini sekvence za istu vrstu pronađenu na području Hrvatske. Udio AT baznih parova sekvence iz Engleske je bio 49,1% dok je sekvenca iz Hrvatske imala udio od 48,95% (Tablica 3.). Ova vrijednost korespondira s drugim rezultatima za vrste unutar roda *Anopheles* (Linton et al., 2003; Marinucci et al., 1999; Proft et al., 1999). Manja razlika koja je nastala između udjela AT baznih parova kod sekvenci iz Hrvatske i Engleske je posljedica činjenice da se u ovom istraživanju za filogenetske izračune sekvenci nisu uzimale početnice. Između sekvenci nije bilo intraspecifičnih varijacija, što je slučaj i kod vrsta *An. atroparvus* (Linton et al., 2002a; Vicente et al., 2011), *An. melanoon* i *An. messeae* (Linton et al., 2001; Linton et al., 2002a).

Sekvenca vrste *An. melanoon* iz Hrvatske imala je jednaku dužinu sekvence (439 parova baza) kao i jedinke iste vrste iz Grčke (Linton et al., 2002b) te identične nukleotidne slijedove ITS2 regije sa sekvencama iz banke gena (GenBank). Dobro odvajanje filogenetske grupe *melanoon*, potvrđuje se visokom bootstrap vrijednošću (Slika 32.). Vrsta *An. daciae* također je pokazala visok stupanj identičnosti sekvenci s ostalim sekvencama iz Europe, dok se unutar filogenetske grupe *messeae* (Slike 32. i 34.) pojavljuju male razlike u odnosu na sekvence iz Irana i Rusije koje su vjerovatno posljedica plastičnosti vrste i njenih regionalnih prilagodbi na širokom području rasprostranjenja ove vrste (Bezzhonova i Goryacheva, 2008; Djadid et al., 2007) te nastajanja novih haplotipova (Di Luca et al., 2004).

Ovako male genetičke razlike među vrstama i populacijama unutar kompleksa *Anopheles maculipennis* evidentirane unutar ovog istraživanja potvrđene su i unutar populacija iste vrste na vrlo velikim geografskim udaljenostima. U istraživanju koje je uključilo populacije vrste *An. atroparvus* od Rumunjske do Portugala, unutar udaljenosti od 3000 kilometara s dvije

velike fizičke barijere - Alpe i Pirineji, također je rezultiralo zanemarivom genetičkom razlikom (Vicente et al., 2011). Moguće objašnjenje ovoga fenomena bilo bi velik protok gena među populacijama, što je zapravo malo vjerojatno s obzirom na fizičke barijere i udaljenost. Drugo moguće objašnjenje su povijesne demografske perturbacije u populacijama (posebice širenje), odnosno promjene u funkcioniranju bioloških sustava uzrokovanih nekim vanjskim mehanizmima, kao što je glacijacijski maksimum od prije cca. 18.000 godina. Nakon ovakvih, kataklizmičkih događaja moglo je doći do naglog širenja vrsta iz kompleksa *Anopheles maculipennis*. Dodatno, u vanjske mehanizme perturbacija u populacijama ubrajaju se i sve mjere poduzete u svhu istrebljivanja malarije s prostora Europe (Vicente et al., 2011)

Distribucija vrsta ustanovljena ovim istraživanjem nudi i nove spoznaje za areale vrsta iz kompleksa *Anopheles maculipennis* i staništa na kojima žive. Potvrđen broj vrsta i rasprostranjenost populacija malaričnih komaraca velikog je epidemiološkog značenja u slučaju pojavljivanja bolesti koje prenose vektori.

Iako su vrste *An. messeae* i *An. maculipennis* u kontinentalnom dijelu uglavnom simpatrične vrste i nastanjuju površine Hrvatske od Iloka na istoku do granice sa Slovenijom na zapadu, ne može se reći da dijele ista ili čak slična staništa. Unutar ovog istraživanja staništa jedinki vrste *An. messeae* su uglavnom bile u nizinskim dijelovima Hrvatske, naročito u poplavnim područjima velikih rijeka, što je slučaj i u cijeloj centralnoj Europi (Becker et al., 2010). Staništa gdje su uzorkovane ličinke ove vrste su isključivo slatkovodna s puno vodene vegetacije, često zasjenjena. Primjerice, cijelo Lonjsko polje nastanjuje gotovo isključivo ova vrsta, samo je na jednoj postaji (od ukupnih deset) pronađena i vrsta *An. maculipennis*. Na ovim je staništima vrsta bila dominantna i u prethodnim istraživanjima (Adamović, 1978; Adamović, 1982b; Adamović i Paulus, 1984; 1985a). Međutim, iako mnogi autori navode da na ovakvom tipu staništa ova vrsta dolazi u velikom broju (Adamović, 1982b; Adamović i Paulus, 1984; Becker et al., 2010; Sinka et al., 2010a) u ovom istraživanju nije zabilježena velika gustoća populacija. Prema izboru domaćina, vrsta je izrazito zoofilna - ženke s uzetim krvnim obrokom uzorkovane su u štalama na području Međimurja, te u dolini Neretve. U posljednje vrijeme sumnja se u vektorsku sposobnost ove vrste (Nicolescu et al., 2004).

Za razliku od vrste *An. messeae*, jedinke vrste *An. maculipennis* sklone su manjim staništima, odnosno manjim vodenim površinama. Za usporedbu, na lokalitetu u Iloku u velikom leglu (staro korito rijeke Dunav) uzorkovane su isključivo ličinke vrste *An. messeae*. Svega par

kilometara dalje, također u Iloku, uzorkovane su isključivo ličinke vrste *An. maculipennis* no na puno manjem leglu - bari širokoj nekoliko metara. Slično je bilo na lokalitetu u Zagrebu gdje je na postaji Savica – poplavno područje rijeke Save, uzorkovana vrsta *An. messeae*, dok je u Trešnjevačkom potoku uzorkovana vrsta *An. maculipennis*. Na ovim primjerima se jasno vidi sklonost prema različitim staništima. Nadalje, što se ide prema višim nadmorskim visinama, odnos brojnosti ovih vrsta se rapidno mijenja pa tako već na nadmorskoj visini iznad 200 metara u ispitivanim staništima više nije pronađena niti jedna jedinka vrste *An. messeae*. Višim nadmorskim visinama svakako je bolje prilagođena vrsta *An. maculipennis* čije su ličinke nađene i na nadmorskoj visini od 2300 metara (Postiglione et al., 1973). S ovim podacima podudaraju se i podaci iz istraživanja u Rumunjskoj gdje su iznad 200 metara nadmorske visine pronađene jedinke isključivo vrste *An. maculipennis* (Nicolescu et al., 2004). Mala i srednja legla, gdje su najčešće nađene ličinke vrste *An. maculipennis*, uglavnom su bila slatkovodna s umjerenom količinom vodene vegetacije i osunčana (Slika 27.). Čak i u priobalnom dijelu nije nađena u bočatim vodama, što je bio slučaj i u drugim istraživanjima (Linton et al., 2003; Poncon et al., 2007; Romanović, 2007). Odrasle jedinke su uzorkovane pomoću CDC-klopke i aspiratora – najčešće unutar životinjskih nastambi, što potvrđuje već zabilježenu izrazitu zoofiliju ove vrste (Becker et al., 2010).

Novija otkrivanja kriptičnih vrsta često su rezultat molekularnih analiza. Prema rezultatima molekularnih analiza opisana je i vrsta *Anopheles daciae* Linton, Nicolescu & Harbach kao novi, dotad neopisani član kompleksa *Anopheles maculipennis* s obala Crnog Mora u južnoj Rumunjskoj. Opis nove vrste se bazirao na razlikama unutar ITS2 regije rDNA u odnosu na vrstu *An. messeae* te manjim razlikama u morfologiji jaja (Nicolescu et al., 2004). Iste godine objavljen je članak u kojem se navodi da vrsta *An. messeae* na području Europe ima pet haplotipova (Di Luca et al., 2004), od kojih se jedan poklapao s novoopisanom vrstom. Daljnji nalazi ove vrste bili su u Engleskoj (Linton et al., 2005), a zatim u Njemačkoj (Kronefeld et al., 2012; Weitzel et al., 2012). U članku Linton et al. (2005) su iznijeli i pretpostavku o rasprostranjenosti vrste *An. daciae* u Italiji i Kazahstanu osnovanu na analizama mitohondrijske DNA, odnosno nukleotidne sekvence citokrom oksidaze I objavljene u istraživanjima od Di Luca et al. (2009), no te pretpostavke još nisu potvrđene. Hrvatska je nova zemlja na popisu rasprostranjenja ove vrste i novi dokaz koji potvrđuje postojanost populacija ove vrste na širem geografskom području. Budući se u stadiju ličinke, kukuljice i odraslog oblika ova vrsta ne razlikuje u odnosu na vrstu *An. messeae*, a u ITS2 regiji rDNA se razlikuju u pet mononukleotidnih supstitucija na sekvencama jednakih duljina

(Slika 31.), nekolicina autora pretpostavlja da je to zapravo samo varijetet vrste *An. messeae* kojoj su zbog široke rasprostranjenosti već dokazani određeni regionalni varijeteti (Bezzhonova i Goryacheva, 2008; Gordeev et al., 2008). No, određene činjenice kao što su različiti politeni kromosomi kod jedinki istočno i zapadno od Kaspijskog jezera (Stegniy, 1982) i dokumentirana različita vektorska sposobnost prijenosa malarije (u sjeverozapadnoj Europi se *An. messeae* ne smatra vektorom malarije, (Jetten i Takken, 1994) ipak govore u korist odvajanja nove vrste - *An. daciae*.

Vrsta je u svim dosadašnjim istraživanjima pokazala simpatričnost s vrstom *An. messeae* (Kronefeld et al., 2012; Kronefeld et al., 2014; Linton et al., 2005; Nicolescu et al., 2004), što je slučaj i u Hrvatskoj, ali indikativna je činjenica da je ova vrsta nađena i na nadmorskim visinama višim od 200 metara i u Rumunjskoj (Nicolescu et al., 2004) i u Hrvatskoj (560 m.n.v.) gdje je simpatrična s vrstom *An. maculipennis*. Ovo je još jedan dokaz različitosti od tipično „nizinske“ vrste *An. messeae*. Istraživanja distribucije ove vrste pokazala su da je prisutnija nego se prvotno mislilo, pa je trenutno utvrđena njena rasprostranjenost na području srednje i južne Engleske (Danabalan et al., 2014) te jugozapadne, srednje i istočne Njemačke (Kronefeld et al., 2014).

Staništa vrste nisu detaljno opisana u literaturi budući su jedinke najčešće skupljane kao odrasli oblici u životinjskim skloništima i štalama (Danabalan et al., 2014; Linton et al., 2005; Nicolescu et al., 2004) ili s klopka s CO₂ kao atraktantom (Weitzel et al., 2012). Unutar ovog istraživanja dani su podatci o staništima iako su sve jedinke uhvaćene u odraslom stadiju pomoću CO₂-klopke i aspiratora, ali je to bilo neposredno pored velikih vodenih površina koju su vjerovatno poslužile kao leglo ličinkama. Na sva tri lokaliteta – uz kanal Čarnu u Kopačkom Ritu, uz rijeku Bosut u Vinkovcima i uz jezero Ričice u Lici radi se o velikim, stajaćim ili gotovo stajaćim, slatkovodnim površinama s razvijenom makrofitskom vegetacijom. Površine su bile i djelomično zasjenjene s bogatom obalnom vegetacijom. Lokalitet Ričice u Lici najjužnijii je nalaz ove vrste i bitno je proširio njezin dosada poznati areal rasprostranjenja.

Kako je već spomenuto, u dosadašnjim istraživanjima su jedinke ove vrste uglavnom sakupljene u štalama, što je bio slučaj i na lokalitetu Ričice, a to jasno upućuje na zoofilnost ove vrste. No, detaljnija istraživanja krvi iz abdomena nahranjenih ženki napravljena su u Engleskoj (Danabalan et al., 2014) gdje se pokazalo da ova vrsta pokazuje i popriličan oportunistički karakter hraneći se na šest različitih životinja, uključujući i ljude. Za razliku od

vrste *An. daciae*, druge dvije vrste u ovom istraživanju - *An. messeae* i *An. atroparvus* pokazale su sklonost prema određenim domaćinima i samo po jedan slučaj pojedinačnog hranjenja na ljudima, dok je kod vrste *An. daciae* čovjek bio cilj u 11 slučajeva. Oportunizam ove vrste očituje se i u osam slučajeva hranjenja na dva ili više domaćina u istom gonotropnom ciklusu, od kojih je najznačajnije spomenuti kombinirano hranjenje na pticama i čovjeku.

Status vrste *Anopheles subalpinus* je dugo bio upitan. Prvi taksonomski problemi vezani za ovu vrstu potječu još od opisa vrste *An. messeae* Faleronni, 1926. - pri čemu je opisana kao vrsta s crnim, melaničnim jajima. Nedugo nakon, opisana je ista vrsta u Nizozemskoj kao *An. messeae*, ali sa sjevernijom distribucijom i izrazito ispruganim jajima. Posljedično je vrsti s juga s crnim jajima dano ime *Anopheles melanoon* (Hackett, 1934). Još jedna forma vrste *An. messeae* s ispruganim jajima opisana je u Albaniji kao *Anopheles maculipennis subalpinus* (Hackett i Missiroli, 1935). Kasnija istraživanja pružila su dokaze o statusu vrste za *An. messeae* i *An. melanoon*, dok je *An. subalpinus* okarakteriziran kao varijetet *An. melanoon* s drugim fenotipom jaja (Kitzmilller et al., 1967). Stvari su se zakomplicirale kada je objavljen dokaz o reproduktivnoj izolaciji vrsta *An. melanoon* i *An. subalpinus* (Cianchi et al., 1987). Prema posljednjim istraživanjima koja su uključivala molekularne metode dokazano je da su komarci izleženi iz ispruganih jaja identificiranih kao vrsta *An. subalpinus*, i oni izleženi iz crnih, melaničnih jaja tipičnih za *An. melanoon* genetički identični (Linton et al., 2002b). Problem tu ne prestaje jer su zapažena crna jaja i kod drugih vrsta iz kompleksa *Anopheles maculipennis*. Prema M. Coluzzi u (Ramsdale i Snow, 2000) *An. subalpinus* povremeno polaže tamna, *melanoon* – tip jaja, dok su se u Rumunjskoj iz tamnih jaja izlegle jedinke vrste *An. atroparvus*. Temeljem ovih navoda i DNA analiza vrsta *An. subalpinus* je naposljetku proglašena sinonimom vrste *An. melanoon* (Linton et al., 2002b) koja ima polimorfna jaja.

Nalaz vrste *An. subalpinus* na području delte Neretve (Adamović, 1983) zbog gore navedenih razloga je vrlo upitan. U ovom članku ne navodi se izgled jaja prema kojima je određena vrsta *An. subalpinus*, ni prema kojim identifikacijskim ključevima. Za ovu vrstu se navodi samo stanište na samoj delti Neretve gdje je voda bila bočata. Dodatni razlog sumnji da ovaj nalaz nije pripadao vrsti *An. melanoon* je preferirano stanište koje je prema Horsfall (1955.) u (Jetten i Takken, 1994) za vrstu *An. melanoon* definitivno povezano sa slatkovodnim područjem dok prema Bates (1941.) u (Jetten i Takken, 1994) legla vrste *An. melanoon* imaju malu koncentraciju nitrata i salinitet manji od 1%. Zbog intenzivne poljoprivrede na području

delte Neretve teško je vjerovati u nisku koncentraciju nitrata u vodi, a same prijelazne vode unutar ušća Neretve imaju salinitet od 5 - 20‰ (Kušpilić i Precali, 2007). Zbog navedenih razloga smatram kako je nalaz vrste *An. melanoon* na području delte Neretve pogrešno determiniran, a zbog nedostatka podatka ne može se utvrditi kojoj vrsti uzorak pripada.

U sklopu ovog istraživanja pronađene su odrasle jedinke vrste *An. melanoon* u štali s konjima i kravama na južnoj strani delte Neretve. I prema literaturnim navodima ova vrsta je nađena u štalama (Linton et al., 2007; Nicolescu et al., 2004) što potvrđuje njenu sklonost životinjama. U Francuskoj je u 90% slučajeva u komarcima ove vrste pronađena krv krava i konja (Poncon et al., 2007). Inače je tijekom ovog istraživanja na delti Neretve bilo gotovo nemoguće pronaći ličinke komaraca unutar samog područja gdje je intenzivna poljoprivreda. Mjesta nalaza ličinki bila su ograničena isključivo na mjesta gdje iz podzemlja izvire svježja voda tzv. virovi. Osim na području južne Dalmacije, odrasla jedinka vrste *An. melanoon* je pronađena i na području Istre, također u štali s kravama. Ovaj nalaz je potpuni novi za dosad poznati areal ove vrste jer tu nije pronađena niti u prethodnim istraživanjima porodice Anophelinae, niti se Istra navodi kao potencijalno područje distribucije ove vrste (Becker et al., 2010; Jetten i Takken, 1994)

Nalazi ove vrste su tim vrijedniji što se vrsta smatra rijetkom i dosada nije nađena u broju jednakom drugim vrstama iz kompleksa (Becker et al., 2010). Osim u Hrvatskoj, vrsta je recentno nađena u Rumunjskoj – 1 primjerak (Nicolescu et al., 2004), Grčkoj - 23 primjerka (Linton et al., 2007), po jedan primjerak u Portugalu i Španjolskoj, te na Korzici, Siciliji i Italiji (Becker et al., 2010).

Vrsta *Anopheles atroparvus* nije uzorkovana u sklopu ovog istraživanja, što je rezultat vrijedan diskusije. Prema nalazima iz Podravine (Adamović, 1982b), Vojvodine (Adamović, 1978) i Srijema (Adamović, 1982a) može se zaključiti kako je ova vrsta bila široko rasprostranjena u kontinentalnom dijelu Hrvatske. U Vojvodini i Srijemu je okarakterizirana kao srednje česta s udjelom u fauni uhvaćenih komaraca od preko 9%, dok je u Podravini bila rijetka vrsta. Inače je ova vrsta rasprostranjena po cijeloj Europi, nešto češća u priobalnim područjima jer pokazuje sklonost prema bočatim vodama (Slika 6.) (Sinka et al., 2010a). I u radovima Adamovića (1978, 1982) navodi se brojnija populacija ove vrste na područjima gdje postoje slaništa i lužnata tla. No, nešto što se sve češće spominje u recentnoj literaturi je sve manje uhvaćenih jedinki vrste *An. atroparvus* na mjestima gdje je nekad bila brojna (Kronefeld et al., 2014; Poncon et al., 2007; Takken et al., 2002). Vrsta je označena kao

dominantan vektor malarije (Sinka et al., 2010a) i tijekom prošlog stoljeća puno je mjera poduzeto u svrhu istrebljivanja komarca malaričara. Primjerice, u istraživanju koje je provedeno u Njemačkoj (Kronefeld et al., 2012) od 477 identificiranih komaraca iz kompleksa *Anopheles maculipennis* samo je jedna jedinka bila vrste *An. atroparvus*. Dvije godine kasnije isti autori su ponovili i proširili istraživanje (Kronefeld et al., 2014), identificirano je 1105 komaraca iz kompleksa *Anopheles maculipennis* od toga su samo 3 jedinke bile vrste *An. atroparvus*, iako je istraživanje obuhvatilo sjever Njemačke koji je tradicionalno bio naseljen ovom vrstom. Na jugozapadu Francuske, u regiji Camargue bila je prisutna endemična malarija s vrstom *An. atroparvus* kao jednim od čestih vektora, ali nedavnim istraživanjima ova je vrsta označena vrlo rijetkom nakon što je od 131050 komaraca iz roda *Anopheles* identificirano svega 245 jedinki vrste *An. atroparvus*. Slična situacija je zabilježena na jugozapadu Nizozemske, na ušću rijeka Rhine i Meuse – područje koje je također bilo malarično s vrstom *An. atroparvus* kao jedinim vektorom (Takken et al., 2002). Od 150 ispitanih ličinki četiri su pripadale vrsti *An. atroparvus*, a ostale vrsti *An. messeae*. Budući su nekoliko godina ranije (1999.) autori na tom području također utvrdili veliku dominaciju vrste *An. messeae* zaključili su kako je stanište prošlo kroz dramatične ekološke promjene od prethodnog istraživanja porodice Anophelinae 1935., što je rezultiralo gotovo izumiranjem vrste *An. atroparvus*. Transformacija iz bočatih u slatkovodna staništa i velika onečišćenja uzrokovana deterdžentima označeni su kao glavni krivci drastičnog smanjenja populacija ove vrste (Takken et al., 2002).

Izostanak nalaza ove u Hrvatskoj također može biti posljedica ovih razloga, te će se buduća istraživanja usmjeriti prema traženju potencijalnih, preostalih populacija ove vrste u nestajanju.

Teorije o mogućoj reintrodukciji malarije u Europu bile su predmet mnogih istraživanja koja su uključivala utjecaj globalnog zatopljenja i klimatskih promjena na širenje areala vektorskih vrsta iz kompleksa *Anopheles maculipennis* (Kuhn et al., 2002; Martens et al., 1995; McMichael, 2003; McMichael et al., 2006). Zapravo, globalno zatopljenje ima veći utjecaj na širenje samog uzročnika malarije – *Plasmodium sp.* jer više temperature pogoduju bržem razvoju i razmnožavanju ovog organizma (Hoshen i Morse, 2004).

Širenje areala vrsta širokih razmjera kod kukaca na području Europe zabilježeno je i na primjeru nekih vrsta leptira (Parmesan et al., 1999) koji pomiču svoj areal prema sjeveru. Čak su i komarci iz kompleksa *Anopheles maculipennis* podložni ovom utjecaju pa je nedavno

utvrđeno širenje areala vrste *An. maculipennis* prema sjeveroistoku, iz Europe u Rusiju do 30 kilometara godišnje (Novikov i Vaulin, 2014). Tijekom 2011. godine zabilježena su dva slučaja autohtone malarije uzrokovane parazitom *Plasmodium vivax* na području Italije s vjerojatnim vektorom *An. labranchiae* (Romi et al., 2012). Na mogućnost reintrodukcije malarije utječu i socioekonomske prilike (Reiter, 2008; Vatandoost et al., 2003), pojava rezistenosti na insekticide malation i propuksur (Akiner, 2014) te prisutnost primarnih, ali i sekundarnih vektora ako što su *An. messeae*, *An. maculipennis* i *An. melanoon* (Alten et al., 2000). Svakako treba uzeti u obzir i sve veću opasnost od introdukcije tropskih bolesti zbog povećanog broja turista koji tijekom ljeta posjećuju našu zemlju. U Hrvatskoj su se po tom receptu već dogodila zaraza *Dengue* – virusom (Gjenero-Margan et al., 2011). Međutim, malarija nije jedina bolest koju prenose malarični komarci. U budućnosti bi trebalo obratiti pozornost i na ostale patogene za koje je potvrđena prirodna infekcija komaraca iz *Maculipennis* grupe kao što su: Tahyna virus, West Nile virus, Sindbis virus, Batai virus, te uzročnici filarioze - *Dirofilaria immitis* i *Setaria labiatopapillosa* (Kronefeld et al., 2012). Činjenica da se vrsta *An. daciae* u jednom gonotropnom ciklusu hranila i na pticama i na čovjeku (Danabalan et al., 2014) stavlja ju i na popis potencijalnih vektora West Nile virusa. Za istu vrstu se sumnja da je skriveni vektor malarije te da je ona objašnjenje dosadašnjem „mozaičnom rasprostranjenju“ malarije prenošenom jedinkama vrste *An. messeae*.

Sve su ovo činjenice koje ukazuju na potencijalnu opasnost od malarije i ostalih bolesti prenošenih komarcima te su podatci o prisutnosti, distribuciji i statusu populacija vektora od velike važnosti kod procjena epidemiološkog rizika (Vignjević et al., 2013). U svrhu toga bi se u nastavku istraživanja nastojalo ustrajati na pronalaženju primarnih europskih vektora malarije na području Hrvatske – *An. labranchiae*, *An. sacharovi* i *An. atroparvus*.

U kontekstu zaštite prirode i okoliša ovo istraživanje prvenstveno daje doprinos u poznavanju bioraznolikosti i distribuciji komaraca na području Hrvatske, pri čemu je utvrđena jedna nova vrsta – *An. daciae*, dok je za vrstu *An. subalpinus*, utvrđena pogrešna prvotna determinacija i potvrđeno prisustvo rijetke vrste - *An. melanoon* na području Hrvatske.

Međutim, zaštita komaraca, barem kao dijela velike bioraznolikosti Hrvatske, povlači za sobom druge asocijacije. „Kad bi barem komarci nestali sa Zemlje“ - mišljenje je koje dijeli mnogo ljudi ovog svijeta. Na svijetu je trenutno 3540 imenovanih vrsta komaraca (Harbach, 2013), od kojih svega nekoliko stotina bode i molestira čovjeka. Žive u gotovo svim kontinentima i staništima, i imaju važnu ulogu u brojnim ekosustavima. Osim toga, komarci su prisutni na Zemlji preko 100 milijuna godina i usput su evoluirali s brojnim drugim

vrstama. Čak i prijenos bolesti, za što se najviše optužuje komarce, donosi ekološku ravnotežu u populacije podupirući evolucijski koncept preživljavanja najotpornijih. Kada bi se komarce izbrisalo s lica Zemlje - predator bi ostao bez plijena, biljke bez oprašivača.(Fang, 2010). Primjerice, visoko specijalizirani predatori ličinki komaraca kao što je riba *Gambusia affinis* bi vjerovatno izumrla bez komaraca, a gubitak ove ili neke druge vrste riba može imati veliki utjecaj u oba smjera unutar hranidbenog lanca. Voljeli mi to ili ne, komarci su bitna komponentna okoliša u kojem živimo.

6. ZAKLJUČCI

U okviru ovog rada istraživana je kompleks sestrijskih vrsta malaričnih komaraca *Anopheles maculipennis* kompleks na području Hrvatske. Iz dobivenih rezultata mogu se izvući slijedeći zaključci:

- Nukleotidna sekvenca intergenske regije ITS2 potvrdila se dostatnom za razlučivanje vrsta unutar kompleksa, no nedovoljna za utvrđivanje intraspecijskih razlika među populacijama
- Molekularnom identifikacijom određene su četiri vrste iz kompleksa *Anopheles maculipennis*, a to su: *Anopheles messeae*, *Anopheles maculipennis*, *Anopheles daciae* i *Anopheles melanoon*
- Vrsta *Anopheles daciae* predstavlja novu vrstu u fauni komaraca Hrvatske, a nalaz na lokalitetu Ričice (Lika) predstavlja dosad najjužniji zabilježeni nalaz ove vrste. Ovaj nalaz znatno je proširio do sada poznati areal ove vrste na jug
- Vrsta *Anopheles melanoon* je također nova vrsta na popisu faune komaraca Hrvatske, no vrsta *Anopheles subalpinus* koja je dosada bila na popisu je revidirana kao sinonim vrste *Anopheles melanoon*. Nalaz ove vrste u Istri novi je podatak za distribuciju vrste
- Distribucija vrste *An. maculipennis* pokriva gotovo cijelu Hrvatsku, vrsta *An. messeae* je uglavnom ograničena na kontinentalni dio - uz izuzetak delte Neretve, vrsta *An. melanoon* pronađena je u Istri i Dalmaciji, a vrsta *An. daciae* u Slavoniji, Baranji i Lici.
- Područje mediteranske Hrvatske bogatije je vrstama malaričnih komaraca od kontinentalnog dijela
- Filogenetske analize populacija vrsta iz kompleksa *Anopheles maculipennis*, kako iz Hrvatske tako i iz ostatka svijeta, pokazuju zanemarive varijabilnosti unutar nukleotidne sekvence ITS2 regije

7. LITERATURA

- Adamović Ž (1978) Anophelinae mosquito species (Diptera, Culicidae) in west Bačka, Yugoslavia. *Acta Vet (Beograd)* 28: 6.
- Adamović Ž (1982a) Anophelinae populations (Diptera, Culicidae) in Srem, Serbia. *Acta Vet (Beograd)* 32: 8.
- Adamović Ž (1982b) Anopheline mosquitoes in Podravina, Croatia. *Acta entomol. Jugoslavica* 19: 9.
- Adamović Ž (1983) Anophelinae mosquitoes in the Neretva delta, Yugoslavia. *Acta Vet (Beograd)* 33: 8.
- Adamović Ž & Paulus R (1984) A survey of the Anophelinae mosquitoes in srednja Posavina, Croatia. *Acta Vet (Beograd)* 34: 5.
- Adamović Ž & Paulus R (1985a) Anophelinae species in the region of Zagreb, Croatia. *Acta Vet (Beograd)* 35: 6.
- Adamović Ž & Paulus R (1985b) A survey of the Anophelinae mosquitoes in Lika, Yugoslavia. *Glasnik Prirodoslovnog muzeja u Beogradu* 40: 6.
- Adamović Ž & Paulus R (1987) The indoor resting Anophelinae in the Istria peninsula, Croatia. *Zbornik Srpske akademije znanosti i umjetnosti* 27: 91.
- Akiner MM (2014) Malathion and propoxur resistance in Turkish populations of the *Anopheles maculipennis* Meigen (Diptera: Culicidae) and relation to the insensitive acetylcholinesterase. *Turkiye Parazitolojisi Dergisi* 38: 111-115. doi:10.5152/tpd.2014.3388.
- Alten B, Çağlar SS & Özer N (2000) Malaria and its vectors in Turkey. *European Mosquito Bulletin* 7.
- Ambriović Ristov A (2007) Metode u molekularnoj biologiji. Institut Ruđer Bošković, Zagreb.
- Becker N, Petrić D, Zgomba M, Boase C, Madon M, Dahl C & Kaiser A (2010) Mosquitoes and their control. Springer, Berlin.
- Bettini S, Gradoni L, Cocchi M & Tamburro A (1978) Rice culture and *Anopheles labranchiae* in central Italy. World Health Organization, Geneva.
- Bezzhonova OV & Goryacheva II (2008) Intragenomic heterogeneity of rDNA internal transcribed spacer 2 in *Anopheles messeae* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 45: 337 - 341.
- Božičić B (1980) Prilog poznavanju faune Culicidae Vojvodine. *Acta entomol. Jugoslavica* 16: 7.
- Bradley BA, Blumenthal DM, Wilcove DS & Ziska LH (2010) Predicting plant invasions in an era of global change. *Trends in Ecology & Evolution* 25: 310-318. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2009.12.003>.
- Buchheim MA, Keller A, Koetschan C, Forster F, Merget B & Wolf M (2011) Internal transcribed spacer 2 (nu ITS2 rRNA) sequence-structure phylogenetics: towards an automated reconstruction of the green algal tree of life. *PLoS One* 6: e16931. doi:10.1371/journal.pone.0016931.
- Cianchi R, Sabatini A, Boccolini D, Bullini L & Coluzzi M (1987) Electrophoretic evidence of reproductive isolation between sympatric populations of *Anopheles melanoon* and *Anopheles subalpinus*: 3rd International Conference on Malaria and Babesiosis (ed., Anney, France, p. 156.
- Cianchi R, Urbanelli S, Villani F, Sabatini A & Bullini L (1985) Electrophoretic studies in mosquitoes: recent advances. *Parassitologia* 27: 157.

- Collins FH & Paskewitz SM (1996) A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. *Insect Mol Biol* 5: 1-9.
- D'Alessandro G, Bruno Smiraglia C & Lavagnino A (1971) Further studies on the biology of *Anopheles labranchiae* Falleroni in Sicily. 1 - 11.
- Danabalan R, Monaghan MT, Ponsonby DJ & Linton YM (2014) Occurrence and host preferences of *Anopheles maculipennis* group mosquitoes in England and Wales. *Med Vet Entomol* 28: 169-178. doi:10.1111/mve.12023.
- Di Luca M, Boccolini D, Marinuccil M & Romi R (2004) Intrapopulation polymorphism in *Anopheles messeae* (*An. maculipennis* complex) inferred by molecular analysis. *J Med Entomol* 41: 582-586.
- Djadid ND, Gholizadeh S, Tafhiri E, Romi R, Gordeev M & Zakeri S (2007) Molecular identification of Palearctic members of *Anopheles maculipennis* in northern Iran. *Malar J* 6: 6. doi:10.1186/1475-2875-6-6.
- Dukes JS & Mooney HA (1999) Does global change increase the success of biological invaders? *Trends in Ecology & Evolution* 14: 135-139. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0169-5347\(98\)01554-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-5347(98)01554-7).
- Edwards FW (1932) *Genera Insectorum. Diptera, Fam. Culicidae*. Desmet-Verteneuil, Brussels.
- Epstein PR (2001) Climate change and emerging infectious diseases. *Microbes and Infection* 3: 747-754. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01429-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01429-0).
- Fang J (2010) Ecology: A world without mosquitoes. *Nature* 466: 4. doi:10.1038/466432a.
- Garros C, Harbach RE & Manguin S (2005) Morphological assessment and molecular phylogenetics of the *Funestus* and *Minimus* groups of *Anopheles* (Cellia). *J Med Entomol* 42: 522-536.
- Gholizadeh S, Djadid ND, Nouroozi B & Bekmohammadi M (2013) Molecular phylogenetic analysis of *Anopheles* and *Cellia* subgenus anophelines (Diptera: Culicidae) in temperate and tropical regions of Iran. *Acta Tropica* 126: 63-74. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.11.003>.
- Gjenero-Margan I, Aleraj B, Krajcar D, Lesnikar V, Klobucar A, Pem-Novosel I, Kurecic-Filipovic S, Komparak S, Martic R, Duricic S, Betica-Radic L, Okmadzic J, Vilibic-Cavlek T, Babic-Erceg A, Turkovic B, Avsic-Zupanc T, Radic I, Ljubic M, Sarac K, Benic N & Mlinaric-Galinovic G (2011) Autochthonous dengue fever in Croatia, August-September 2010. *Euro Surveill* 16.
- Glick JI (1992) *Illustrated Key to the Female Anopheles of Southwestern Asia and Egypt* (Diptera: Culicidae). Walter Reed Biosystematics Unit: 31.
- Gordeev M, Zsantsov A, Goriacheva I, Shaikevich E & Bezzhonova O (2008) Mosquitoes of the genus *Anopheles* in countries of the WHO European Region having faced a recent resurgence of malaria. WHO Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark.
- Gordeev M, Zvantsov A, Goriacheva I, Shaikevich E & Ezhov M (2005) Description of the new species *Anopheles artemievi* sp.n. (Diptera, Culicidae). *Med Parazitol (Mosk)* 2: 4 - 5.
- Gutsevich A, Monchadskii S & Shtakelberg AA (1974) *Fauna of the U.S.S.R. Diptera Mosquitoes Family Culicidae*. Akad. Nauk. USSR Zool. N., Leningrad.
- Hackett B, Gimnig J, Guelbeogo W, Costantini C & Koekemoer L (2000) Ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS2) sequences differentiate *Anopheles funestus* and *An. rivulorum*, and uncover a cryptic taxon. *Insect Mol. Biol.* 9: 369.
- Hackett L (1934) The present status of our knowledge of the sub-species of *Anopheles maculipennis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 28: 109 - 140.
- Hackett L (1937) *Malaria in Europe, an ecological study*.
- Hackett L & Missiroli A (1935) The varieties of *Anopheles maculipennis* and their relation to the distribution of malaria in Europe. *Riv Malariol* 14: 1 - 67.

- Hall BG (2013) Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Mol Biol Evol* 30: 1229-1235. doi:10.1093/molbev/mst012.
- Harbach RE (1994) Review of the internal classification of the genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): the foundation for comparative systematics and phylogenetic research. *Bull. Entomol. Res.* 84: 331.
- Harbach RE (2004) The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bull Entomol Res* 94: 537 - 553.
- Harbach RE (2013) The phylogeny and classification of *Anopheles* mosquitoes - New insights into malaria vectors: The phylogeny and classification of *Anopheles* mosquitoes - New insights into malaria vectors (ed. InTech, Rijeka, Croatia).
- Harbach RE (2014) Mosquito Taxonomic Inventory.
- Hoshen MB & Morse AP (2004) A weather-driven model of malaria transmission. *Malar J* 3: 32. doi:10.1186/1475-2875-3-32.
- Jetten TH & Takken W (1994) Anophelism without malaria in Europe. *Wageningen Agricultural University Papers* 94: 61.
- Khasnis AA & Nettleman MD (2005) Global Warming and Infectious Disease. *Archives of Medical Research* 36: 689-696. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.03.041>.
- Kitzmiller J, Frizzi G & Baker R (1967) Evolution and speciation within the maculipennis complex of the genus *Anopheles*. *Genetics of Insect Vectors of Disease*: 151 - 210.
- Klobučar A, Lipovac I, Benić N & Krajcar D (2014) Novi nalazi Invazivnih vrsta komaraca u sjeverozapadnoj hrvatskoj tijekom 2013. godine: Djelatnost dezinfekcije, dezinsekcije, deratizacije i zaštite uskladištenih poljoprivrednih proizvoda (ed. by J Korunić), Split, Hrvatska, pp. 49-59.
- Klobučar A, Merdić E, Benić N, Baklaić Z & Krčmar S (2006) First record of *Aedes albopictus* in Croatia. *J Am Mosq Control Assoc* 22: 147-148.
- Kronefeld M, Dittmann M, Zielke D, Werner D & Kampen H (2012) Molecular confirmation of the occurrence in Germany of *Anopheles daciae* (Diptera, Culicidae). *Parasit Vectors* 5: 250. doi:10.1186/1756-3305-5-250.
- Kronefeld M, Werner D & Kampen H (2014) PCR identification and distribution of *Anopheles daciae* (Diptera, Culicidae) in Germany. *Parasitol Res* 113: 2079-2086. doi:10.1007/s00436-014-3857-1.
- Kuhn KG, Campbell-Lendrum DH & Davies CR (2002) A continental risk map for malaria mosquito (Diptera: Culicidae) vectors in Europe. *J Med Entomol* 39: 621-630.
- Kušpilić G & Precali R (2007) Biološka kakvoća prijelaznih voda - klasifikacija prijelaznih voda (ekološki status) WEC1e, Vol. 2014: Institut za oceanografiju i ribarstvo, Centar za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković.
- Linton YM (2004) Systematics of the Holarctic *Maculipennis* complex: The 70th Annual Meeting of the American Mosquito Control Association (ed., Savannah, Georgia).
- Linton YM, Harbach RE, Seng CM, Anthony TG & Matusop A (2001) Morphological and molecular identity of *Anopheles* (*Cellia*) *sundaicus* (Diptera: Culicidae), the nominotypical member of a malaria vector species complex in Southeast Asia. *Syst. Entomol.* 26: 357.
- Linton YM, Lee A & Curtis C (2005) Discovery of a third member of the *Maculipennis* Group in SW England. *Euro Mosq Bull* 19: 5 - 9.
- Linton YM, Samanidou-Voyadjoglou A & Harbach RE (2002a) Ribosomal ITS2 sequence data for *Anopheles maculipennis* and *An. messeae* in northern Greece, with a critical assessment of previously published sequences. *Insect Mol Biol* 11: 379 - 383.
- Linton YM, Smith L & Harbach RE (2002b) Observations on the taxonomic status of *Anopheles subalpinus* Hackett & Lewis and *An. melanoon* Hackett. *European Mosquito Bulletin* 13.

- Linton YM, Smith L, Koliopoulos G, Samanidou-Voyadjoglou A, Zounos AK & Harbach RE (2003) Morphological and molecular characterization of *Anopheles* (*Anopheles*) *maculipennis* Meigen, type species of the genus and nominotypical member of the *Maculipennis* Complex. *Systematic Entomology* 28: 39-56. doi:10.1046/j.1365-3113.2003.00198.x.
- Linton YM, Smith L, Koliopoulos G, Zounos AK, Samanidou-Voyadjoglou A, Patsoula A & Harbach RE (2007) The *Anopheles* (*Anopheles*) *maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) in Greece. *Journal of Natural History* 41: 26832699. doi:10.1080/00222930701403255.
- Malafrente R, Marrelli M & Marinotti O (1999) Analysis of ITS2 DNA sequences from Brazilian *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 36: 631.
- Manonmani A, Townson H, Adeniran T, Jambulingam P, Sahu S & Vijayakumar T (2001) rDNA-ITS2 polymerase chain reaction assay for the sibling species of *Anopheles fluviatilis*. *Acta Trop.* 78: 3.
- Marinucci M, Romi R, Mancini P, Luca MD & Severini C (1999) Phylogenetic relationships of seven palearctic members of the *maculipennis* complex inferred from ITS2 sequence analysis. *Insect Mol Biol* 8: 469-480. doi:10.1046/j.1365-2583.1999.00140.x.
- Martens W, Niessen L, Rotmans J, Jetten T & McMichael A (1995) Potential impact of global climate change on malaria risk. *Environ Health Perspect* 103: 458 - 464.
- McMichael A (2003) Global climate change: will it affect vector-borne infectious diseases? *Intern Med J* 33: 554 - 555.
- McMichael AJ, Woodruff RE & Hales S (2006) Climate change and human health: present and future risks. *Lancet* 367: 859-869. doi:10.1016/S0140-6736(06)68079-3.
- Merdić E (1990) Anophelinae mosquitoes (Diptera Culicidae) in Osijek and its surroundings (Yugoslavia). *Acta Veterinaria (Beograd)* 40: 8.
- Merdić E & Boca I (2004) Seasonal dynamics of the *Anopheles maculipennis* complex in Osijek, Croatia. *J Vector Ecol* 29: 257-263.
- Merdić E, Sudarić M, Lovaković T, Boca I & Merdić S (2004) Checklist of mosquitoes (Diptera: Culicidae) of Croatia. *European Mosquito Bulletin* 17: 6.
- Merget B, Koetschan C, Hackl T, Forster F, Dandekar T, Muller T, Schultz J & Wolf M (2012) The ITS2 Database. *J Vis Exp.* doi:10.3791/3806.
- Morgulis A, Coulouris G, Raytselis Y, Madden TL, Agarwala R & Schaffer AA (2008) Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics* 24: 1757-1764. doi:10.1093/bioinformatics/btn322.
- Nicolescu G, Linton YM, Vladimirescu A, Howard TM & Harbach RE (2004) Mosquitoes of the *Anopheles maculipennis* group (Diptera: Culicidae) in Romania, with the discovery and formal recognition of a new species based on molecular and morphological evidence. *Bull Entomol Res* 94: 525-535.
- Nomenclature ICoZ (1999) International Code of Zoological Nomenclature. The International Trust for Zoological Nomenclature.
- Novikov Y & Vaulin O (2014) Expansion of *Anopheles maculipennis* s.s. (Diptera: Culicidae) to northeastern Europe and northwestern Asia: Causes and Consequences. *Parasit Vectors* 7: 389.
- Parmesan C, Ryrholm N, Stefanescu C, Hill JK, Thomas CD, Descimon H, Huntley B, Kaila L, Kullberg J, Tammaru T, Tennent WJ, Thomas JA & Warren M (1999) Poleward shifts in geographical ranges of butterfly species associated with regional warming. *Nature* 399: 579-583. doi:http://www.nature.com/nature/journal/v399/n6736/suppinfo/399579a0_S1.html.
- Patsoula E, Samanidou-Voyadjoglou A, Spanakos G, Kremastinou J, Nasioulas G & Vakalis NC (2007) Molecular characterization of the *Anopheles maculipennis* complex during

- surveillance for the 2004 Olympic Games in Athens. *Med Vet Entomol* 21: 36-43.
doi:10.1111/j.1365-2915.2007.00669.x.
- Pejchar L & Mooney HA (2009) Invasive species, ecosystem services and human well-being. *Trends in Ecology & Evolution* 24: 497-504.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2009.03.016>.
- Poncon N, Toty C, L'Ambert G, Le Goff G, Brengues C, Schaffner F & Fontenille D (2007) Biology and dynamics of potential malaria vectors in Southern France. *Malar J* 6: 18.
- Postiglione M, Tabanili S & Ramsdale CD (1973) The Anopheles of Turkey. *Riv. Parassit.* 34: 33.
- Proft J, Maier W & Kampen H (1999) Identification of six sibling species of the Anopheles maculipennis complex (Diptera: Culicidae) by a polymerase chain reaction assay. *Parasitol Res* 85: 837 - 843.
- Ramsdale CD & Coluzzi M (1975) Studies on the infectivity of tropical African strains of Plasmodium falciparum to some southern European vectors of malaria. *Parassitologia* 17: 39-48.
- Ramsdale CD & Snow K (2000) Distribution of genus Anopheles in Europe. *JEMCA (EMB)* 7: 1 - 26.
- Reeves WC, Hardy JL, Reisen WK & Milby MM (1994) Potential Effect of Global Warming on Mosquito-Borne Arboviruses. *J Med Entomol* 31: 323-332.
- Reid JA & Knight KL (1961) Classification within the subgenus Anopheles (Diptera, Culicidae). *Ann Trop Med Parasitol* 55: 474-488.
- Reiter P (2008) Global warming and malaria: knowing the horse before hitching the cart. *Malar J* 7: S3.
- Romanović M (2007) Struktura zajednica komaraca u različitim tipovima staništa na području Dalmacije: Doktorska disertacija (ed. Prirodoslovno matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, p. 159.
- Romi R, Boccolini D, Menegon M & Rezza G (2012) Probable autochthonous introduced malaria cases in Italy in 2009-2011 and the risk of local vector-borne transmission. *Euro Surveill* 17.
- Romi R, Sabatinelli G & Majori G (2001) Could malaria reappear in Italy? *Emerg Infect Dis* 7: 915-919. doi:10.3201/eid0706.010601.
- Sawadipanich Y, Baimai V & Harrison BA (1990) Anopheles dirus species E: chromosomal and crossing evidence for another member of the dirus complex. 6: 477-481.
- Schaffner F, Angel G, Geoffroy B, Hervy J & Rhaïem A (2001) The mosquitoes of Europe (CD ROM): IRD Edition and EID Méditerranée, Montpellier, France.
- Schultz J, Maisel S, Gerlach D, Muller T & Wolf M (2005) A common core of secondary structure of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) throughout the Eukaryota. *RNA* 11: 361-364. doi:10.1261/rna.7204505.
- Sedaghat MM, Howard, T. , Harbach, R. E (2009) Morphological study and description of Anopheles (Anopheles) persiensis, a member of the Maculipennis Group (Diptera: Culicidae: Anophelinae) in Iran.
- Simsek FM, Ulger C, Akiner MM, Tuncay SS, Kiremit F & Bardakci F (2011) Molecular identification and distribution of Anopheles maculipennis complex in the Mediterranean region of Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology* 39: 258-265.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2011.08.010>.
- Singh OP, Chandra D, Nanda N, Sharma SK, Htun PT, Adak T, Subbarao SK & Dash AP (2006) On the conspecificity of Anopheles fluviatilis species S with Anopheles minimus species C. *J Biosci* 31: 671-677.
- Singh OP, Nanda N, Dev V, Bali P, Sohail M, Mehrunnisa A, Adak T & Dash AP (2010) Molecular evidence of misidentification of Anopheles minimus as Anopheles

- fluviatilis in Assam (India). *Acta Tropica* 113: 241-244.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.11.002>.
- Sinka M, Bangs M, Manguin S, Coetzee M, Mbogo C, Hemingway J, Patil A, Temperley W, Gething P, Kabaria C, Okara R, Van Boeckel T, Godfray HC, Harbach R & Hay S (2010a) The dominant Anopheles vectors of human malaria in Africa, Europe and the Middle East: occurrence data, distribution maps and bionomic precis. *Parasit Vectors* 3: 117.
- Sinka M, Rubio-Palis Y, Manguin S, Patil A, Temperley W, Gething P, Van Boeckel T, Kabaria C, Harbach R & Hay S (2010b) The dominant Anopheles vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic precis. *Parasit Vectors* 3: 72.
- Stegnij VN (1982) Genetic adaptation and speciation in sibling species of the Eurasian maculipennis complex: Recent developments in the genetics of insect disease vectors (ed., pp. 454-464.
- Takken W, Geene R, Adam W, Jetten TH & van der Velden JA (2002) Distribution and dynamics of larval populations of *Anopheles messeae* and *A. atroparvus* in the delta of the rivers Rhine and Meuse, The Netherlands. *Ambio* 31: 212-218.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M & Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*.
doi:10.1093/molbev/msr121.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A & Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*.
doi:10.1093/molbev/mst197.
- Theobald FV (1901) A monograph of the Culicidae, or mosquitoes. Longmans & Co.
- Vatandoost H, Ashraf H, Lak SH, Mahdi RE, Abai MR & Nazari M (2003) Factors involved in the re-emergence of malaria in borderline of Iran, Armenia, Azerbaijan and Turkey. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 34 Suppl 2: 6-14.
- Vaulin O & Novikov Y (2010) Geographical variability of ITS2 rDNA and COI mtDNA and the cryptic species of mosquito *Anopheles messeae* Fall. (Diptera: Culicidae). *Inform Vestn VOGiS* 14: 546 - 557.
- Vicente J, Sousa C, Alten B, Caglar S, Falcuta E, Latorre J, Toty C, Barre H, Demirci B, Di Luca M, Toma L, Alves R, Salgueiro P, Silva T, Barges M, Mas-Coma S, Boccolini D, Romi R, Nicolescu G, do Rosario V, Ozer N, Fontenille D & Pinto J (2011) Genetic and phenotypic variation of the malaria vector *Anopheles atroparvus* in southern Europe. *Malar J* 10: 5.
- Vignjević G, Vručina I, Šestak I, Turić N, Bogojević MS & Merdić E (2013) Equine seroprevalence rates as an additional indicator for a more accurate risk assessment of the West Nile virus transmission. *Coll Antropol* 37: 949-956.
- Weitzel T, Gauch C & Becker N (2012) Identification of *Anopheles daciae* in Germany through ITS2 sequencing. *Parasitol Res* 111: 2431-2438. doi:10.1007/s00436-012-3102-8.
- White GB (1977) The place of morphological studies in the investigation of *Anopheles* species complexes. *Mosquito Systematics* 9: 16.
- White GB (1978) Systematic Reappraisal of the *Anopheles maculipennis* Complex. *Mosquito Systematics* 10: 32.
- WHO WHO (2013) World Malaria Report 2013.
- Wilkerson RC, Reinert JF & Li C (2004) Ribosomal DNA ITS2 Sequences Differentiate Six Species in the *Anopheles crucians* Complex (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 41: 392-401. doi:10.1603/0022-2585-41.3.392.

- Wolf M, Achtziger M, Schultz J, Dandekar T & Muller T (2005) Homology modeling revealed more than 20,000 rRNA internal transcribed spacer 2 (ITS2) secondary structures. *RNA* 11: 1616-1623. doi:10.1261/rna.2144205.
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L & Miller W (2000) A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* 7: 203-214. doi:10.1089/10665270050081478.
- Žitko T & Merdić E (2006) *Culex laticinctus* Edwards, a mosquito species new to the Croatian fauna. *European Mosquito Bulletin* 21.

8. ŽIVOTOPIS

Goran Vignjević

Hrvatskih branitelja 10

32221 Nuštar

e-pošta: goran@biologija.unios.hr

mob.: 098 270760

Goran Vignjević rođen je 9. kolovoza 1979. godine u Sarajevu. Nakon završenog srednjoškolskog obrazovanja upisuje studij biologije i kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Na istom je i diplomirao 2007. godine na temu „Brojnost mikronukleusa u hemocitima Slikarske lisanke (*Unio pictorum*) kao pokazatelj genotoksičnog učinka onečišćenja kopnenih voda“ pod vodstvom prof.dr.sc. Gorana Klobučara, te stekao zvanje profesora biologije i kemije.

Od 2007. godine zaposlen je na Odjelu za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku kao vanjski suradnik, a od 2008. godine kao asistent. Sudjeluje u izvođenju nastave iz kolegija Opća zoologija, Izrada bioloških zbirki i izbornom kolegiju Entomologija.

Poslijediplomski sveučilišni interdisciplinarni znanstveni studij Zaštita prirode i okoliša koji zajednički organiziraju i izvode Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i Institut Ruđer Bošković, Zagreb pristupnik je upisao u akademskoj 2008./2009. godini. Kao član "Službe za monitoring i istraživanje komaraca", odnosno "Službe za nadzor i istraživanje komaraca" čiji je voditelj prof. dr. sc. Enrih Merdić, sudjeluje u znanstveno-istraživačkom radu na nekoliko projekata.

Autor i koautor je pet znanstvenih radova objavljenih u časopisima citiranih u Current Contents bazi, te tri znanstvena rada u drugim časopisima. Na dolje navedenim kongresima i seminarima aktivno je sudjelovao s ukupno dvanaest priopćenja:

Radovi u znanstvenim časopisima citiranih u bazi Current Contents:

1. **Vignjević, Goran**; Vručina, Ivana; Šestak, Ivana; Turić, Nataša; Sudarić Bogojević, Mirta; Merdić, Enrih.

Equine Seroprevalence Rates as an Additional Indicator for a More Accurate Risk Assessment of the West Nile Virus Transmission. // Collegium antropologicum. 37 (2013) , 3; 949-956 (članak, znanstveni).

2. Merdić, Enrih; Perić, Ljiljana; Pandak, Nenad; Kurolt, Ivan Christian; Turić, Nataša; **Vignjević, Goran**; Štolfa, Ivna; Milas, Josip; Sudarić Bogojević, Mirta; Markotić, Alemka. West Nile virus outbreak in humans in Croatia, 2012. // Collegium antropologicum. 37 (2013), 3; 943-947 (članak, znanstveni).

3. Turić, Nataša; Merdić, Enrih; Hackenberger, Branimir K.; Jeličić, Željka; **Vignjević, Goran**; Csabai, Zoltán.

Structure of aquatic assemblages of Coleoptera and Heteroptera in relation to habitat type and flood dynamic structure. // Aquatic insects. 34 (2012) , S1; 189-205 (članak, znanstveni).

4. Štambuk, Anamaria; Pavlica, Mirjana; **Vignjević, Goran**; Bolarić, Bruna; Klobučar, Göran Igor Vinko.

Assessment of genotoxicity in polluted freshwaters using caged painter' s mussel, *Unio pictorum*. // Ecotoxicology (London). 18 (2009) , 4; 430-439 (članak, znanstveni).

5. Hesson, J.C.; Rettich, F.; Merdić, Enrih; **Vignjević, Goran**; Östman, Ö.; Schäfer, M.; Schaffner, F.; Foussadier, R.; Besnard, G.; Medlock, J.; Scholte, E.-J.; Lundström, J.O.

The arbovirus vector *Culex torrentium* is more prevalent than *Culex pipiens* in northern and central Europe. // Medical and veterinary entomology. (2013) (prihvaćen za objavljivanje).

Radovi u znanstvenim časopisima s međunarodnom recenzijom

1. **Vignjević, Goran**; Zahirović, Željko; Turić, Nataša; Merdić, Enrih.

Moths (Lepidoptera: Heterocera) of Kopački rit Nature park - results of preliminary research.

// Entomologia Croatica. 14 (2010) , 3-4; 17-32 (članak, znanstveni).

2. Jeličić, Željka; Vujić, Ante; **Vignjević, Goran**; Merdić, Enrih.

Hoverflies (Diptera: Syrphidae) of Kopački rit Nature park, NE Croatia. // Entomologia

Croatica. 14 (2010) , 3-4; 7-16 (članak, ostalo).

3. Merdić, Enrih; **Vignjević, Goran**; Turić, Nataša; Sudarić Bogojević, Mirta; Milas, Josip; Vručina, Ivana; Zahirović, Željko.

Mosquito survey during West Nile virus outbreak 2012 in Northeast Croatia. // Collegium antropologicum. (2013).

Sažeci u zbornicima skupova

1. Turić, Nataša; **Vignjević, Goran**; Temunović, Martina; Vručina, Ivana; Merdić, Enrih.

Usporedba metoda uzorkovanja, brojnosti i populacijske dinamike vrste *Graphoderus*

bilineatus De Geer, 1774 (Coleoptera, Dytiscidae) u Parku prirode Kopački rit tijekom 2010. i 2011. godine // .

(predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

2. Merdić, Enrih; **Vignjević, Goran**; Vručina, Ivana; Hackenberger Kutuzović, Branimir; Sudarić Bogojević, Mirta; Jeličić Marinković, Željka; Zahirović, Željko; Turić, Nataša.

Prostorno vremenska analiza disperzije tri najbrojnije vrste komaraca u Osijeku tijekom 2010. godine // 11. Hrvatski biološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem: zbornik sažetaka /

Jelaska, Sven D. ; Klobučar, Göran I.V. ; Šerić Jelaska, Lucija ; Leljak Levanić , Dunja ; Lukša, Žaklin (ur.).

Zagreb : Hrvatsko biološko društvo 1885, 2012. 63-64 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

3. **Vignjević, Goran**; Jeličić Marinković, Željka; K. Hackenberger, Branimir; Turić, Nataša; Vručina, Ivana; Marinković, Dušan; Merdić, Enrih.

Area of maximum efficiencies of different attractant (1-octen-3-ol, ammonium, acetone, L-lactic acid and dry ice) in forest habitat // (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

4. Turić, Nataša; Lalić, Želimir; Jeličić, Željka; **Vignjević, Goran**; Temunović, Martina; Merdić, Enrih; Csabai, Zoltán.

The predation potential of *Laccophilus poecilus* (Coleoptera: Adephaga) on mosquito larvae *Culex pipiens* // (poster, međunarodna recenzija, sažetak).

5. Merdić, Enrih; **Vignjević, Goran**; Vručina, Ivana; Sudarić Bogojević, Mirta; Jeličić Marinković Željka; Zahirović, Željko; Žitko, Toni; Landeka, Nediljko; Klobučar Ana.

Aedes albopictus - invasive mosquito species in Croatia // SIEEC 22 Symposium

Internationale Entomofaunisticum Europae Centralis XXII / Barić, B, Hrašovec, B., Kučinić, M., Mičetić Stanković, V., Prevšić, A. (ur.). Varaždin, 2011. 38-39 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

6. Temunović, Martina; Turić, Nataša; Lugić, Edin; **Vignjević, Goran**; Merdić, Enrih; Csabai Zoltan.

Distribution of *Graphoderus bilineatus* (De Geer, 1774) in Croatia – first results // SIEEC 22 Symposium Internationale Entomofaunisticum Europae Centralis XXII / Barić, Božena ; Hrašovec, Boris ; Kučinić, Mladen ; Mičetić Stanković, Vlatka, Previšić, Ana (ur.). Varaždin, 2011. 65-66 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

7. Jeličić, Željka; Hackenberger Kutuzović, Branimir; **Vignjević, Goran**; Merdić, Enrih.

Maximum range of different attractant (1-octen-3-ol, ammonium, acetone, and L-lactic acid) dispersion in forest // Abstracts of the 17th European Society for Vector Ecology Conference / Rydzanicz, Katarzyna ; Lonc, Elzbieta (ur.). Wrocław, 2010. 160-160 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

8. Jeličić, Željka; Sudarić Bogojević, Mirta; **Vignjević, Goran**; Merdić, Enrih.

Mosquito community structure on different habitats in Nature Park Kopački rit, Croatia // Proceedings of the 5th international congress of vector ecology, Society of Vector Ecology / Caglar, Selim Sualp ; Alten, Bulent ; Ozer, Nurdan (ur.). Ankara : RITM Ajans, 2009. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

9. Jeličić, Željka; **Vignjević, Goran**; Sudarić Bogojević, Mirta; Merdić, Enrih.

Comparison of adult mosquito community structure over a wet and dry season in Vukovar-srijem County, eastern Croatia // The 5th European Mosquito Control Association workshop - Conference programme & abstract book / Talbalaghi, Asghar ; Orefuwa, Emma ; Millins, Cherie (ur.). Torino, 2009. 185-185 (poster, međunarodna recenzija, sažetak).

10. Jeličić, Željka; Vujić, Ante; **Vignjević, Goran**; Merdić, Enrih.

Šest novih vrsta osolikih muha (Diptera: Syrphidae) za faunu Hrvatske iz Kopačkoga rita // Zbornik sažetaka ; 10. hrvatski biološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem, 14.-20. rujna 2009., Osijek / Besendorfer, Višnja ; Kopjar, Nevenka ; Vidaković-Cifrek, Željka ; Tkalec, Mirta ; Bauer, Nataša ; Lukša, Žaklin (ur.). Zagreb : Hrvatsko biološko društvo 1885, 2009. (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).

11. Merdić, Enrih; Turić, Nataša; **Vignjević, Goran**; Žitko, Toni; Benić, Nikola; Klobučar, Ana; Krajcar, Darko; Šarunić-Gulan, Jagoda; Mumelaš, Neven; Landeka, Nediljko; Šuperak, Antun.

Istraživanje vrste *Aedes albopictus* u jadranskim županijama tijekom 2011, 2012. (rad u zborniku skupova s recenzijom).

12. **Vignjević, Goran**; Zahirović, Željko; Merdić, Enrih. Noćni leptiri (Lepidoptera, Heterocera) Kopačkoga rita // 10. Hrvatski biološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem, 14.-20. rujna 2009., Osijek / Besendorfer, Višnja ; Kopjar, Nevenka ; Vidaković-Cifrek, Željka ; Tkalec, Mirta ; Bauer, Nataša ; Lukša, Žaklin (ur.). Zagreb : Hrvatsko biološko društvo 1885, 2009. (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).