Interreg
Slovenija – Hrvatska
CarEx

“DNA Metabarcoding” metoda za ocenjevanje biodiverzitete nevretenčarjev na travnikih

Metoda „DNA metabarkodiranja“ za procjenu bioraznolikosti beskralježnjaka na travnjacima



Avgust/Kolovoz 2026

Avtorji / Autori: [1]dr. Stanković David, [1]Sara Strah, [1] dr. Matjaž Bedjanič, [2] dr. Martina Šašić, [2]Damjan Milošević, [1]dr. Davorin Tome

[1]Nacionalni inštitut za biologijo, Večna pot 121, Ljubljana
[2]Hrvatski prirodoslovni muzej, Demetrova 1, Zagreb

Fotografije: Davorin Tome

Na naslovnici: Navadna srparica (*Phaneroptera falcata*)

Prevod/prijevod: dr. Martina Podnar, Damjan Milošević

Citiranje:

Stanković, D., Strah, S., Bedjanič, M., Šašić, M., Miloševič D., Tome, D. 2026: "DNA Metabarcoding« metoda za ocenjevanje biodiverzitete nevretenčarjev na travnikih. Poročilo projekta CAREX.

Poročilo (D.1.2.1) je rezultat raziskovanja biodiverzitete in je nastalo v sklopu projekta „CarEx – v skrbi za suhe travnike varujemo biodiverziteto, v okviru Programa Slovenija – Hrvaška 2021-2027. / Izvješće (D.1.2.1) rezultati istraživanja bioraznolikosti i je nastalo u sklopu projekta „CarEx – Brigom o suhim travnjacima čuvamo bioraznolikost" koji se provodi kroz Interreg Program Slovenija – Hrvatska 2021. – 2027

"Projekt je sofinanciran iz sredstev Europskog sklada za regionalni razvoj v okviru Interreg programa Slovenija-Hrvaška / Projekt je sufinanciran sredstvima Europskog fonda za regionalni razvoj u okviru Interreg programa Slovenija-Hrvatska "

Vsebina / Sadržaj

Uvod / Uvod 4
Material in metode / Material i metode 5
Rezultati in diskusija / Rezultati i diskusija 11
Zaključki / Zaključci 20
Literatura / Literatura 21

Uvod / Uvod

Ekstenzivna travišča sodijo med vrstno najbogatejše polnaravne habitate in imajo pomembno vlogo pri ohranjanju biotske raznovrstnosti (Tonn et al. 2021). Zanje so značilne raznolike rastlinske združbe, ki zagotavljajo življenjski prostor in pomemben vir hrane številnim skupinam organizmov, med drugim tudi zelo raznolikim združbam členonožcev. Členonožci predstavljajo pomemben sestavni del travniških ekosistemov, saj sodelujejo pri opraševanju, razgradnji organske snovi in kroženju hranil ter so pomemben vir hrane za številne vretenčarje. Spremembe v rabi in načinu upravljanja travišč zato ne vplivajo le na rastlinsko sestavo, temveč lahko pomembno spremenijo tudi celotno prehranjevalno mrežo (Shaffers et al. 2008). Tradicionalno spremljanje biodiverzitete temelji predvsem na morfološki določitvi osebkov nekaterih karizmatičnih travniških skupin, kot so metulji, kobilice, opraševalci .... Samo določanje vrst iz izbranih skupin je časovno zahtevno ter pogosto zahteva visoko stopnjo taksonomskega znanja. Poleg tega s klasičnim pristopom v analizo ne zajamemo številnih drugih živalskih skupin, pri katerih niti ni strokovnjakov za določanje. Molekularne metode, zlasti DNA metabarkodiranje, predstavljajo obetaven pristop za hitro in celovito karakterizacijo združb iz kompleksnih vzorcev (Taberlet et al. 2012). Omogočajo hkratno zaznavanje velikega števila taksonov ter spremljanje sprememb v sestavi združb skozi čas, zato so lahko pomembno orodje pri ocenjevanju vplivov različnih načinov upravljanja travišč. V projektu **CarEx** (Care for Extensive Grasslands), ki poteka v okviru programa Interreg Slovenija–Hrvaška, smo v letih 2024 in 2025 testirali uporabo metode DNA metabarkodiranja za preučevanje biodiverzitete travnikov, na območju Kozjanskega regijskega parka v Sloveniji in Naravnega parka Žumberak – Samoborsko gorje na Hrvaškem. Členonožce na travnikih smo v vsaki sezoni vzorčili štirikrat, od junija	Ekstenzivni travnjaci spadaju među vrstama najbogatija poluprirodna staništa i imaju važnu ulogu u očuvanju bioraznolikosti (Tonn et al. 2021). Za njih su karakteristične raznolike biljne zajednice koje pružaju životni prostor i važan izvor hrane brojnim skupinama organizama, uključujući i vrlo raznolike zajednice člankonožaca. Člankonošci predstavljaju važnu komponentu travnjačkih ekosustava jer sudjeluju u oprašivanju, razgradnji organske tvari i kruženju hranjivih tvari te su važan izvor hrane za mnoge kralježnjake. Promjene u korištenju i načinu upravljanja travnjacima stoga ne utječu samo na sastav biljaka, već mogu značajno promijeniti i cijelu hranidbenu mrežu (Shaffers et al. 2008). Tradicionalno praćenje (monitoring) bioraznolikosti temelji se prvenstveno na morfološkoj determinaciji jedinki pojedinih karizmatičnih travnjačkih skupina, kao što su leptiri, ravnokrilci (skakavci i zrikavci), oprašivači... Sam postupak determinacije vrsta iz odabranih skupina dugotrajan je i često zahtijeva visoku razinu taksonomskog znanja. Osim toga, klasičnim pristupom u analizu ne uključujemo brojne druge životinjske skupine za koje često uopće nema stručnjaka za determinaciju. Molekularne metode, posebno DNA metabarkodiranje, predstavljaju obećavajući pristup za brzu i sveobuhvatnu karakterizaciju zajednica iz kompleksnih uzoraka (Taberlet et al. 2012). One omogućuju istovremeno otkrivanje velikog broja taksona te praćenje promjena u sastavu zajednica kroz vrijeme, zbog čega mogu biti važan alat pri procjeni utjecaja različitih načina upravljanja travnjacima. U projektu CarEx (Care for Extensive Grasslands), koji se provodi u sklopu programa Interreg Slovenija–Hrvatska, tijekom 2024. i 2025. godine testirali smo primjenu metode DNA metabarkodiranja za proučavanje bioraznolikosti travnjaka na području Kozjanskog regionalnog parka u Sloveniji i Parka prirode Žumberak – Samoborsko gorje u Hrvatskoj. Uzorkovanje

do oktobra, s standardiziranim vzorčenjem z entomološko mrežo. V tem poročilu predstavljamo preliminarne rezultate raziskave ter ocenjujemo uporabnost DNA metabarkodiranja za ugotavljanje biodiverzitete travnikov. Rezultati predstavljajo osnovo za nadaljnje vrednotenje molekularnih metod kot podpornega orodja pri spremljanju biotske raznovrstnosti in načrtovanju naravovarstveno ustreznega upravljanja ekstenzivnih travišč.	člankonožaca na travnjacima s različitim režimom košnje provođeno je četiri puta u svakoj sezoni, od lipnja do listopada, standardiziranom metodom uzorkovanja entomološkom mrežom. U ovom izvješću prikazujemo preliminarne rezultate istraživanja te procjenjujemo primjenjivost DNA metabarkodiranja u utvrđivanju bioraznolikosti travnjaka. Rezultati predstavljaju temelj za daljnje vrednovanje molekularnih metoda kao potpornog alata u praćenju biotske raznovrsnosti i planiranju prirodi prihvatljivog upravljanja ekstenzivnim travnjacima.

Material in metode / Material i metode

Na območju Vetrnika v Kozjanskem parku in na območju Gračac Slavetički v Naravnem parku Žumberak – Samoborsko gorje smo določili 7 vzorčnih površin. Poimenovali smo jih: (Kozjansko) Test, Intenzivna, Oslica vrh, Oslica dolina, Harfa, KP travnik: (Žumberak) Gračac Slavetički. Na površinah smo z entomološko mrežo vzorčili dve leti, 2 do 4 krat na leto, od konca maja do začetka oktobra v skladu z metodo, ki jo opisujejo Šašić in sod (2024). Na različnih površinah smo vzeli različno število vzorcev. Za analizo smo vse vzorce iz posameznih površin združili ne glede na datum vzorčenja in ugotavljali biodiverziteto.	Na području Vetrnika u Kozjanskom parku i na području Gračaca Slavetićkog u Parku prirode Žumberak – Samoborsko gorje odredili smo 7 pokusnih ploha. Nazvali smo ih: (Kozjansko) Test, Intenzivna, Oslica vrh, Oslica dolina, Harfa, KP travnik; (Žumberak) Gračac Slavetički. Na plohama smo entomološkom mrežom uzorkovali dvije godine, 2 do 4 puta godišnje, od kraja svibnja do početka listopada u skladu s metodom koju opisuju Šašić i sur. (2024). Na različitim plohama uzeli smo različit broj uzoraka. Za analizu smo sve uzorke s pojedinih ploha udružili bez obzira na datum uzorkovanja te utvrđivali bioraznolikost.



Slika 1. Primer travnika »Oslica vrh« (zgoraj v juniju ob prvem vzorčenju, spodaj v oktobru ob zadnjem vzorčenju v sezoni)

Slika 1. Primjer travnjaka „Oslica vrh” (gore u lipnju prilikom prvog uzorkovanja, dolje u listopadu prilikom zadnjeg uzorkovanja u sezoni)



Slika 2: Primer travnika »Test« na Kozjanskem.

Slika 2: Primjer travnjaka “Test” na Kozjanskom

Podroben opis metode vzorčenja z entomološko mrežo je objavljen na: https://www.nib.si/projektinib?view=project&id=486 Vse vzorce smo takoj po zajetju fiksirali s 96% ne denaturiranem alkoholom v razmerju 1/3 vzorca in 2/3 alkohola. Do laboratorijske analize so bili spravljeni v hladilniku. Skupaj smo nabrali 88 vzorcev, ki smo jih združili v sedem vzorčnih površin (Tabela 1).	Detaljan opis metode uzorkovanja entomološkom mrežicom objavljen je na: https://www.nib.si/projektinib?view=project&id=486 Svi uzorci su odmah nakon uzimanja fiksirani 96% nedenaturiranim alkoholom u omjeru 1/3 uzorka i 2/3 alkohola te su do laboratorijske analize čuvani u hladnjaku. Ukupno smo prikupili 88 uzoraka koje smo udružili u sedam pokusnih ploha (Tablica 1).



Slika 3: Vzorci so bili do laboratorijske obdelave shranjeni v hladilniku

Slika 3: Uzorci su do laboratorijske obrade bili pohranjeni u hladnjaku.

Tabela 1. Vzorčne površine in število vzorcev (najzgodnejši in najpoznejši datum sta glede na sezono, neodvisno od leta vzorčenja).

Tablica 1. Pokusne plohe i broj uzoraka (najraniji i najkasniji datum navedeni su s obzirom na sezonu, neovisno o godini uzorkovanja).

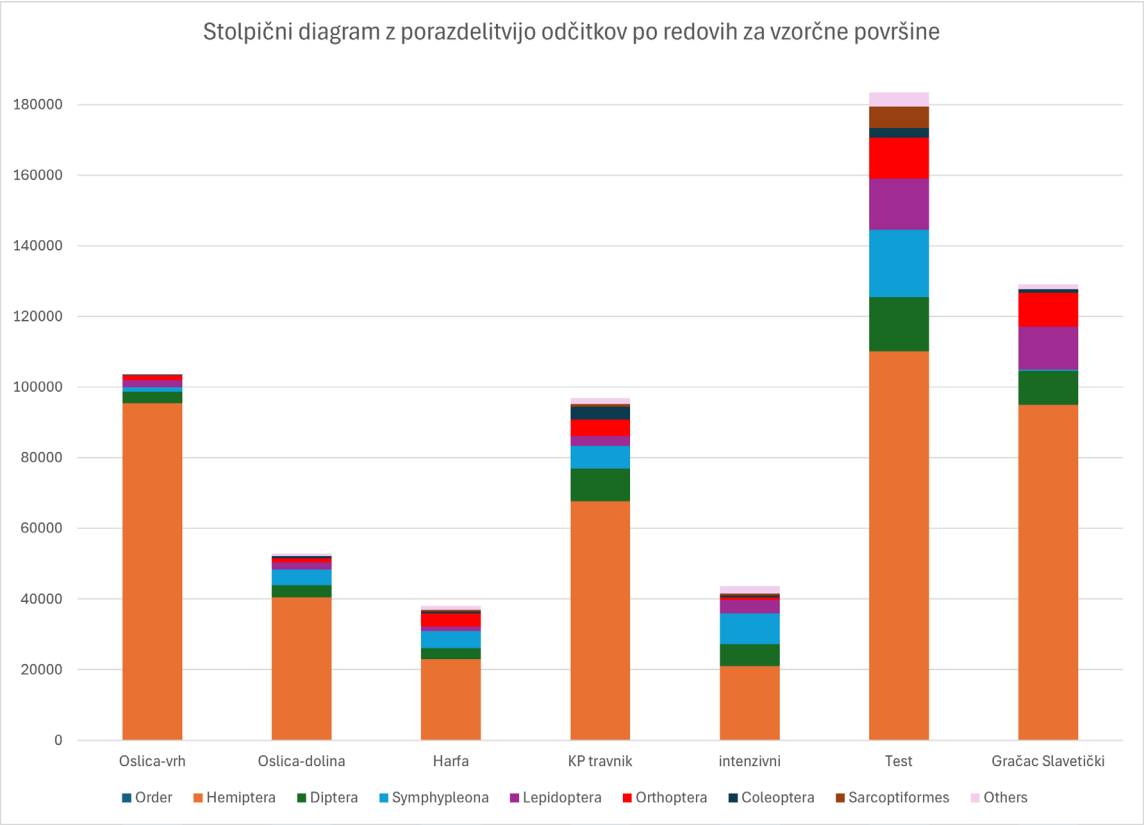
Vzorčna površina / uzorčna ploha	vzorcev / uzoraka	let vzorčenja / godina uzorkovanja	najzgodnejši datum / najraniji datum	najpoznejši datum / najkasniji datum
Oslica-vrh	6	2	18.6.2025	1.10.2024
Oslica-dolina	6	2	18.6.2025	1.10.2024
Harfa	5	2	18.6.2025	1.10.2024
KP travnik	7	2	18.6.2025	1.10.2024
Intenzivni	8	2	14.6.2024	1.10.2024
Test	32	2	14.6.2024	1.10.2024
Gračac Slavetički	24	2	20.5.2025	15.10.2024

Posebna pozornost je bila namenjena razvoju in optimizaciji molekularnega pristopa, ki bi omogočal ohranitev vzorcev za nadaljnje morfološke analize. Za nesortirane skupinske vzorce členonožcev smo zato uvedli in optimizirali blag, nedestruktiven postopek lize in izolacije DNA (Stanković, 2025). Podroben opis metode laboratorijskega dela je objavljen na: https://www.nib.si/projektinib?view=project&id=486. Za DNA metabarkodiranje smo ciljali 456 baznih parov dolg odsek mitohondrijskega gena za citokrom c oksidazo podenoto I (COI), ki smo ga pomnožili z oligonukleotidnima začetnikoma NoPlant_F_270 in Fol-degen-red (Krehenwinkel in sod., 2022). Uporabljeni začetni oligonukleotidi so zasnovani tako, da zmanjšujejo pomnoževanje rastlinske DNA, hkrati pa omogočajo široko zajetje različnih skupin členonožcev. Pridobljene knjižnice DNA smo sekvencirali z metodo paired-end z nizko globino sekvenciranja na platformi Illumina. Parne odčitki sekvenciranja smo združili in jih filtrirali po kvaliteti v programskem okolju QIIME 2 (Bolyen in sod., 2019). Bioinformatska obdelava je vključevala še odstranjevanje domnevnih pseudogenov v programskem orodju MetaWorks (Porter in sod., 2022). Unikatne sekvence smo nadalje filtrirali za morebitne kontaminante (človeška DNK, DNK rastlin, DNK gliv) z uporabo spletnega programa BLAST+ (Cmacho in sod., 2009) in jih z orodjem V-search (Rognes in sod., 2016) združevali v operativne taksonomske enote (OTU=Operational Taxonomic Unit) ob upoštevanju 97% praga podobnosti. Enote so najboljši bioinformatski približek vrst. Te smo v portalu BOLD (Ratnsingham in sod., 2024) določili do najnižjega zanesljivega nivoja. Diverziteta vzorčnih površin smo ocenili v orodju MEGAN7 (Huson in sod., 2016) in z R knjižnjico iNEXT (Hsieh in sod., 2016). Alfa diverziteto smo kvantificirali na podlagi dveh Hillovih števil (; Chao in sod., 1987; Chao in sod, 2014): q = 0 (število taksonov), q = 1(Shannonov indeks diverzitete) in q = 2 (Simpsonov indeks diverzitete). Ocene raznolikosti in pripadajoči 95-odstotni	Posebna pažnja posvećena je razvoju i optimizaciji molekularnog pristupa koji bi omogućio očuvanje uzoraka za daljnje morfološke analize. Za nerazvrstane skupne uzorke člankonožaca stoga smo uveli i optimizirali blagi, nedestruktivni postupak lize i izolacije DNA (Stanković, 2025). Detaljan opis metode laboratorijskog rada objavljen je na https://www.nib.si/projektinib?view=project&id=486. Za DNA metabarkodiranje ciljali smo fragment mitohondrijskog gena za podjedinicu I citokrom c oksidaze (COI), duljine 456 parova baza, koji smo umnožili pomoću oligonukleotidnih početnica (klica) NoPlant_F_270 i Fol-degen-red (Krehenwinkel i sur., 2022). Korištene oligonukleotidne početnice dizajnirane su tako da smanjuju umnožavanje biljne DNA, a istovremeno omogućuju širok obuhvat različitih skupina člankonožaca. Dobivene knjižnice DNA sekvencirali smo metodom uparenih krajeva (paired-end) s niskom dubinom sekvenciranja na platformi Illumina. Uparena očitanja sekvenciranja povezali smo i filtrirali prema kvaliteti u programskom okruženju QIIME 2 (Bolyen i sur., 2019). Bioinformatička obrada uključivala je i uklanjanje pretpostavljenih pseudogena u programskom alatu MetaWorks (Porter i sur., 2022). Jedinstvene sekvence dalje smo filtrirali radi uklanjanja eventualnih kontaminanata (ljudska DNA, DNA biljaka, DNA gljiva) pomoću mrežnog programa BLAST+ (Camacho i sur., 2009) te smo ih alatom V-search (Rognes i sur., 2016) grupirali u operativne taksonomske jedinice (OTU = Operational Taxonomic Unit) uz primjenu praga sličnosti od 97%. Ove jedinice predstavljaju najbolju bioinformatičku aproksimaciju vrsta. Njih smo na portalu BOLD (Ratnasingham i sur., 2024) determinirali do najniže pouzdane razine. Raznolikost pokusnih ploha procijenili smo u alatu MEGAN7 (Huson i sur., 2016) i pomoću R paketa iNEXT (Hsieh i sur., 2016). Alfa raznolikost kvantificirali smo na temelju triju Hillovih brojeva (Chao i sur., 1987; Chao i sur., 2014): q = 0 (broj taksona), q = 1 (Shannonov indeks raznolikosti) i q = 2

intervali zaupanja so bili izračunani z ekstrapolacijo krivulj vzorčenja na podlagi velikosti vzorca ter z ocenjevanjem asimptot (Chao in sod. 2014). Za prikaz beta diverzitete smo v programu MEGAN7 uporabili metodo Neighbor-Net (Bryant in Moulton, 2004) in rezultate prikazali v obliki filogenetskega obrisa (Bağcı in sod., 2021). Za izračun alfa in beta diverzitete smo upoštevali le nivo rodu, pred izračunom beta diverzitete smo podatke normalizirali s Hellingerjevo transformacijo (Legender in Gallanger, 2001). Po laboratorijski obdelavi vzorcev za metabarkodiranje, smo vse vzorce iz Kozjanskega parka, ki so bili nabrani v letu 2024 (N=26) predali strokovnjaku za taksonomijo skupine Ortoptera v Sloveniji, da je določil taksone po klasični metodi - po morfoloških znakih. Za določanje vrste je bila uporabljena naslednja literatura: Bellmann in sod. (2019), Gomboc & Šegula (2014), Harz (1975), Iorio in sod. (2019), Us (1992) & Wöss in sod. (2025). S tem smo preizkušali našo predpostavko, da je tudi po obdelavi za metabarkodiranje z nedestruktivnim postopkom lize za ekstrakcijo DNA še vedno možno morfološko določanje osebkov. Hkrati smo rezultate uporabili tudi za primerjavo obeh metod določanja taksonov. Rezultate morfološkega določanja in določanje po metodi metabarkodiranja predstavljamo glede na ujemanje taksonov. Kot ujemanje smo označili taksone, ki so bili določeni do iste vrste po obeh metodah, kakor tudi, če je bil po eni metodi takson določen do vrste po drugi pa do rodu kateremu vrsta pripada. Ločeno smo primerjali taksone, ki so bili določeni le do višjih taksonomskih enot. Kot nepopolno ujemanje smo opredelili taksone, ki so bili v vzorcih odkriti po eni metodi, po drugi metodi pa so bili odkriti na istem območju a v drugem obdobju (leta 2025), kar kaže, da je bil takson na območju prisoten, metoda pa ga je potrdila le, če smo v analizo vključili povečan obseg vzorcev.	(Simpsonov indeks raznolikosti). Procjene raznolikosti i pripadajući 95-postotni intervali pouzdanosti izračunati su ekstrapolacijom krivulja uzorkovanja na temelju veličine uzorka te procjenom asimptota (Chao i sur., 2014). Za prikaz beta raznolikosti u programu MEGAN7 koristili smo metodu Neighbor-Net (Bryant i Moulton, 2004), a rezultate smo prikazali u obliku filogenetske mreže (Bağcı i sur., 2021). Za izračun alfa i beta raznolikosti uzeli smo u obzir samo razinu roda, a prije izračuna beta raznolikosti podatke smo normalizirali Hellingerovom transformacijom (Legendre i Gallagher, 2001). Nakon laboratorijske obrade uzoraka za metabarkodiranje, sve uzorke iz Kozjanskog parka koji su prikupljeni 2024. godine (N = 26) predali smo stručnjaku za taksonomiju skupine Orthoptera u Sloveniji kako bi determinirao taksone klasičnom metodom – prema morfološkim obilježjima. Za determinaciju vrsta korištena je sljedeća literatura: Bellmann i sur. (2019), Gomboc & Šegula (2014), Harz (1975), Iorio i sur. (2019), Us (1992) & Wöss i sur. (2025). Time smo testirali našu pretpostavku da je i nakon obrade za metabarkodiranje, uz korištenje nedestruktivnog postupka lize za ekstrakciju DNA, i dalje moguća morfološka determinacija jedinki. Istovremeno smo rezultate iskoristili i za usporedbu obiju metoda determinacije taksona. Rezultate morfološke determinacije i determinacije metodom metabarkodiranja prikazujemo s obzirom na podudaranje taksona. Kao podudaranje označili smo taksone koji su objema metodama determinirani kao ista vrste, kao i slučajeve u kojima je jednom metodom takson determiniran do razine vrste, a drugom do razine roda kojemu ta vrsta pripada. Zasebno smo usporedili taksone koji su determinirani samo do viših taksonomskih jedinica. Kao nepotpuno podudaranje definirali smo taksone koji su u uzorcima otkriveni jednom metodom, dok su drugom metodom otkriveni na istom području, ali u drugom razdoblju (2025. godine), što ukazuje na to da je takson bio prisutan na tom području, a metoda ga je potvrdila tek kada smo u analizu uključili veći opseg uzoraka.

Rezultati in diskusija / Rezultati i diskusija

Sekvenciranje je bilo uspešno za 81 vzorcev, za katere smo po filtriranju ohranili 661516 odčitkov, v povprečju oz. 8167 odčitkov po vzorcu (Tabela 3). Skupno smo 897 OTU določili do 416 vrst ali rodov, dodatnih 171 OTU pa do 56 poddružin ali družin. Med vzorci so bili daleč najštevilčnejši predstavniki reda Hemiptera z 376 897 odčitki, sledili so Diptera z 48 919 odčitki, Symphypleona - (Collembola) z 44 909 odčitki, Lepidoptera z 38 245 odčitki, Orthoptera z 33 329 odčitki, Coleoptera z 8 099 odčitki in Sarcoptiformes (Acariformes) z 8 040 odčitki (Slika 4). Ta vrstni red se je ohranjal tudi v posameznih vzorčnih površinah z nekaj manjšimi odstopanji. Pri vzorčni površini Test, kjer smo 470 OTU določili do 133 vrst ali rodov členonožcev, dodatnih 90 OTU pa do 32 poddružin ali družin, je bil vrstni red na primer Hemiptera, Symphypleona (Collembola), Diptera, Lepidoptera, Orthoptera, Sarcoptiformes (Acariformes) in Coleoptera medtem ko je bil pri vzorčni površini Gračac Slavetički, kjer smo 329 OTU določili do 123 vrst ali rodov členonožcev, dodatnih 90 OTU pa do 15 poddružin ali družin, vrstni red Hemiptera, Lepidoptera, Diptera, Orthoptera in Coleoptera predstavnikov Symphypleona (Collembola) in Sarcoptiformes (Acariformes) pa smo zaznali zelo malo.	Sekvenciranje je bilo uspješno za 81 uzorak, za koje smo nakon filtriranja zadržali 661.516 očitanja, odnosno u prosjeku 8.167 očitanja po uzorku (Tablica 3). Ukupno smo 897 OTU-a determinirali do 416 vrsta ili rodova, a dodatnih 171 OTU do 56 potporodica ili porodica. Među uzorcima su uvjerljivo najbrojniji bili predstavnici reda Hemiptera s 376.897 očitanja, a slijedili su Diptera s 48.919 očitanja, Symphypleona (Collembola) s 44.909 očitanja, Lepidoptera s 38.245 očitanja, Orthoptera s 33.329 očitanja, Coleoptera s 8.099 očitanja i Sarcoptiformes (Acariformes) s 8.040 očitanja (Slika 4). Ovaj se redoslijed zadržao i na pojedinim pokusnim plohama, uz nekoliko manjih odstupanja. Na pokusnoj plohi Test, gdje smo 470 OTU-a determinirali do 133 vrste ili roda člankonožaca, a dodatnih 90 OTU do 32 potporodice ili porodice, redoslijed je, primjerice, bio Hemiptera, Symphypleona (Collembola), Diptera, Lepidoptera, Orthoptera, Sarcoptiformes (Acariformes) i Coleoptera. S druge strane, na pokusnoj plohi Gračac Slavetički, gdje smo 329 OTU-a determinirali do 123 vrste ili roda člankonožaca, a dodatnih 90 OTU do 15 potporodica ili porodica, redoslijed je bio Hemiptera, Lepidoptera, Diptera, Orthoptera i Coleoptera, dok smo predstavnike skupina Symphypleona (Collembola) i Sarcoptiformes (Acariformes) zabilježili u vrlo malom broju.



Slika 4. Stolpčni diagram, ki prikazuje porazdelitev odčitkov izbranih skupin žuželk po vzorčnih površinah.

Slika 4. Stupčasti dijagram koji prikazuje raspodjelu očitanja odabranih grupa Insekta za pokusne plohe.

Tabela 2. Š Število odčitkov po filtriranju, število odčitkov, katerim smo določili taksonomijo vsaj do nivoja družine, število OTU, število določenih taksonov vsaj do nivoja družine na vzorčno mesto in število zaznanih rodov.

Tablica 2. Broj očitanja nakon filtriranja, broj očitanja kojima je determinirana taksonomija barem do razine porodice, broj OTU-a, broj determiniranih taksona barem do razine porodice po pokusnoj plohi i broj zabilježenih rodova.

Vzorčna površina / uzorčna ploha	Št. Odčitkov / broj očitanja	Št. določenih odčitkov / broj determiniranih očitaka	Št. OUT / broj OTU	Št. Taksonov / broj taksona	Št. Rodov / broj rodova
Oslica-vrh	25561	23699	152	139	112
Oslica-dolina	59447	52899	199	181	136
Harfa	46464	38054	229	192	151
KP travnik	108487	96888	257	230	179
Intenzivni	49642	43610	237	203	151

Test	245284	183464	470	365	284
Gračac Slavetički	163485	129447	329	160	124

Tabela 3. Število odčitkov po filtriranju, število odčitkov, katerim smo določili taksonomijo vsaj do nivoja družine, število OTU in število določenih taksonov vsaj do nivoja družine na vzorčno mesto. Vzorci, ki so bili sekvencirani dva-krat (ponovitve) so označeni s črko »p«.

Tablica 3. Broj očitanja nakon filtriranja, broj očitanja kojima je determinirana taksonomija barem do razine porodice, broj OTU-a i broj determiniranih taksona barem do razine porodice po pokusnoj plohi. Uzorci koji su sekvencirani dvaput (replike) označeni su slovom „p".

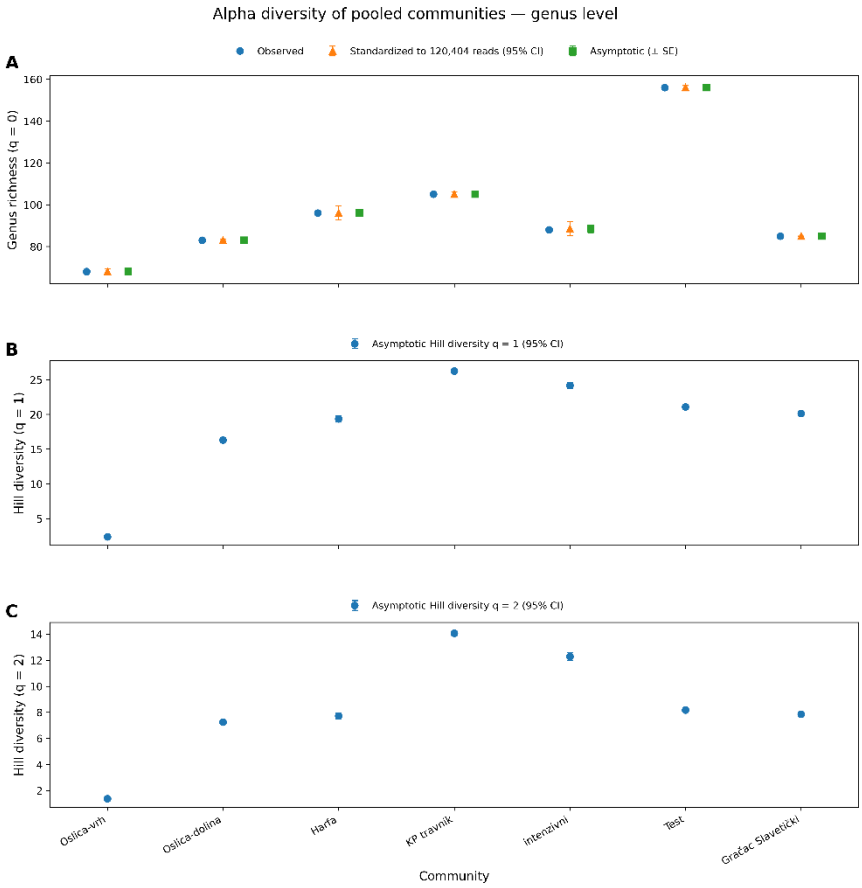
Vzorčna površina / uzorčna ploha	**Datum vzorčenja / datum uzorkivanja**	**Oznaka vzorca / oznaka uzorka**	**Št. odčitkov / broj očitanja**	**Št. določenih odčitkov / broj determiniranih očitka**	**Št. OUT / broj OUT**	**Št. Taksonov / broj taksona**
Oslica-vrh	21.06.2024	Cx_25_8	1414	1405	15	10
Oslica-vrh	30.07.2024	Cx_25_26	3984	3680	57	34
Oslica-vrh	01.10.2024	Cx_25_20	5509	4714	72	42
Oslica-vrh	18.06.2025	Cx_25_37	5560	5405	57	39
Oslica-vrh	03.07.2025	Cx_25_49	6190	5871	88	58
Oslica-vrh	30.07.2025	Cx_25_58	2904	2624	44	26
Oslica-dolina	21.06.2024	Cx_25_14	6093	5859	64	44
Oslica-dolina	21.06.2024	Cx_25_14p	22651	21026	157	84
Oslica-dolina	30.07.2024	Cx_25_34	8702	8201	78	50
Oslica-dolina	01.10.2024	Cx_25_24	7610	5166	107	63
Oslica-dolina	18.06.2025	Cx_25_43	2336	2197	35	23
Oslica-dolina	03.07.2025	Cx_25_46	924	713	42	27
Oslica-dolina	30.07.2025	Cx_25_59	11131	9737	134	72
Harfa	21.06.2024	Cx_25_27	7362	6478	100	56
Harfa	30.07.2024	Cx_25_33	1808	1077	48	31
Harfa	30.07.2024	Cx_25_33p	2765	1546	65	43
Harfa	01.10.2024	Cx_25_25	21506	16539	236	108
Harfa	18.06.2025	Cx_25_36	8686	8505	98	63
Harfa	03.07.2025	Cx_25_44	4337	3909	78	47
KP travnik	30.07.2024	Cx_25_31	12360	11717	101	53
KP travnik	30.07.2024	Cx_25_32	4817	3691	81	46
KP travnik	01.10.2024	Cx_25_21	1697	1251	38	24
KP travnik	01.10.2024	Cx_25_22	32197	29110	243	115
KP travnik	01.10.2024	Cx_25_22p	28121	25635	224	113
KP travnik	18.06.2025	Cx_25_35	13435	12785	120	74
KP travnik	03.07.2025	Cx_25_47	15860	12699	165	61
Intenzivni	21.06.2024	Cx_25_28	4059	3980	57	32
Intenzivni	30.07.2024	Cx_25_29	4652	4417	58	32
Intenzivni	01.10.2024	Cx_25_17	4395	3552	76	45
Intenzivni	18.06.2025	Cx_25_42	1273	1159	42	24
Intenzivni	03.07.2025	Cx_25_45	11790	10606	117	70
Intenzivni	30.07.2025	Cx_25_57	10226	8516	158	86

Vzorčna površina / uzorčna ploha	Datum vzorčenja / datum uzorkivanja	Oznaka vzorca / oznaka uzorka	Št. odčitkov / broj očitanja	Št. določenih odčitkov / broj determiniranih očitka	Št. OUT / broj OUT	Št. Taksonov / broj taksona
Intenzivni	30.07.2025	Cx_25_57p	9184	7808	146	83
Intenzivni	08.09.2025	Cx_25_64	4063	3572	94	61
Test	14.06.2024	Cx_25_1	2744	2432	45	27
Test	14.06.2024	Cx_25_13	15532	14111	186	98
Test	14.06.2024	Cx_25_4	1321	1234	25	16
Test	14.06.2024	Cx_25_5	20811	18232	123	51
Test	14.06.2024	Cx_25_5p	15814	13726	111	52
Test	21.06.2024	Cx_25_15	3154	2617	73	43
Test	21.06.2024	Cx_25_30	14712	11081	122	49
Test	30.07.2024	Cx_25_2	4275	3335	53	29
Test	30.07.2024	Cx_25_3	12163	9123	131	57
Test	30.07.2024	Cx_25_6	1121	1087	26	20
Test	30.07.2024	Cx_25_7	4488	3719	71	41
Test	01.10.2024	Cx_25_16	3236	1921	46	22
Test	01.10.2024	Cx_25_18	1822	721	46	30
Test	01.10.2024	Cx_25_19	25758	13832	196	50
Test	01.10.2024	Cx_25_23	2330	980	46	25
Test	18.06.2025	Cx_25_38	10549	9620	135	70
Test	18.06.2025	Cx_25_39	5803	5339	68	35
Test	18.06.2025	Cx_25_40	4269	3979	72	47
Test	18.06.2025	Cx_25_40p	541	497	28	21
Test	18.06.2025	Cx_25_41	3398	3060	54	36
Test	03.07.2025	Cx_25_48	5086	2991	86	44
Test	03.07.2025	Cx_25_48p	801	529	29	16
Test	03.07.2025	Cx_25_50	3778	3339	58	32
Test	03.07.2025	Cx_25_51	12700	11083	125	80
Test	03.07.2025	Cx_25_52	6752	5617	79	51
Test	30.07.2025	Cx_25_53	6364	3223	87	45
Test	30.07.2025	Cx_25_54	4765	3329	85	38
Test	30.07.2025	Cx_25_55	735	540	22	14
Test	30.07.2025	Cx_25_56	10426	7002	132	55
Test	08.09.2025	Cx_25_60	7834	5663	106	56
Test	08.09.2025	Cx_25_61	22242	11493	235	77
Test	08.09.2025	Cx_25_62	5424	4785	99	48
Test	08.09.2025	Cx_25_63	4536	3224	83	40
Gračac Slavetički	20.06.2024	A1	3573	3420	9	7
Gračac Slavetički	20.06.2024	A2	2936	2614	8	7
Gračac Slavetički	20.06.2024	A3	1361	1262	5	4
Gračac Slavetički	20.06.2024	A4	6055	6050	19	18
Gračac Slavetički	7.08.2024	B1	12376	12022	21	11
Gračac Slavetički	7.08.2024	B2	6146	5620	16	9
Gračac Slavetički	7.08.2024	B3	8129	6875	35	26
Gračac Slavetički	7.08.2024	B4	14599	11883	45	35

Vzorčna površina / uzorčna ploha	Datum vzorčenja / datum uzorkivanja	Oznaka vzorca / oznaka uzorka	Št. odčitkov / broj očitanja	Št. določenih odčitkov / broj determiniranih očitka	Št. OUT / broj OUT	Št. Taksonov / broj taksona
Gračac Slavetički	15.10.2024	C1	4345	2382	25	15
Gračac Slavetički	15.10.2024	C2	4245	2588	20	12
Gračac Slavetički	15.10.2024	C3	2125	1862	7	5
Gračac Slavetički	15.10.2024	C4	23492	5359	55	18
Gračac Slavetički	20.05.2025	GS1	7454	7454	9	7
Gračac Slavetički	20.05.2025	GS2	12076	11896	24	14
Gračac Slavetički	20.05.2025	GS3	6954	6834	13	6
Gračac Slavetički	20.05.2025	GS3p	4713	4658	13	7
Gračac Slavetički	20.05.2025	GS4	7063	6948	14	11
Gračac Slavetički	7.08.2025	GS5	18584	15938	38	29
Gračac Slavetički	7.08.2025	GS6	3880	3836	17	15
Gračac Slavetički	7.08.2025	GS7	8413	7489	25	22
Gračac Slavetički	7.08.2025	GS8	4966	2456	27	19

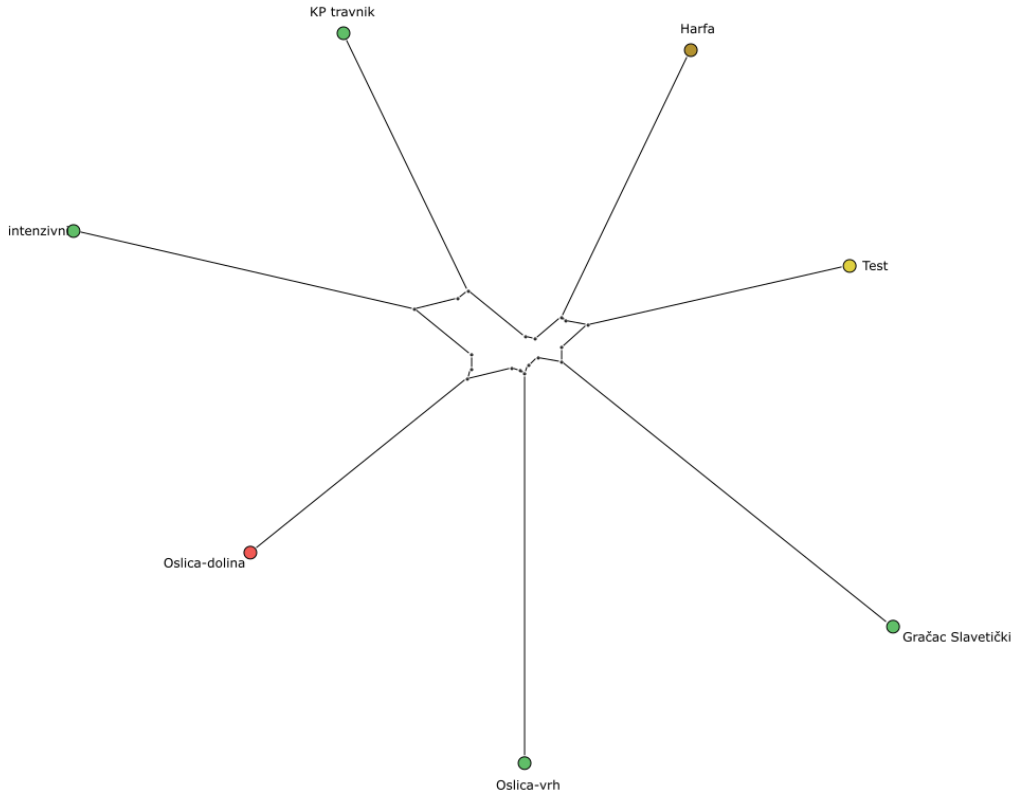
Število rodov (q = 0) je bilo v vzorčni površini Test največje (284), kar je morda posledica največjega števila vzorcev za to površino. Po drugi strani je število rodov iz območja Gračac Slavetički, ki je imel drugo največje število vzorcev, drugo najnižje. Možno, da je bilo v materialu iz te vzorčne površine veliko nedoločenih taksonomskih enot, saj je bilo število dololčenih odčitkov in število OTU drugo najvišje. Ob upoštevanju preostalih dveh Hillovih števil so bile med površinam bistveno nižje razlike od števila rodov. Asimptotske ocene vrstnega bogastva in prikaz alfa diverzitete na podlagi Ginijevega–Simpsonovega indeksa niso pokazale bistvenih razlik med vzorčnimi površinami (Slika 5). Površina z intenzivnim travnikom (»Intenzivni«) ni imela najnižjih vrednosti, ki kažejo na velikost biodiverzitete. Površina se je nahajala v neposredni bližini površine »Test«, tako da je možna ocena biodiverzitete posledica migracije nevretenčarjev iz površine »Test« na površino »Intenzivni«. Beta diverziteta prikazana v obliki filogenetskega obrisa za vzorčne ploskve (Slika 6) razkrije zvezdasto strukturo med posameznimi vzorčnimi mesti, kar potrjuje, da gre za geografsko ločena vzorčna mesta. V obrisu sta si blizu območji Test in Gračac	Broj rodova (q = 0) bio je najveći na pokusnoj plohi Test (284), što je možda posljedica najvećeg broja uzoraka s te plohe. S druge strane, broj rodova s područja Gračac Slavetički, koje je imalo drugi najveći broj uzoraka, bio je drugi najniži. Moguće je da je u materijalu s te pokusne plohe bilo mnogo nedeterminiranih taksonomskih jedinica, budući da je broj determiniranih očitanja i broj OTU-a bio drugi po visini. Uzimajući u obzir preostala dva Hillova broja, razlike među plohama bile su znatno manje nego u slučaju broja rodova. Asimptotske procjene bogatstva vrsta i prikaz alfa diverziteta na temelju Gini–Simpsonovog indeksa nisu pokazali značajne razlike među pokusnim plohama (Slika 5). Ploha s intenzivnim travnjakom („Intenzivna”) nije imala najniže vrijednosti koje ukazuju na razinu bioraznolikosti. Ta se ploha nalazila u neposrednoj blizini plohe „Test”, stoga je moguća procjena bioraznolikosti posljedica migracije beskralježnjaka s plohe „Test” na plohu „Intenzivna”. Beta raznolikost prikazana u obliku filogenetske mreže za pokusne plohe (Slika 6) otkriva zvjezdastu strukturu između pojedinih pokusnih ploha, što potvrđuje da je riječ o geografski odvojenim lokalitetima. U mreži su bliske plohe Test i Gračac Slavetički, što

Slavetički, kar je lahko posledica tega, da je na teh dveh lokacijah bilo največ vzorčenj.	može biti posljedica činjenice da je na tim dvama lokalitetima proveden najveći broj uzorkovanja.



Slika 5: Alfa diverziteta za vse vzorčne ploskve, A prikazuje ocenjeno število rodov, B vrednosti Shannonovega indeksa diverzitete in C Simpsonovega indeksa diverzitete.

Slika 5. Alfa raznolikost za sve pokusne plohe: A prikazuje procijenjeni broj rodova, B vrijednosti Shannonovog indeksa raznolikosti i C Simpsonovog indeksa raznolikosti.



Slika 6. Prikaz beta diverzitete s filogenetskim obrisom.

Slika 6. Prikaz beta raznolikosti filogenetskom mrežom.

Primerjava metod	**Usporedba metoda**
Po besedah strokovnjaka taksonoma, so bile kobilice (Orthoptera) v vzorcih, ki so bili najprej obdelani za določanje po metodi metabarkodiranja, dobro ohranjene in primerne za morfološko določanje. Barve primerkov kobilic so nekoliko zbledele, kar pa je splošna težava vzorcev, ki so fiksirani v alkoholu. Pri morfološkem določanju je bilo iz vzorcev iz Kozjanskega nabranih leta 2024 določenih 27 taksonov, od tega 23 do vrste in 4 do rodu. Določitev do nivoja rodu je bila uporabljena v primeru ličink v vzorcih, pri katerih zanesljiva določitev po tej metodi ni možna. Po metodi metabarkodiranja je bilo	Prema riječima stručnjaka taksonoma, ravnokrilci (Orthoptera) u uzorcima koji su najprije bili obrađeni za determinaciju metodom metabarkodiranja bili su dobro očuvani i prikladni za morfološku determinaciju. Boje jedinki ravnokrilaca donekle su izblijedjele, što je općeniti problem s uzorcima fiksiranima u alkoholu. Morfološkom determinacijom iz uzoraka prikupljenih 2024. godine na području Kozjanskog utvrđeno je 27 taksona, od čega 23 do razine vrste i 4 do razine roda. Determinacija do razine roda primijenjena je u slučaju ličinki u uzorcima, kod kojih

določenih 23 taksonov od tega 16 vrst in 7 rodov iz skupine Ortoptera (Tabela 4). Po obeh metodah skupaj je bilo zabeleženih 34 nižjih taksonov (vrsta ali rod). Morfološko sta bili določeni še dve višji taksonomski skupini (Tettigonidae in Acrididae), po metodi metabarkodiranja so bile določene tri višje taksonomske skupine, poleg že omenjenih dveh še Gomphocerinae. V kolikor vzamemo za izhodišče stanja na območju 31 nižjih taksonov odkriti po obeh metodah skupaj v vzorcih iz dveh let, je bilo z morfološko metodo potrjenih okoli 80% taksonov, z metodo metabarkodiranja pa okoli 70%. Popolno ujemanje (takson je bil odkrit po obeh metodah) je bilo pri 11 taksonih (okoli 40%). V kolikor vzamemo za izhodišče stanja na območju 24 taksonov določenih po morfološki metodi, je bilo z metodo metabarkodiranja popolno ujemanje pri 10 taksonih (okoli 40%), skupaj z nepopolnim ujemanjem pa 19 taksonov (okoli 70% morfološko potrjene favne Ortoptera).	pouzdana determinacija ovom metodom nije moguća. Metodom metabarkodiranja determinirana su 23 taksona, od čega 16 vrsta i 7 rodova iz skupine Orthoptera (Tablica 4). Obje metode zajedno zabilježile su 34 niža taksona (vrsta ili rod). Morfološki su determinirane još dvije više taksonomske skupine (Tettigoniidae i Acrididae), dok su metodom metabarkodiranja determinirane tri više taksonomske skupine – uz već spomenute dvije, još i Gomphocerinae. Ako kao polazište stanja na području uzmemo 31 niži takson otkriven objema metodama zajedno u uzorcima iz dviju godina, morfološkom metodom potvrđeno je oko 80% taksona, a metodom metabarkodiranja oko 70%. Potpuno podudaranje (takson je otkriven objema metodama) zabilježeno je kod 11 taksona (oko 40%). Ako kao polazište stanja na području uzmemo 24 taksona determinirana morfološkom metodom, metodom metabarkodiranja ostvareno je potpuno podudaranje kod 10 taksona (oko 40%), a zajedno s nepotpunim podudaranjem kod 19 taksona (oko 70% morfološki potvrđene faune Orthoptera).

Tabela 4. Ortoptera v vzorcih nabranih v Kozjanskem parku v letu 2024. »Morfološko« – determinacija vrst narejena klasično, po morfološki metodi; »Metabarkodiranje« – determinacija vrst narejena po sodobini metodi metabarkodiranja. Vzorcev = število vzorcev v katerih je bil takson odkrit (od skupaj 26 pregledanih vzorcev). Krepko natisnjene vrste in rodovi so zelo verjetno isti takson. »*« vrsta ni znana za Slovenijo

Tablica 4. Orthoptera u uzorcima prikupljenim u Kozjanskom parku u 2024. godini. »Morfološki« – determinacija vrsta provedena klasično, morfološkom metodom; »Metabarkodiranje« – determinacija vrsta provedena suvremenom metodom metabarkodiranja. Uzoraka = broj uzoraka u kojima je takson otkriven (od ukupno 26 pregledanih uzoraka). Podebljano otisnute vrste i rodovi vrlo su vjerojatno isti takson. »*« vrsta nije poznata za Sloveniju.

	Morfološko			Metabarkodiranje
vzorcev			vzorcev	
2	*Chorthippus biguttulus*		0	*Chorthippus sp.*
6	*Chorthippus brunneus*		10	*Chorthippus brunneus*
12	*Chorthippus dorsatus*		15	*Chorthippus dorsatus*
1	*Chorthippus mollis*			
1	*Decticus verrucivorus*		0	*Decticus verrucivorus*
5	*Euchorthippus declivus*		6	*Euchorthippus sp.*
3	*Euthystira brachyptera*		0	*Euthystira brachyptera*
3	*Gryllus campestris*		3	*Gryllus campestris*
2	*Isophya modestior*			
2	*Micropodisma salamandra*		0	*Micropodisma salamandra*
2	*Oedipoda coerulescens*		0	*Oedipoda caerulescens*
2	*Omocestus rufipes*		1	*Omocestus sp.*
1	*Pachytrachis gracilis*		2	*Pachytrachis sp.*
1	***Phaneroptera falcata***		1	*Phaneroptera falcata*
1	***Phaneroptera sp.***			
1	*Pholidoptera fallax*		0	*Pholidoptera fallax*
2	*Pholidoptera sp.*			
2	***Platycleis grisea***		5	*Platycleis sp.*
2	***Platycleis sp.***			
2	*Poecilimon ornatus*			
4	*Pseudochorthippus parallelus*		4	*Pseudochorthippus sp.*
2	*Roeseliana roeselii*			
3	*Stenobothrus lineatus*			
2	***Tetrix bipunctata***			
1	***Tetrix undulata / bipunctata***			
7	***Tettigonia viridissima***		6	*Tettigonia viridissima*
6	***Tetrix sp.***			
			0	*Aiolopus strepens*
			0	*Bicolorana bicolor*
			0	*Calliptamus italicus*
			0	*Oecanthus pellucens*
			0	*Ruspolia nitidula*
			1	*Stenobothrus eurasius**
			0	*Ephippiger sp.*

Zaključki / Zaključci

-Metoda priprave biološkega materiala za metabarkodiranje z nedestruktivnim postopkom lize za ekstrakcijo DNK omogoča kasnejšo morfološko analizo. -Ocenjujemo, da je z metodo metabarkodiranja možna določitev med 40 in 70% vseh taksonov, ki bi jih na istem materialu določil taksonom strokovnjak. -Ker je metoda metabarkodiranja in določanja DNK še v fazi razvoja ocenjujemo, da se bo odstotek pravilno določenih taksonov iz leta v leto povečeval, v kolikor bomo sledili napredku v razvoju metod. -V kolikor imamo v raziskavi možnost vključitve dobrega strokovnjaka za določeno taksonomsko skupino nevretenčarjev in v kolikor imamo dovolj časa, da strokovnjak svoje delo opravi, je zaenkrat to še vedno metoda, ki bo dala boljše rezultate. -Ker običajno v raziskavah biodiverzitete nimamo na voljo (vseh) strokovnjakov za posamezne višje taksonomske skupine in ker imamo omejen čas in sredstva, je metoda določanja vrst z metabarkodiranjem lahko edina in dokaj dobra možnost za širok vpogled na stanje biodiverzitete območja. Pri interpretaciji rezultatov pa se moramo zavedati pomanjkljivosti metode. -Če ocenimo, da je netočnost, s katero je nova metoda določala taksonomske enote podobna pri vseh širših skupinah členonožcev lahko ocenimo, da je bilo na travnikih 5 do 10 krat več polkrilcev (Hempiptera – mednje spadajo stenice, škržadki in listne uši) kakor ostalih skupin (kot npr. dvorilci, metulji, hrošči, kobilice, ...) -Eden ključnih problemov pri novi metodi je pomanjkanje referenčnih sekvenčnih podatkov, ki bi omogočili bolj zanesljive določitve.	-Metoda pripreme biološkog materijala za metabarkodiranje nedestruktivnim postupkom lize za ekstrakciju DNK omogućuje kasniju morfološku analizu. -Procjenjujemo da je metodom metabarkodiranja moguće odrediti između 40 i 70% svih taksona koje bi na istom materijalu odredio stručnjak taksonom. -Budući da je metoda metabarkodiranja i određivanja DNK još uvijek u fazi razvoja, procjenjujemo da će se postotak točno određenih taksona iz godine u godinu povećavati ako budemo pratili napredak u razvoju metoda. -Ako u istraživanju imamo mogućnost uključivanja vrsnog stručnjaka za određenu taksonomsku skupinu beskralježnjaka i ako imamo dovoljno vremena da stručnjak obavi svoj posao, to je za sada još uvijek metoda koja će dati bolje rezultate. -Budući da u istraživanjima bioraznolikosti obično nemamo na raspolaganju (sve) stručnjake za pojedine više taksonomske skupine te budući da imamo ograničeno vrijeme i sredstva, metoda određivanja vrsta metabarkodiranjem može biti jedina i prilično dobra mogućnost za širok uvid u stanje bioraznolikosti nekog područja. Međutim, pri interpretaciji rezultata moramo biti svjesni nedostataka ove metode. -Ako procijenimo da je netočnost kojom je nova metoda određivala taksonomske jedinice slična kod svih širih skupina člankonožaca, možemo procijeniti da je na travnjacima bilo 5 do 10 puta više polukrilaca (Hemiptera – u koje spadaju stjenice, cvrčci i lisne uši) nego ostalih skupina (kao što su npr. dvokrilci, leptiri, kornjaši, ravnokrilci/skakavci, ...).

	-Jedan od ključnih problema kod nove metode je nedostatak referentnih sekvenci koje bi omogućile pouzdaniju determinaciju.

Literatura / Literatura

Bağcı C.,Bryant D., Cetinkaya D., Huson D.H. (2021) Microbial phylogenetic context using phylogenetic outlines. Genome Biology and Evolution, 13(9):evab213. doi: 10.1093/gbe/evab213

Bellmann H., Rutschmann F., Roesti C., Hochkirch A. (2019): Der Kosmos Heuschrecken-führer: Die Heuschrecken Mitteleuropas und die wichtigsten Arten Südosteuropas. Franckh-Kosmos Verlags-GmbH & Co. KG, Stuttgart, 430 pp.

Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., et al. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. Nature Biotechnology, 37(8), 852–857.DOI: 10.1038/s41587-019-0209-9

Bryant D., Moulton V. (2004) Neighbor-net: An agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. Molecular Biology and Evolution, 21(2):255–265, 2004. doi: 10.1093/molbev/msh018

Camacho, C. et al. (2009) "BLAST+: architecture and applications." BMC Bioinformatics 10, 421.

Chao, A. (1987) Estimating the Population Size for Capture-Recapture Data with Unequal Catchability. Biometrics 43(4): 783–791. https://doi.org/10.2307/2531532

Chao, A., Gotelli, N.J., Hsieh, T.C., Sander, E.L., Ma, K.H., Colwell, R.K. and Ellison, A.M. (2014), Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: a framework for sampling and estimation in species diversity studies. Ecological Monographs, 84: 45-67. https://doi.org/10.1890/13-0133.1

Gomboc S., Šegula B. (2014): Pojoče kobilice Slovenije: priročnik za določanje pojočih vrst kobilic po napevih in slikah / Singing Orthoptera of Slovenia: manual for identification of singing Orthoptera based on songs and images. EGEA, Zavod za naravo, Ljubljana, 240 pp.

Harz K. (1975): Die Orthopteren Europas II. The Orthoptera of Europe II. In: Series Entomologica, Vol. 11., Dr. W. Junk, The Hague, 939 pp.

Hsieh, T. C., Ma, K. H. in Chao, A. (2016). iNEXT: an R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers). Methods in Ecology and Evolution, 7(12), 1451–1456. doi.org

Huson, D. H., Beier, S., Flade, I., Górska, A., El-Hadidi, M., Mitra, S., Ruscheweyh, H. J., & Tappu, R. (2016). MEGAN Community Edition—Interactive exploration and analysis of large-scale microbiome sequencing data. PLOS Computational Biology, 12(6), e1004957. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004957

Iorio C., Scherini R., Fontana P., Buzzetti F.M., Kleukers R., Odé B., Massa B. (2019): Grasshoppers and crickets of Italy: A photographic field guide to all the species. WBA Handbooks 10: 1-578.

Krehenwinkel, H., Weber, S., Künzel, S., Kennedy, S.R. 2022; The bug in a teacup—monitoring arthropod–plant associations with environmental DNA from dried plant material. Biology Letters 18 (6): 20220091. https://doi.org/10.1098/rsbl.2022.0091

Legendre, P., & Gallagher, E. D. (2001). Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. Oecologia, 129(2), 271–280.

Porter, T. M., & Hajibabaei, M. (2022). MetaWorks: A flexible, scalable bioinformatic pipeline for high-throughput multi-marker biodiversity assessments. PLOS ONE, 17(9), e0274260. doi: 10.1371/journal.pone.0274260

Ratnasingham S, Wei C, Chan D, Agda J, Agda J, Ballesteros-Mejia L, Ait Boutou H, El Bastami Z M, Ma E, Manjunath R, Rea D, Ho C, Telfer A, McKeowan J, Rahulan M, Steinke C, Dorsheimer J, Milton M, Hebert PDN (2024). BOLD v4: A Centralized Bioinformatics Platform for DNA-Based Biodiversity Data. In DNA Barcoding: Methods and Protocols, pp. 403–441. Chapter 26. New York, NY: Springer US, 2024.

Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. (2016) VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. PeerJ 4:e2584. doi: 10.7717/peerj.2584

Schaffers, A.P., Raemakers I.P., Sykora K.V., ter Braak C.J.F. 2008: Arthropod assemblages are best predicted by plant species composition. Ecology, 89(3), 2008, pp. 782–794.

Stanković, D., 2025. Protokol za ne-destruktivno metabarkodiranje DNA vzorcev združb travniških nevretenčarjev je nastal v okviru Interreg Slovenija Hrvaška projekta Carex (delovni paket 2) / Protokol za nedestruktivno metabarkodiranje uzoraka DNA travnjačkih zajednica beskralješnjaka nastao je kao dio Interreg Slovenija Hrvatska projekta CarEx (radni paket 2). Nacionalni inš◆ut za biologijo, Ljubljana. Verzija 1.0, 2025. 33 str.

Šašić, M., D. Tome & M. Bedjanič, 2024. Protokol za zbiranje in shranjevanje travniških nevretenčarjev je nastal v okviru Interreg Slovenija Hrvaška projekta Carex (delovni paket 2) / Protokol za prikupljanje i pohranu travničkih beskralješnika nastao je kao dio Interreg Slovenija Hrvatska projekta CarEx (radni paket 2). Nacionalni inš◆ut za biologijo, Ljubljana & Hrvatski prirodoslovni muzej, Zagreb (v sodelovanju / u suradnji: Kozjanski park, Park prirode Žumberak Samoborsko gorje). Verzija 1.0, 2024. 33 str.

Taberlet P., Coissac E., Pompanon F. 2012: Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. Mol. Ecol., 21, pp. 2045-2050, 10.1111/j.1365-294X.2012.05470.x

Tonn B., Komainda M., Isselstein J. 2021: Results from a biodiversity experiment fail to represent economic performance of semi-natural grasslands. NATURE COMMUNICATIONS | (2021) 12:2125 | https://doi.org/10.1038/s41467-021-22309-7

Us P.A. (1992): Favna ortopteroidnih insektov Slovenije. SAZU, Razred za prirodoslovne vede, 32(12): 1-314.

Wöss, G., L. Liska, M. Sehnal, C. Berg, F. Essl& T. Zuna-Kratky (2025): Kärntens Heuschrecken – Carinthia II - Sonderhefte – Heuschrecken_2025: 1 – 507.

Impressum

Projekt CAREX: V skrbi za suhe travnike pomembne za biotsko pestrost, opredelili bomo ključne parametre za upravljanje z ogroženimi suhimi travišči na dveh zavarovanih območjih: Kozjanski park (v Sloveniji) in Park prirode Žumberak Samoborsko gorje (na Hrvaškem). Cilja sta razviti načine upravljanja s travniki, ki bodo zagotavljali ugodno stanje biodiverzitete in ozaveščanje o pomenu povezovalnih ekoloških koridorjev med zaplatami podobnih ekosistemov.

Projekt CAREX: Brigom o suhim travnjacima čuvamo bioraznolikost, definirat ćemo ključne čimbenike za upravljanje ugroženim suhim travnjacima na dva zaštićena područja: Kozjanski park (u Sloveniji) i Park prirode Žumberak – Samoborsko gorje (u Hrvatskoj). Cilj je razvoj načina upravljanja travnjacima, koji će osigurati povoljno stanje bioraznolikosti i podizanje svijesti o važnosti ekoloških koridora koji povezuju lokalitete sa sličnim ekosustavima.

Trajanje projekta: 01.03. 2024 – 31.08. 2026.

Projektni partnerji: Nacionalni inštitut za biologijo (vodilni partner/*vodeći partner*, Ljubljana, SLO), Kozjanski Park (Podsreda, SLO), Hrvatski prirodoslovni muzej (Zagreb, RH), Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti-Zavod za ornitologiju (Zagreb, RH), Javna ustanova „Park prirode Žumberak – Samoborsko gorje“ (Sošice, RH).

Informacije in stališča, predstavljena v tej publikaciji, so odgovornost avtorjev in projekta CAREX ter ne odražajo nujno uradnega stališča Evropske unije/Programa Interreg Slovenija–Hrvaška. Institucije in organi Evropske unije/Programa Interreg Slovenija–Hrvaška ter nobena oseba, ki deluje v njihovem imenu, ne prevzemajo odgovornosti za uporabo informacij, ki jih publikacija vsebuje.

Informacije i stavovi izneseni u ovoj publikaciji pripadaju autorima i projektu CAREX i ne odražavaju nužno službeno mišljenje Europske unije/Interreg programa Slovenija – Hrvatska. Institucije i tijela Europske unije/Interreg programa SI-HR niti bilo koja osoba koja djeluje u njihovo ime ne mogu se smatrati odgovornima za korištenje informacija sadržanih u njima.

http://www.si-hr.eu/2127/carex/