Interreg
Slovenija – Hrvatska
CarEx

»DNA Metabarcoding« metoda za pomoč pri ugotavljanju vpliva košnje na biodiverziteto travniških nevretenčarjev

Metoda “DNA metabarkodiranja” kao pomoć u utvrđivanju utjecaja košnje na bioraznolikost beskralješnjaka 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: Testne površine / Testne plohe

Prevod: dr. Martina Podnar, Damjan Milošević

Citiranje:

Stanković, D., Strah, S., Bedjanič, M., Sašić, M., Miloševič D., Tome, D. 2026: »DNA Metabarcoding« metoda za pomoč pri ugotavljanju vpliva košnje na biodiverziteto travniških nevretenčarjev. Poročilo projekta CAREX.

Poročilo (D.3.3.1) 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.3.3.1) 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 / Materijal i metode 6
Rezultati in diskusija / Rezultati i diskusija 12
Zaključki / Zaključci 24
Literatura / Literatura 25

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 nevretenčarjev. Nevretenčarji 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). Ekstenzivna travišča so zaradi sprememb rabe tal, intenzifikacije kmetijstva in spreminjanja načinov gospodarjenja vse bolj ogrožena. Košnja je pri vzdrževanju številnih polnaravnih travišč ključnega pomena, saj preprečuje zaraščanje in omogoča ohranjanje značilne travniške vegetacije. Hkrati pa predstavlja pomemben neposreden poseg v življenjske združbe travišč. Čas košnje lahko vpliva na številčnost, vrstno sestavo in sezonsko dinamiko nevretenčarjev, pri čemer so lahko posledice odvisne tudi od razvojne faze posameznih skupin in časa v rastni sezoni. Za učinkovito naravovarstveno upravljanje je zato pomembno razumeti, kako se združbe nevretenčarjev odzivajo na različne režime košnje skozi celotno sezono. Trenutne naravovarstvene rešitve za upravljanje s travišči večinoma temeljijo na učinkih gospodarjenja na posamezne skupine. Rezultati kažejo, da optimalni časi košnje niso enaki za vse (Cattin et al. 2003, Humbert et al. 2012, Farkas st al. 2025), zato različni avtorji predlagajo različne optimalne datume košnje. Zelo malo je raziskav, ki bi proučevale učinek gospodarjenja na biodiverziteto, kot združbo vrst, ki pripadajo različnim skupinam.	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 beskralješnjaka. Beskralješnjaci 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 biljni sastav, već mogu značajno promijeniti i cjelokupnu hranidbenu mrežu (Shaffers et al. 2008). Ekstenzivni travnjaci sve su više ugroženi zbog promjena u korištenju zemljišta, intenziviranja poljoprivrede i promjena u načinima gospodarenja. Košnja je od ključne važnosti za održavanje brojnih poluprirodnih travnjaka jer sprječava zarastanje i omogućuje očuvanje karakteristične travnjačke vegetacije. Istovremeno, ona predstavlja značajan izravan zahvat u životne zajednice travnjaka. Vrijeme košnje može utjecati na brojnost, sastav vrsta i sezonsku dinamiku beskralješnjaka, pri čemu posljedice mogu ovisiti i o razvojnoj fazi pojedinih skupina te o dobu vegetacijske sezone. Za učinkovito upravljanje u svrhu zaštite prirode stoga je važno razumjeti kako zajednice beskralješnjaka reagiraju na različite režime košnje tijekom cijele sezone. Trenutačna rješenja za upravljanje travnjacima u svrhu zaštite prirode uglavnom se temelje na učincima gospodarenja na pojedine skupine. Rezultati pokazuju da optimalna vremena košnje nisu jednaka za sve (Cattin et al. 2003, Humbert et al. 2012, Farkas et al. 2025), zbog čega različiti autori predlažu različite optimalne datume košnje. Vrlo je malo istraživanja koja su proučavala učinak gospodarenja na bioraznolikost kao zajednicu vrsta koje pripadaju različitim skupinama.

Tradicionalno spremljanje nevretenčarjev temelji predvsem na morfološki določitvi osebkov, kar je pri kompleksnih in vrstno bogatih združbah časovno zahtevno ter pogosto zahteva visoko stopnjo taksonomskega znanja. 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 preučevali sezonsko dinamiko združb členonožcev na ekstenzivnih travniščih ter njihov odziv na različne režime košnje. Raziskava je potekala na osmih testnih območjih v Kozjanskem regijskem parku v Sloveniji in Naravnem parku Žumberak – Samoborsko gorje na Hrvaškem. Nevretenčarje smo v vsaki sezoni vzorčili štirikrat, od junija do oktobra, s standardiziranim vzorčenjem z entomološko mrežo – metoda je primerna predvsem za lov členonožcev. Na testnih površinah so bili uporabljeni različni režimi košnje, kar je omogočilo spremljanje sezonskih sprememb v združbah ter primerjavo njihove sestave pred in po košnji v različnih obdobjih sezone. Ena površina v času vzorčenja ni bila pokošena, medtem ko so bile tri druge pokošena pred drugim, tretjim oziroma četrtim vzorčenjem. Za dodatno primerjavo je bilo vključeno tudi intenzivno gospodarjeno travišče. V poročilu predstavljamo preliminarne rezultate raziskave ter ocenjujemo uporabnost DNA metabarkodiranja za spremljanje sezonske dinamike združb členonožcev na travniščih in njihovega odziva na različne režime košnje. Rezultati predstavljajo osnovo za nadaljnje vrednotenje molekularnih metod kot podpornega orodja pri spremljanju biotske raznovrstnosti in načrtovanju naravovarstveno ustreznega upravljanja ekstenzivnih travišč.	Tradicionalno praćenje (monitoring) beskralješnjaka temelji se prvenstveno na morfološkoj determinaciji jedinki, što je kod kompleksnih i vrstama bogatih zajednica vremenski zahtjevno te često zahtijeva visoku razinu taksonomskog znanja. Molekularne metode, posebice DNA metabarkodiranje, predstavljaju obećavajući pristup za brzu i sveobuhvatnu karakterizaciju zajednica iz kompleksnih uzoraka (Taberlet et al. 2012). One omogućuju istodobnu detekciju velikog broja taksona te praćenje promjena u sastavu zajednica kroz vrijeme, zbog čega mogu biti važno oruđe 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 proučavali smo sezonsku dinamiku zajednica člankonožaca na ekstenzivnim travnjacima te njihov odgovor na različite režime košnje. Istraživanje je provedeno na osam testnih područja u Kozjanskom regionalnom parku u Sloveniji i Parku prirode Žumberak – Samoborsko gorje u Hrvatskoj. Uzorkovanje beskralješnjaka provodilo se četiri puta u svakoj sezoni, od lipnja do listopada, standardiziranom metodom uzorkovanja entomološkom mrežom, koja je prvenstveno prikladna za prikupljanje člankonožaca. Na testnim plohama primijenjeni su različiti režimi košnje, što je omogućilo praćenje sezonskih promjena u zajednicama te usporedbu njihova sastava prije i nakon košnje u različitim razdobljima sezone. Jedna ploha tijekom uzorkovanja nije košena, dok su ostale tri pokošene prije drugog, trećeg odnosno četvrtog uzorkovanja. Za dodatnu usporedbu uključen je i intenzivno gospodareni travnjak. U izvješću predstavljamo preliminarne rezultate istraživanja te procjenjujemo primjenjivost DNA metabarkodiranja za praćenje sezonske dinamike zajednica člankonožaca na travnjacima i njihova odgovora na različite režime košnje. Rezultati predstavljaju temelj za daljnje vrednovanje molekularnih metoda kao potpornog alata u monitoringu bioraznolikosti i planiranju upravljanja ekstenzivnim travnjacima na način prihvatljiv za zaštitu prirode.

Material in metode / Materijal i metode

V Kozjanskem parku (območje Vetrnika) in v Naravnem parku Žumberak – Samoborsko gorje (območje Gračac Slavetički) smo s pomočjo osebja obeh parkov izbrali dve cca 1,5 ha veliki površini s tradicionalno ekstenzivnim travnikom. Obe območji smo razdelili na štiri testne površine (Slika 1, 2). Lastnik travnikov je površine kosil po našem načrtu. Na Kozjanskem smo dodatno določili še peto površino, kjer je bila pred leti njiva, sedaj pa je bil intenziven travnik, ki se vzdržuje s košnjo in pašo. Na tej površini je lastnik gospodaril v skladu s svojimi navadami.	U Kozjanskom parku (područje Vetrnika) i u Parku prirode Žumberak – Samoborsko gorje (područje Gračac Slavetički) uz pomoć djelatnika obaju parkova odabrali smo dvije površine veličine oko 1,5 ha s tradicionalnim ekstenzivnim travnjakom. Oba područja podijelili smo na četiri testne plohe (Slika 1, 2). Vlasnik travnjaka kosio je površine prema našem planu. Na Kozjanskom smo dodatno odredili i petu plohu, na kojoj se prije nekoliko godina nalazila njiva, a sada je to intenzivan travnjak koji se održava košnjom i ispašom. Na toj plohi vlasnik je gospodario u skladu sa svojim uobičajenim praksama.



Slika 1. Testne površine na območju Kozjanskega parka.

Slika 1. Testne plohe na području Kozjanskog parka.



Slika 2. Testne površine na območju Naravnega parka Žumberak – Samoborsko gorje

Slika 2. Testne plohe na području Parka prirode Žumberak – Samoborsko gorje.

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 na devetih testnih površinah nabrali 64 vzorcev (Tabela 1).	Detaljan opis metode uzorkovanja entomološkom mrežom 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 na devet pilotnih ploha prikupili 64 uzoraka (Tablica 1).

Tabela 1. Datumi vzorčenja nevretenčarjev.

Tablica 1. Datumi uzorkovanja bezkičmenjaka.

Kozjanski park	Vzorcev / Uzoraka	Žumberak	Vzorcev / Uzoraka
14.06.2024	5	20.6.2024	4
21.06.2024	5	7.8.2024	4
30.07.2024	5	15.10.2024	4
1.10.2024	5		
18.06.2025	5	20.05.2025	4
3.07.2025	5	7.08.2025	4
30.07.2025	5	1.10.2025	4
8.09.2025	5		

Prvo vzorčenje v letu je bilo vedno na nepokošenih površinah. Pred drugim vzorčenjem je bila pokošena ena testna površina, pred drugim vzorčenjem druga in pred tretjim tretja testna površina. Četrta testna površina je bila ves čas poizkusa nepokošena. Po košnji je bila trava s površine odstranjena. Košnja je bila običajno 1 do 3 tedne pred vzorčenjem. Z nekoliko daljšim časovnim razmakom med datumom košnje in datumom vzorčenja smo skušali zmanjšat neposreden učinek same košnje na nevretenčarje (smrtnost zaradi delovanja kose, obračalke, koles traktorja ipd.), ki je znan neposreden učinek košnje (Humbert et al. 2010). Datumi vzorčenja in košnje so se med območjema nekoliko razlikovali (tabela 2).	**Prvo uzorkovanje** u godini uvijek je bilo na nepokošenim plohama. Prije drugog uzorkovanja pokošena je jedna testna ploha, prije trećeg uzorkovanja druga, a prije četvrtog treća testna ploha. Četvrta testna ploha bila je nepokošena tijekom cijelog pokusa. Nakon košnje, trava je uklonjena s površine. Košnja je obično obavljena 1 do 3 tjedna prije uzorkovanja. Nešto duljim vremenskim razmakom između datuma košnje i datuma uzorkovanja nastojali smo smanjiti izravan učinak same košnje na beskralješnjake (smrtnost zbog rada kose, okretača sijena, kotača traktora i sl.), što je poznati izravni učinak košnje (Humbert et al. 2010). Datumi uzorkovanja i košnje malo su se razlikovali između dvaju područja (Tablica 2).

Tabela 2: Datumi vzorčenja (leva kolona) na različnih testnih površinah. Sive so površine, ki so bile pokošene pred vzorčenjem.

Tablica 2: Datumi uzorkovanja (lijevi stupac) na različitim testnim plohama. Sive su plohe koje su bile pokošene prije uzorkovanja

Kozjansko	Test 4/1	Test 4/2	Test 4/3	Test 4/4
14.06.2024				
21.06.2024				
30.07.2024				
1.10.2024				
18.06.2025				
3.07.2025				
30.07.2025				
8.09.2025				

Žumberak	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4
20.06.2024				
7.08.2024				
15.10.2024				
20.05.2025				
7.08.2025				
1.10.2025				

Posebna pozornost je bila namenjena razvoju in optimizaciji molekularnega pristopa laboratorijske obdelave, ki bi omogočal ohranitev vzorcev za nadaljnje morfološke analize. Za nesortirane skupinske vzorce členonožcev smo uvedli in optimizirali blag, nedestruktiven postopek lize in izolacije DNA. 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	Posebna pažnja posvećena je razvoju i optimizaciji molekularnog pristupa laboratorijske obrade koji bi omogućio očuvanje uzoraka za daljnje morfološke analize. Za nerazvrstane skupne uzorke člankonožaca uveli smo i optimizirali blagi, nedestruktivni postupak lize i izolacije DNA. Detaljan opis metode laboratorijskog rada objavljen je na: https://www.nib.si/projektinib?view=project&id=486 Za DNA metabarkodiranje ciljali smo 456 baznih parova dug odsječak mitohondrijskog gena za citokrom c oksidazu, podjedinicu I (COI), koji smo umnožili pomoću oligonukleotidnih početnica NoPlant_F_270 i Fol-degen-red (Krehenwinkel i sur., 2022). Korištene početnice dizajnirane su tako da

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 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). Rezultate dobljene z metodo metabarkodiranja smo primerjali s tremi logičnimi predpostavkami. Za test smo uporabili parameter »Število določenih odčitkov«, ker sta v njem združena tako število taksonov kakor količina DNA	smanjuju umnožavanje biljne DNA, a istodobno 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 povezani su i filtrirani 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 eventualnih kontaminanata (ljudska DNA, DNA biljaka, DNA gljiva) primjenom mrežnog programa BLAST+ (Camacho i sur., 2009) te smo ih alatom V-search (Rognes i sur., 2016) udruživali u operativne taksonomske jedinice (OTU = Operational Taxonomic Unit) uz primjenu praga sličnosti od 97%. Ove su jedinice najbolja bioinformatička aproksimacija vrsta. Njih smo na portalu BOLD (Ratnasingham i sur., 2024) determinirali do najniže pouzdane razine. Raznolikost uzorkovanih ploha procijenili smo u alatu MEGAN7 (Huson i sur., 2016) i pomoću R paketa iNEXT (Hsieh i sur., 2016). Alfa raznolikost kvantificirana je na temelju Hillovih brojeva (Chao i sur., 1987; Chao i sur., 2014): q = 0 (broj taksona), q = 1 (Shannonov indeks raznolikosti) i q = 2 (Simpsonov indeks raznolikosti). Procjene raznolikosti i pripadajući 95-postotni intervali pouzdanosti izračunani su ekstrapolacijom krivulja uzorkovanja na temelju veličine uzorka te procjenom asimptota (Chao i sur., 2014). Za prikaz beta raznolikosti u programu MEGAN7 upotrijebili smo metodu Neighbor-Net (Bryant i Moulton, 2004) i rezultate prikazali u obliku filogenetske mreže (phylogenetic outline) (Bağcı i sur., 2021). Za izračun alfa i beta raznolikosti uzeta je u obzir samo razina roda, a prije izračuna beta raznolikosti podaci su normalizirani Hellingerovom transformacijom (Legendre i Gallagher, 2001). Rezultate dobivene metodom metabarkodiranja usporedili smo s tri logične pretpostavke. Za testiranje smo upotrijebili parametar »Broj određenih očitanja«, jer su u njemu udruženi i broj taksona i količina DNA

posameznih osebkov, ki je odvisna tudi od biomase taksona v vzorcu. Z rezultati smo ocenili učinkovitost metode metabarkodiranja za prikazovanje lokalne in časovne dinamike biodiverzitete nevretenčarjev. Predpostavke so bile: 1. Homogenost - ob prvem vzorčenju bodo rezultati na vseh štirih testnih površinah posameznega območja primerljivii, ker so vse štiri površine na istem, homogenem travniku, 2. Sezonskost - rezultati na četrti površini, ki ni bila košena, bodo skozi sezono slediti pričakovani krivulji z nizkimi vrednostmi na začetku, velikimi v sredini in nizkimi ob koncu sezone, 3. Učinek košnje – neposredna primerjava dveh vzorcev z iste testne površine, med katerima je bila košnja, bo pokazala manjše vrednosti v vzorcu po košnji v primerjavi z vzorcem nabranimi pred košnjo.	pojedinih jedinki, koja ovisi i o biomasi taksona u uzorku. Rezultatima smo procijenili učinkovitost metode metabarkodiranja za prikazivanje lokalne i vremenske dinamike bioraznolikosti beskralješnjaka. Pretpostavke su bile: 1. Homogenost – pri prvom uzorkovanju rezultati na sve četiri testne plohe pojedinog područja bit će usporedivi jer se sve četiri plohe nalaze na istom, homogenom travnjaku, 2. Sezonalnost – rezultati na četvrtoj plohi, koja nije bila košena, tijekom sezone pratit će očekivanu krivulju s niskim vrijednostima na početku, visokim u sredini i niskim potkraj sezone, 3. Učinak košnje – izravna usporedba dvaju uzoraka s iste testne plohe između kojih je obavljena košnja pokazat će manje vrijednosti u uzorku nakon košnje u usporedbi s uzorkom prikupljenim prije košnje.

Rezultati in diskusija / Rezultati i diskusija

Sekvenciranje je bilo uspešno za 57 vzorcev, od tega 37 iz Kozjanskega in 20 iz Žumberaka. Po filtriranju smo ohranili 458411 odčitkov (v povprečju 8042 odčitkov po vzorcu) med katerimi je bilo določenih 356521 odčitkov (Tabela 3, 4). Med vzorci so bili daleč najštevilčnejši predstavniki reda Hemiptera, sledili so Dipteri, Symphypleona (Collembola), Lepidoptera, Orthoptera, Coleoptera in Sarcoptiformes (Acariformes).	**Sekvenciranje** je bilo uspješno za 57 uzoraka, od kojih je 37 iz Kozjanskog, a 20 iz Žumberka. Nakon filtriranja zadržali smo 458.411 očitanja (u prosjeku 8.042 očitanja po uzorku), među kojima je bilo determinirano 356.521 očitanja (Tablica 3, 4). Među uzorcima su uvjerljivo najbrojniji bili predstavnici reda Hemiptera (polukrilci), a slijedili su Diptera (dvokrilci), Symphypleona (skokunci), Lepidoptera (leptiri), Orthoptera (ravnokrilci), Coleoptera (kornjaši) i Sarcoptiformes (grinje).

Tabela 3. 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 3. 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 mjestu uzorkovanja i broj zabilježenih rodova.

Vzorčna površina / Uzorčna ploha	Št. Odčitkov / Broj očitaja	Št. določenih odčitkov / Broj determiniranih očitaja	Št. OUT / Broj OUT	Št. Taksonov / Broj taksona	Št. Rodov / Broj rodova
Intenzivni	49642	43610	237	203	151
Test	245284	183464	470	365	284
Gračac Slavetički	163485	129447	329	160	124

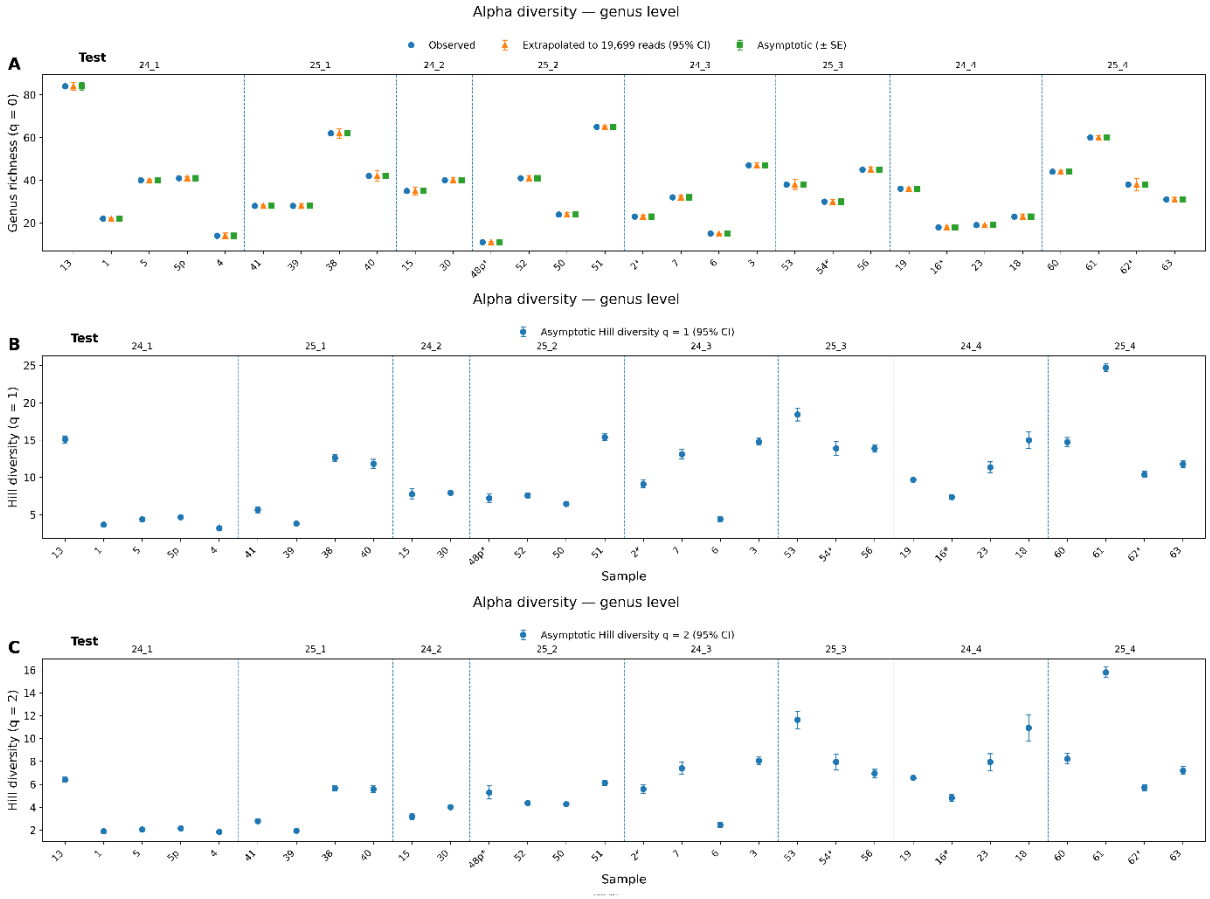
Tabela 4. Število odčitkov po filtriranju, število odčitkov, katerim smo določili taksonomijo vsaj do nivoja družine, število OTU in število določenih taksonov vsaj do nivoja družine na vzorčno mesto. Vzorci, ki so bili sekvencirani dva-krat (ponovitve) so označeni s črko »p«.

Tablica 4. 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	Datum vzorčenja	Oznaka vzorca	Št. odčitkov	Št. določenih odčitkov	Št. OTU	Št. taksonov
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
Intenzivni	30.07.2025	Cx_25_57p	9184	7808	146	83
Intenzivni	08.09.2025	Cx_25_64	4063	3572	94	61
Test 4/2	14.06.2024	Cx_25_1	2744	2432	45	27
Test 4/1	14.06.2024	Cx_25_13	15532	14111	186	98
Test 4/4	14.06.2024	Cx_25_4	1321	1234	25	16
Test 4/3	14.06.2024	Cx_25_5	20811	18232	123	51
Test 4/3	14.06.2024	Cx_25_5p	15814	13726	111	52
Test 4/1	21.06.2024	Cx_25_15	3154	2617	73	43
Test 4/2	21.06.2024	Cx_25_30	14712	11081	122	49
Test 4/1	30.07.2024	Cx_25_2	4275	3335	53	29
Test 4/4	30.07.2024	Cx_25_3	12163	9123	131	57
Test 4/3	30.07.2024	Cx_25_6	1121	1087	26	20
Test 4/2	30.07.2024	Cx_25_7	4488	3719	71	41
Test 4/2	01.10.2024	Cx_25_16	3236	1921	46	22
Test 4/4	01.10.2024	Cx_25_18	1822	721	46	30
Test 4/1	01.10.2024	Cx_25_19	25758	13832	196	50
Test 4/3	01.10.2024	Cx_25_23	2330	980	46	25
Test 4/3	18.06.2025	Cx_25_38	10549	9620	135	70
Test 4/2	18.06.2025	Cx_25_39	5803	5339	68	35
Test 4/4	18.06.2025	Cx_25_40	4269	3979	72	47
Test 4/4	18.06.2025	Cx_25_40p	541	497	28	21
Test 4/1	18.06.2025	Cx_25_41	3398	3060	54	36
Test 4/1	03.07.2025	Cx_25_48	5086	2991	86	44
Test 4/1	03.07.2025	Cx_25_48p	801	529	29	16
Test 4/3	03.07.2025	Cx_25_50	3778	3339	58	32
Test 4/4	03.07.2025	Cx_25_51	12700	11083	125	80
Test 4/2	03.07.2025	Cx_25_52	6752	5617	79	51
Test 4/1	30.07.2025	Cx_25_53	6364	3223	87	45
Test 4/2	30.07.2025	Cx_25_54	4765	3329	85	38

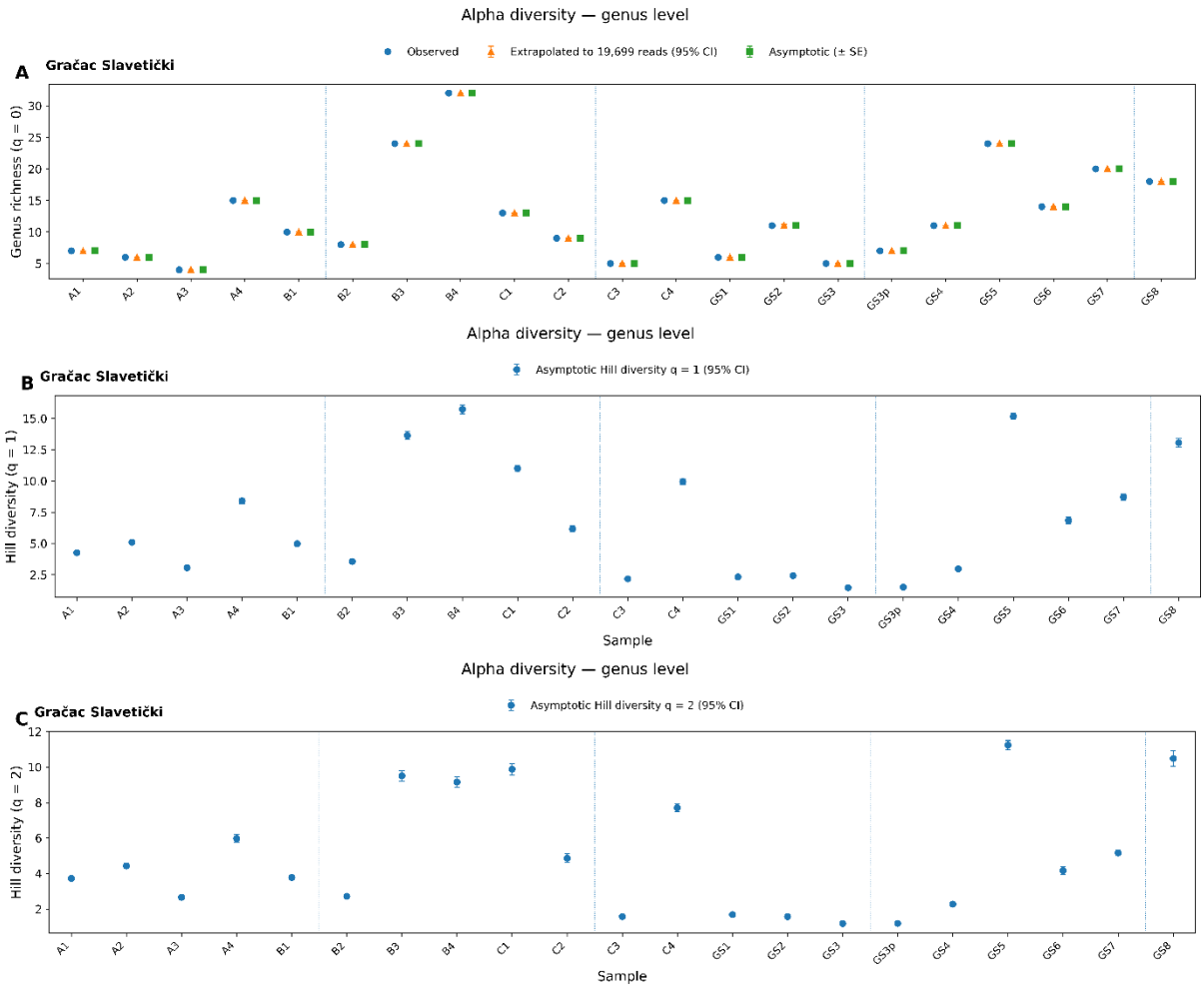
Vzorčna površina	Datum vzorčenja	Oznaka vzorca	Št. odčitkov	Št. določenih odčitkov	Št. OTU	Št. taksonov
Test 4/4	30.07.2025	Cx_25_55	735	540	22	14
Test 4/3	30.07.2025	Cx_25_56	10426	7002	132	55
Test 4/1	08.09.2025	Cx_25_60	7834	5663	106	56
Test 4/2	08.09.2025	Cx_25_61	22242	11493	235	77
Test 4/3	08.09.2025	Cx_25_62	5424	4785	99	48
Test 4/4	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
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

Pri vzorčnih površinah Test pokaže analiza alfa diverzitete kompleksen vzorec (Slika 3). Ob košnji alfa diverziteta praviloma upade, čemur sledi postopna rast. Kompleksnejša struktura je razvidna tudi na primeru vzorčnega mesta Gračac Slavetički (Slika 4).	Kod uzorkovanih ploha Test analiza alfa raznolikosti pokazuje složen obrazac (Slika 3). Prilikom košnje alfa raznolikost u pravilu opada, nakon čega slijedi postupan rast. Složenija struktura vidljiva je i na primjeru mjesta uzorkovanja Gračac Slavetički (Slika 4).



Slika 3: Alfa diverziteta vzorčne ploskve Test na Kozjanskem, A prikazuje ocenjeno število rodov, B vrednosti Shannonovega indeksa diverzitete in C Simpsonovega indeksa diverzitete.

Slika 3. Alfa raznolikost pokusne plohe Test na Kozjanskom: A prikazuje procijenjeni broj rodova, B vrijednosti Shannonovog indeksa raznolikosti i C Simpsonovog indeksa raznolikosti.

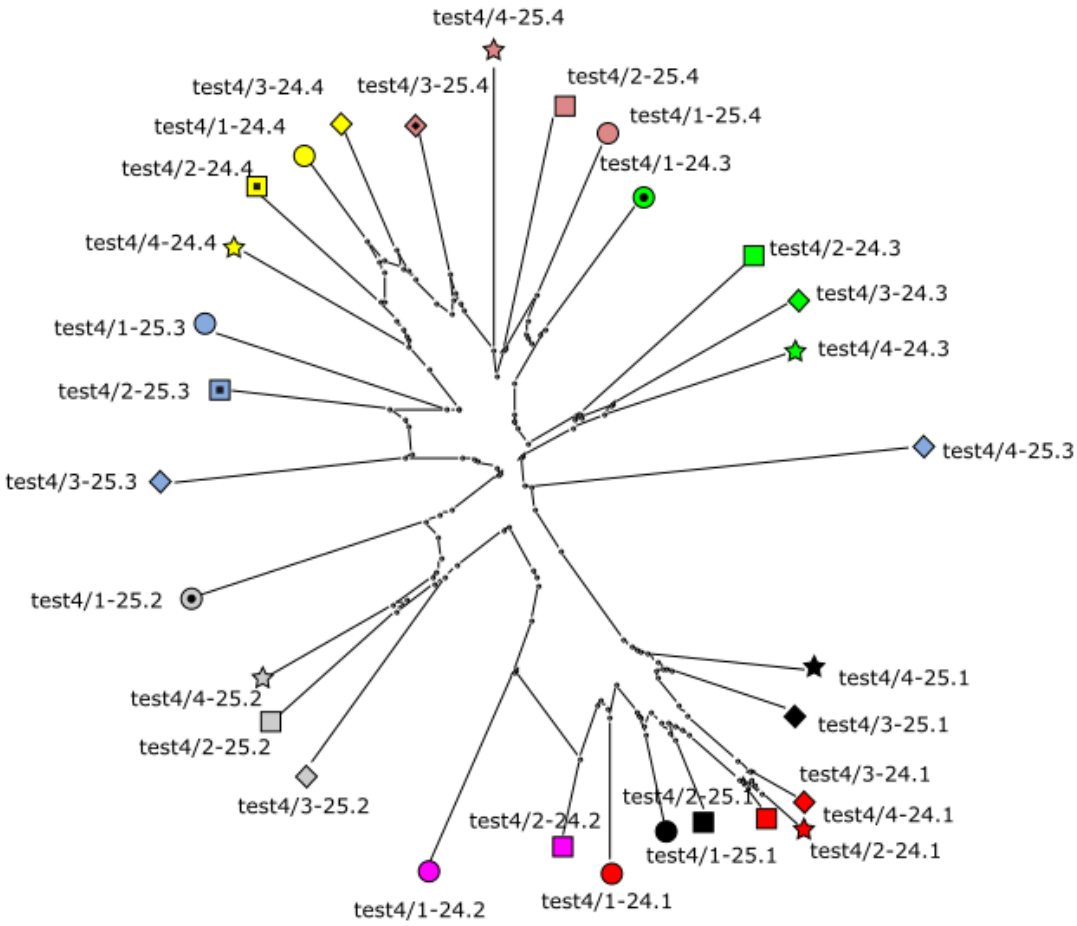


Slika 4: Alfa diverziteta na vzorčne ploskve Gračac Slavetički, prikazuje ocenjeno število rodov (A), vrednosti Shannonovega indeksa diverzitete (B) in C Simpsonovega indeksa diverzitete (C).

Slika 4: Alfa raznolikost na plohama uzorkovanja Gračac Slavetički; prikazuje procijenjeni broj rodova (A), vrijednosti Shannonova indeksa raznolikosti (B) i Simpsonovog indeksa raznolikosti (C).

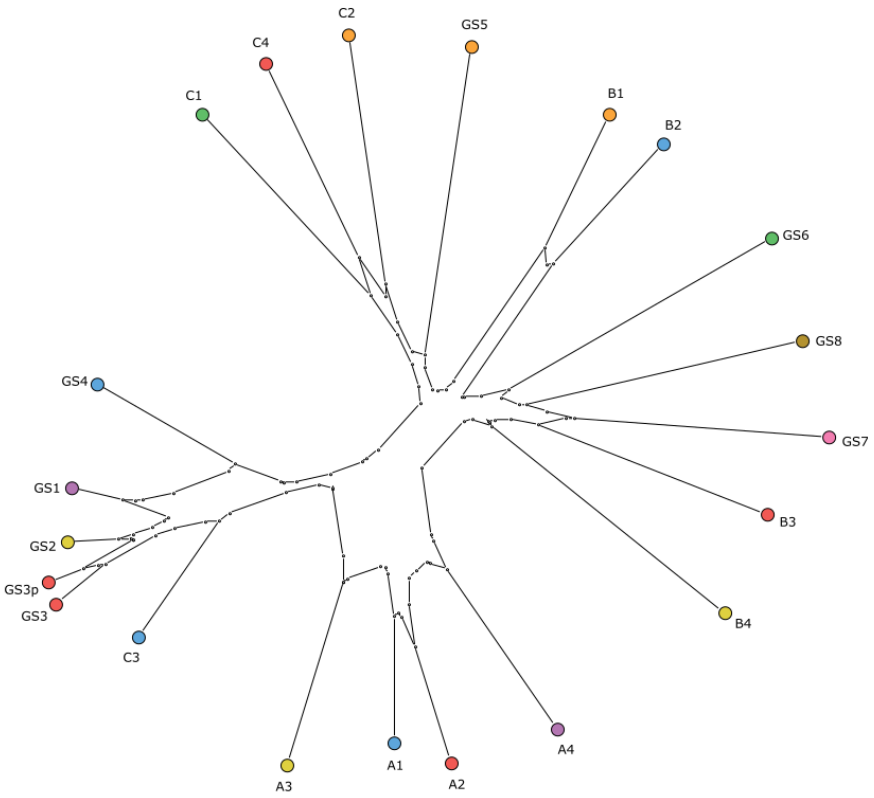
Tudi beta diverziteta znotraj vzorčnih ploskev razkrije bolj kompleksne vzorce. Na primeru vzorčnega mesta Test (Slika 5), analiza pokaže podobnost med vzorci iz testnih ploskev, ki so bile vzorčene v isti sezoni, saj je v enotni gruči večina vzorcev iz obeh let. Poleg leta in sezone vzorčenja se pri večini ploskev vidi tudi struktura povezana z režimom košnje in sicer, v večini primerov so vzorci nabrani neposredno po košnji uvrščeni v levi in zgornji del obrisa. Pretežno se nahajajo v predelu kjer so vzorci nabrani v	I beta raznolikost unutar ploha uzorkovanja otkriva složenije obrasce. Na primjeru mjesta uzorkovanja Test (Slika 5), analiza pokazuje sličnost među uzorcima s testnih ploha koji su uzorkovani u istoj sezoni, budući da se u jedinstvenom klasteru nalazi većina uzoraka iz obiju godina. Osim godine i sezone uzorkovanja, kod većine ploha vidljiva je i struktura povezana s režimom košnje, i to tako da su u većini slučajeva uzorci prikupljeni neposredno nakon košnje smješteni u lijevi i gornji dio mreže. Pretežito

tretjem in četrtem vzorčenju, ki sovpadata s časom, ko se optimalne razmere za nevretenčarje slabšajo, kar prav tako kaže na zmanjšanje biodiverzitete po košnji. Kompleksnejša struktura je razvidna tudi na primeru vzorčnega mesta Gračac Slavetički (Slika 6), kjer je razvidno združevanje testnih površin po letih vzorčenja.	se nalaze u području gdje su uzorci prikupljeni u trećem i četvrtom uzorkovanju, što se podudara s vremenom kada se optimalni uvjeti za beskralješnjake pogoršavaju, što također ukazuje na smanjenje bioraznolikosti nakon košnje. Složenija struktura vidljiva je i na primjeru mjesta uzorkovanja Gračac Slavetički (Slika 6), gdje je uočljivo grupiranje testnih ploha prema godinama uzorkovanja.



Slika 5. Prikaz beta diverzitete s filogenetskim obrisom za vzorčno površino Test na Kozjanskem. Posamezne ploskve so označene s številkama v ulomku, leto vzorčenja označujeta 24 oz. 25, vrednost za piko je obdobje vzorčenja v letu. Različne barve označujejo kombinacijo testne ploskve in leta vzorčenja. Oblika lika označuje čas vzorčenja - - krog prvo vzorčenje v letu, kvadrat drugo vzorčenje v letu, zvezda tretje vzorčenje v letu in deltoid četrto vzorčenje v letu. Pika znotraj lika označuje košnjo.

Slika 5. Prikaz beta raznolikosti filogenetskom mrežom (phylogenetic outline) za plohu uzorkovanja Test na Kozjanskom. Pojedinačne plohe označene su brojevima u razlomku, godinu uzorkovanja označuju 24 odnosno 25, a vrijednost iza točke označuje razdoblje uzorkovanja u godini. Različite boje označuju kombinaciju testne plohe i godine uzorkovanja. Oblik simbola označuje vrijeme uzorkovanja – krug označuje prvo uzorkovanje u godini, kvadrat drugo uzorkovanje u godini, zvijezda treće uzorkovanje u godini, a deltoid četvrto uzorkovanje u godini. Točka unutar simbola označuje košnju.

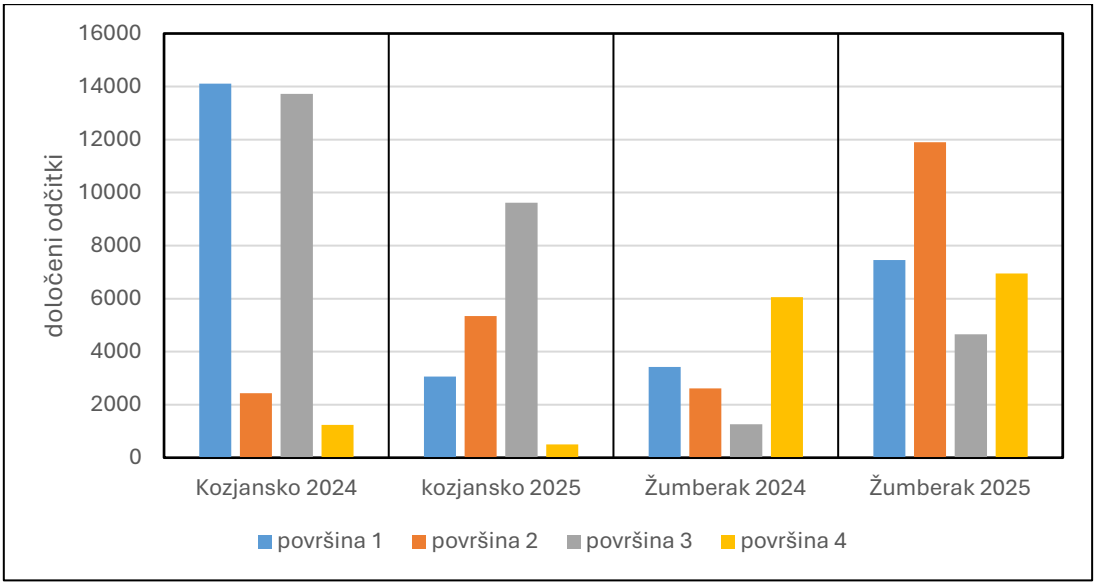


Slika 6. Prikaz beta diverzitete s filogenetskim obrisom za vzorčno površino Gračac Slavetički na Žumberaku.

Slika 6. Prikaz beta raznolikosti filogenetskom mrežom (phylogenetic outline)za plohu uzorkovanja Gračac Slavetički na Žumberku.

Primerjava rezultatov s tremi logičnimi predpostavkami	**Usporedba rezultata s tri logične pretpostavke**
Homogenost Rezultati prvih vzorčenj v sezoni so bili med testnimi površinami v obeh letih in na obeh območjih različni, še posebej izrazito na Kozjanskem v letu 2024 (slika 7). Vzrok je lahko več: 1. posamezne testne površine med sabo niso bile primerljive, čeprav so bile na istem travniku. 2. metoda nabiranja vzorcev predvideva za vsak vzorec dvajset zamahov s kečerjem na vsakem od štirih transektov, kar je površina okoli 40 m^2. Velikost posamezne testne površine je bila 4.000 m^2, kar pomeni, da je bil vzorec nabran	**Homogenost** Rezultati prvih uzorkovanja u sezoni bili su različiti među testnim plohama u objema godinama i na oba područja, što je bilo posebno izraženo na Kozjanskom 2024. godine (Slika 7). Uzroka može biti više: 1. pojedinačne testne plohe međusobno nisu bile usporedive, iako su se nalazile na istom travnjaku; 2. metoda prikupljanja uzoraka predviđa za svaki uzorak dvadeset zamaha entomološkom mrežom na svakom od četiriju transekata, što pokriva površinu od oko 40 m^2. Veličina pojedine testne plohe

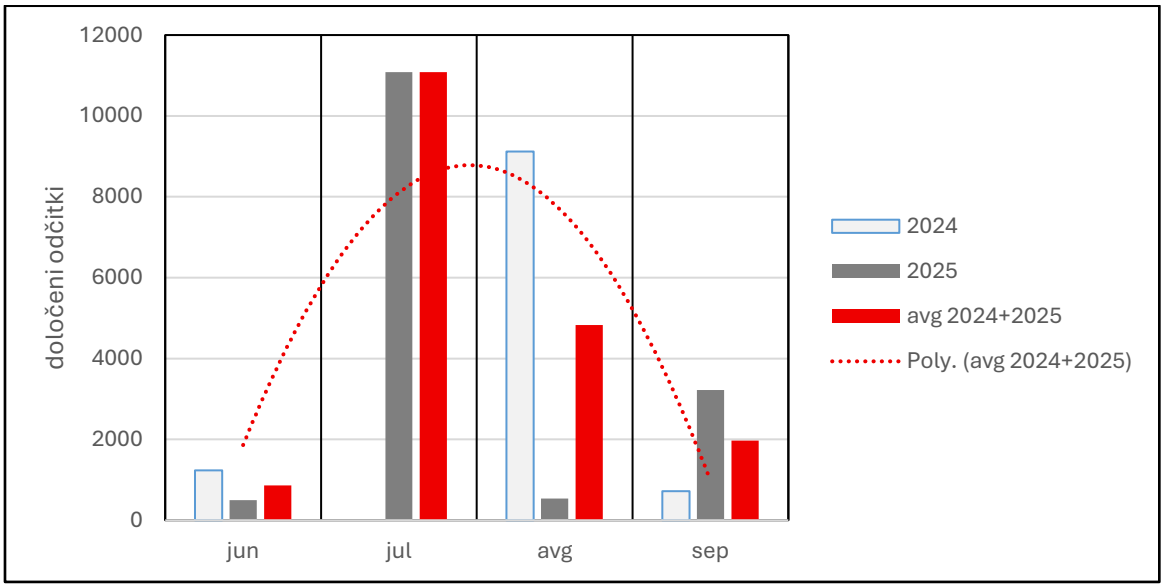
na okoli 1% površine. Možno, da so testne površine heterogene že same po sebi, kar pomeni, da bi bilo treba za reprezentativni pokazatelj stanja nevretenčarjev vzeti več vzorcev (npr. vzorčenje na 5 različnih lokacijah znotraj testne površine). 3. pri vzorčenju se je nabrala različna količina rastlinskih ostankov, ki so morda imeli različen vpliv na analizo, ali pa morda liza s katero smo spirali DNK ob različnih količinah rastlinskega materiala deluje različno učinkovito.	iznosila je 4.000 m^2, što znači da je uzorak prikupljen na oko 1% površine. Moguće je da su testne plohe heterogene same po sebi, što znači da bi za reprezentativni pokazatelj stanja beskralješnjaka trebalo uzeti više uzoraka (npr. uzorkovanje na 5 različitih lokacija unutar testne plohe); 3. tijekom uzorkovanja prikupljena je različita količina biljnih ostataka koji su možda imali različit utjecaj na analizu, ili pak puferska otopina za lizu (ispiranje DNA) djeluje različito učinkovito pri različitim količinama biljnog materijala.



Slika 7. Število določenih odčitkov vzorcev nabranih na vseh štirih testnih površinah (različne barve) v začetku sezone še pred košnjo na Kozjanskem in Žumberaku.

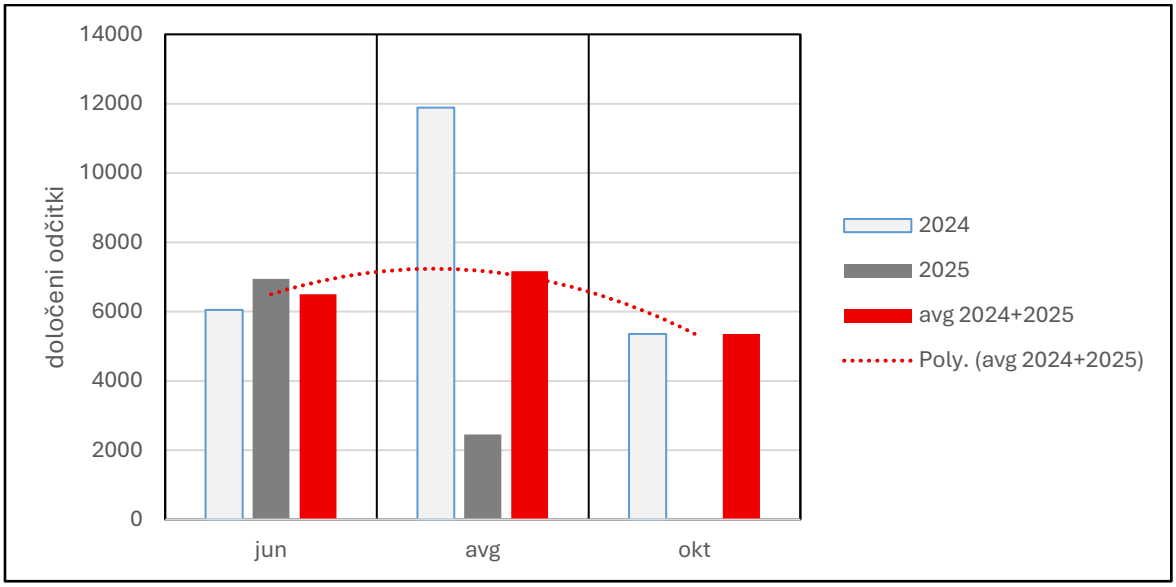
Slika 7. Broj determiniranih očitanja uzoraka prikupljenih na sve četiri testne plohe (različite boje) na početku sezone, prije košnje na Kozjanskom i Žumberku.

Sezonskost Rezultati dobljeni iz vzorcev nabranih izključno na testni površini, ki v času projekta ni bila pokošena nikoli kažejo pričakovan vzorec: manjše vrednosti v začetku sezone, večje vrednosti v sredini sezone, ko so razmere za nevretenčarje optimalne in upad vrednosti ob zaključku sezone. Vzorec je bolj izrazit na Kozjanskem (Slika 8) kakor na Žumberaku (Slika 9).	**Sezonalnost** Rezultati dobiveni iz uzoraka prikupljenih isključivo na testnoj plohi koja tijekom projekta nikada nije bila košena pokazuju očekivani obrazac: manje vrijednosti na početku sezone, veće vrijednosti u sredini sezone, kada su uvjeti za beskralješnjake optimalni, te pad vrijednosti potkraj sezone. Obrazac je izraženiji na Kozjanskom (Slika 8) nego na Žumberku (Slika 9).



Slika 8. Število določenih odčitkov nabranih v različnih sezonah na testni površini 4/4 na Kozjanskem, ki ni bila pokošena. Svetlo sivi so vzorci nabrani v letu 2024, temno sivi v letu 2025, rdeča je povprečje. Zaradi lažjega vizualiziranja vzorca sprememb, je iz povprečnih vrednosti izrisan poligon druge stopnje.

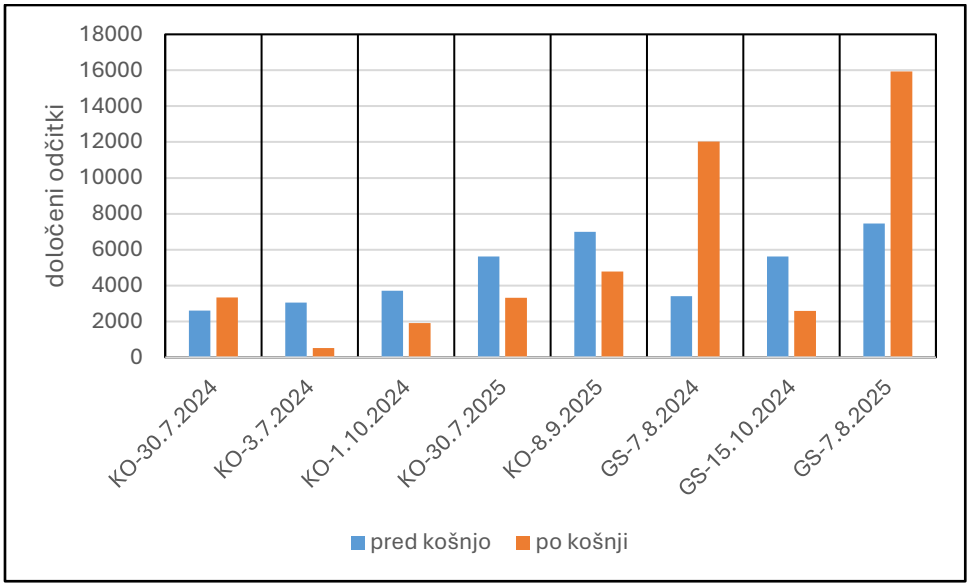
Slika 8. Broj determiniranih očitanja prikupljenih u različitim sezonama na testnoj plohi 4/4 na Kozjanskom koja nije bila košena. Svijetlosivi su uzorci prikupljeni 2024. godine, tamnosivi 2025. godine, a crvena boja označuje prosjek. Radi lakše vizualizacije obrasca promjena, iz prosječnih vrijednosti iscrtan je poligon drugog stupnja.



Slika 9. Število določenih odčitkov nabranih v različnih sezonah na testni površini 4 na Žumberaku, ki ni bila pokošena. Svetlo sivi so vzorci nabrani v letu 2024, temno sivi v letu 2025, rdeča je povprečje. Zaradi lažjega vizualiziranja vzorca sprememb, je iz povprečnih vrednosti izrisan poligon druge stopnje.

Slika 9. Broj determiniranih očitanja prikupljenih u različitim sezonama na testnoj plohi 4 na Žumberku koja nije bila košena. Svijetlosivi su uzorci prikupljeni 2024. godine, tamnosivi 2025. godine, a crvena boja označuje prosjek. Radi lakše vizualizacije obrasca promjena, iz prosječnih vrijednosti iscrtan je poligon drugog stupnja.

Učinek košnje V osmih primerih smo izmerili spremembo vrednosti določenih odčitkov dveh zaporednih vzorčenj, med katerima je bila košnja (Slika 11). V petih primerih je bila razlika pričakovana – število in / ali biomasa nevretenčarjev je upadla za od 2 do 6 krat, v treh primerih pa je ostala podobna oz. narasla za 2 do 3 krat. Vzroki za nepričakovano povečanje vrednosti po košnji so lahko: 1. posamezne testne površine so merile manj kakor pol hektarja, pri nekaterih je možen robni učinek, kar pomeni, da so po košnji novi nevretenčarji relativno hitro nadomestili izginule zaradi košnje; 2. robni učinek se je izkazal za bolj izrazitega, ker je od košnje do vzorčenja minilo 1 do 3 tedni.	**Učinak košnje** U osam slučajeva izmjerili smo promjenu vrijednosti determiniranih očitanja između dvaju uzastopnih uzorkovanja između kojih je obavljena košnja (Slika 11). U pet slučajeva razlika je bila očekivana – broj i/ili biomasa beskralješnjaka smanjili su se za 2 do 6 puta, dok su u tri slučaja ostali slični, odnosno porasli za 2 do 3 puta. Uzroci neočekivanog povećanja vrijednosti nakon košnje mogu biti sljedeći: 1. pojedinačne testne plohe bile su manje od pola hektara, pa je kod nekih moguć rubni efekt, što znači da su nakon košnje novi beskralješnjaci relativno brzo nadomjestili one koji su nestali zbog košnje; 2. rubni efekt pokazao se izraženijim jer je od košnje do uzorkovanja prošlo 1 do 3 tjedna.



Slika 10. Število določenih odčitkov pri 16 vzorcih, ki so bili nabrani pred košnjo (modra barva) in po košnji (oranžna barva). KO- so vzorci iz Kozjanskega, GS so vzorci iz Žumberaka – kratici sledi datum pobiranja vzorca po košnji.

Slika 10. Broj determiniranih očitanja kod 16 uzoraka koji su prikupljeni prije košnje (plava boja) i nakon košnje (narančasta boja). KO- označuje uzorke s Kozjanskog, a GS označuje uzorke sa Žumberka – nakon kratice slijedi datum prikupljanja uzorka nakon košnje.

Zaključki / Zaključci

-Metoda metabarkodiranja je dokaj dobro določila razlike v vrstni strukturi in pestrosti vzorcev, predvsem na nivoju beta diverzitete. -Razlike v določenih odčitkih, ki kažejo na taksonomske spremembe in tudi spremembe v biomase, so bile manj zanesljive. Pri vplivu košnje na nevretenčarje sta pomembna tako taksonomska pestrost kakor tudi količina DNK v vzorcih, ki posredno kaže na spremembo v biomasi nevretenčarjev. -Testiranje rezultatov je postreglo z mešanimi občutki. Podobnost vzorcev nabranih pred prvo košnjo na vseh testnih površinah je bila majhna, čeprav smo pričakovali, da bo velika. Po drugi strani se je na testni površini, ki ni bila v času projekta nikoli pokošena pokazal pričakovan vzorec v odčitkih z minimumom v začetku in ob koncu sezone. -Pri primerjavi vzorcev pred košnjo z vzorci po košnji je večina primerov sicer pokazala zmanjšanje v številu in/ali biomasi nevretenčarjev zaradi košnje, a glede na velike spremembe, ki jih ob košnji opazimo empirično ocenjujemo, da bi razlike morale biti bolj konsistentne in večje. Vsaj toliko kakor je bila razlika v drugem primeru v Sliki 11. -Ocenjujemo da nova metoda dokaj dobro pokaže splošne trende v združbah nevretenčarjev na travnikih, pri konkretnih pokazateljih pa je v določenih primerih še premalo zanseljiva. Zato ocenjujemo, da je v trenutni fazi metoda že primerna za določanje splošnih, kompleksnih sprememb ne pa še za rutinsko določanje konkretnih kvalitativnih in kvantitativnih sprememb v združbi nevretenčarjev ki jih povzroča košnja travnika.	-Metoda metabarkodiranja prilično je dobro utvrdila razlike u strukturi vrsta i raznolikosti uzoraka, posebice na razini beta raznolikosti. -Razlike u determiniranim očitanjima, koje ukazuju na taksonomske promjene, kao i na promjene u biomasi, bile su manje pouzdane. Pri procjeni utjecaja košnje na beskralješnjake važni su kako taksonomska raznolikost, tako i količina DNA u uzorcima, koja posredno ukazuje na promjene u biomasi beskralješnjaka. -Testiranje rezultata donijelo je mješovite zaključke. Sličnost uzoraka prikupljenih prije prve košnje na svim testnim plohama bila je mala, iako smo očekivali da će biti velika. S druge strane, na testnoj plohi koja tijekom projekta nikada nije bila košena pokazao se očekivani obrazac u očitanjima, s minimumom na početku i potkraj sezone. -Pri usporedbi uzoraka prije košnje s uzorcima nakon košnje, većina je slučajeva doduše pokazala smanjenje broja i/ili biomase beskralješnjaka zbog košnje, no s obzirom na velike promjene koje empirijski opažamo prilikom košnje, procjenjujemo da bi razlike trebale biti konzistentnije i veće. Barem u onoj mjeri u kojoj je bila vidljiva razlika u drugom slučaju na Slici 11. -Procjenjujemo da nova metoda prilično dobro pokazuje opće trendove u zajednicama beskralješnjaka na travnjacima, dok je kod konkretnih pokazatelja u određenim slučajevima još uvijek nedovoljno pouzdana. Stoga smatramo da je u trenutačnoj fazi metoda već prikladna za utvrđivanje općih, kompleksnih promjena, ali još uvijek ne i za rutinsko određivanje konkretnih kvalitativnih i kvantitativnih promjena u zajednici beskralješnjaka koje uzrokuje košnja travnjaka.

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

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

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

Humbert J-Y., Pellet J, Buri P. and Arlettaz R. (2012). Does delaying the first mowing datebenefit biodiversity in meadowland? Environmental Evidence 2012 1:9.

Humbert Y.H, Ghazoul J., Sauter G.J & Walter T. (2010): Impact of different meadow mowing techniques on field invertebrates. J. Appl. Entomol. 134 (2010) 592–599.

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.

Marie-France Cattina, Gilles Blandenierb, Carolin Banasek-Richtera, Louis-Felix Bersiera, (2003). The impact of mowing as a management strategy for wet meadows on spider (Araneae) communities. Biological Conservation 113 (2003) 179–188.

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

Roland F, Miklós B, Gergő O, György D, Zoltán B (2025). The effect of mowing and mulching on snail communities: an experiment in wet meadows. PLoS One. 2025 Jul 10;20(7):e0314670. doi: 10.1371/journal.pone.0314670

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.

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

Impresum

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/