

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Tea Hutten, Dora Čuljak

**POJAVA MUŽJAKA U VIJETNAMSKOG PALIČNJAKA, *Medauroidea extradentata*
(Brunner von Wattenwyl, 1907) KOJI SE RAZMNOŽAVA PARTENOGENEZOM**

Zagreb, 2018.

Ovaj rad izrađen je u Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod voditeljstvom izv. prof. dr. sc. Jasne Lajtner i suvoditeljstvom dr. sc. Andreje Lucić i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2017./2018.

Sadržaj rada

1. Uvod.....	1
1.1. Evolucijska pojava spola.....	1
1.2. Kukci: evolucijska uspješnost i raznolikost.....	3
1.2.1. Determinacija spola.....	3
1.2.2 Partenogeneza.....	4
2. Ciljevi rada.....	5
3. Materijal i metode.....	6
3.1. Pokusni organizam.....	6
3.2. Metode.....	7
3.2.1. Uzgoj paličnjaka.....	7
3.2.2. Prikupljanje jaja.....	7
3.2.3. Metode tretiranja pojedinih skupina jaja paličnjaka.....	8
3.2.4. Održavanje tretiranih jaja i izlegnutih nimfi paličnjaka.....	9
3.2.5. Određivanje spola nimfi paličnjaka.....	10
3.2.6. Kvantitativna obrada podataka.....	11
4. Rezultati.....	12
5. Rasprava.....	18
6. Zaključci.....	21
7. Zahvale.....	22
8. Popis literature.....	23
9. Sažetak.....	25
10. Summary.....	26

1. Uvod

1.1. Evolucijska pojava spola

Spol jedinke definiramo temeljem oblika gameta koje ona proizvodi; mužjaci proizvode manje gamete u odnosu na ženke. Ukoliko jedinka proizvodi obje vrste gameta, radi se o dvospolnoj životinji ili jednodomnoj biljci. Kako bi nastali potomci, u većini slučajeva potrebno je spajanje gameta različitih spolova. Osim spola, u smislu mužjak/ženka, postoje i reproduktivni tipovi kojih može biti više od dva; na taj način se često označavaju gljive. Kod ovog se sustava također samo određeni tipovi mogu sparivati i dati nove jedinke. Smatra se da je spol na različite načine nastao više puta tijekom evolucije. Uglavnom je nastajao kao različitost spolnih stanica organizma, ili kao različitost samih organizama. U nekom je trenutku moralo doći do anizogamije; razlike u gametama. Teško je sa sigurnošću reći je li ona nastala preko antigena i receptora na površini stanice, kompeticijom izvanjezgrene DNA različitih roditelja, jednostavno kao razlika u veličini gameta ili temeljem nečeg drugog. Mehanizme anizogamije moguće je samo pretpostaviti temeljem proučavanja i uspoređivanja današnjih organizama. Bez obzira na nastanak, pojavile su se morfološki različite anizogamete: ženska gameta postala je veća od muške, a s vremenom je izgubila i pokretljivost. Povećanje mase omogućilo joj je više hranjivih tvari za razvitak mladog embrija, a muškoj gameti je gubitak mase omogućio lakše kretanje i pronalaženje ženske gamete. Ne može se tvrditi da je to energetski isplativiji i napredniji oblik gameta i oplodnje jer su se i izogamete zadržale do danas, već je to samo jedan od oblika anizogamije koji se razvio iz izogameta (Hoekstra, 1987; Stearns, 1987; Stearns i Hoekstra, 2005).

Nameće se pitanje zašto je spol uopće nastao, odnosno zašto se zadržao tijekom vremena, sve do danas? Pojava spolova uvjetuje spolno razmnožavanje, što pak zahtjeva da jedinka, kako bi došlo do nastanka zigote, pronađe partnera ili način kako „dostaviti“ gamete drugom spolu. To spolno razmnožavanje čini "energetski skupljim" i kompleksnijim činom pa se nameće pitanje koliko je ono zapravo učinkovito i isplativo. Unatoč tome, većina organizama razmnožava se na ovaj način (Hoekstra, 1987; Stearns, 1987).

S druge strane je nesporno razmnožavanje u kojem nije potrebno spajanje gameta; potomci nastaju iz neoplođenih jaja (partenogeneza), pupanjem životinje (hidre, koralji) ili vegetativnim načinima (vriježe kod biljaka). Kod partenogeneze energija se ne troši na pronalaženje spolnog partnera, nego samo za proizvodnju jaja. Ukoliko su svi potomci ženke (telitokija), ovaj način postaje energetski još isplativiji. Jedinka koja se razmnožava na ovaj

način u samo nekoliko generacija može uvelike brojčano nadmašiti onu koja se razmnožava spolno (Stearns, 1987).

Više je pogleda i teorija o tome koji je način razmnožavanja povoljniji, i u kojim okolišnim uvjetima. „Tradicionalni pogled“ govori kako se nespolno razmnožavanje javlja u stabilnim uvjetima, a spolno u nestabilnim (promjenjivim) uvjetima okoliša. Podloga tome gledištu je upravo genetska raznolikost vrsta koje se spolno razmnožavaju koja im omogućuje adaptaciju. Vrste koje se nespolno razmnožavaju bi u promjenjivim uvjetima teško opstale, jer su mutacije, a time i adaptacije, relativno rijetke. Ova je teorija potkrijepljena promatranjem fakultativno partenogenetskih organizama; primijećeno je da se oni u stabilnim uvjetima razmnožavaju nespolno, a kada nastupe nepovoljni uvjeti kreću u potragu za spolnim partnerom i spolno se razmnožavaju. Glavna kritika tradicionalnom pogledu jest da u fokus stavlja skupinu, a ne jedinku. Ukoliko se gleda jedinka, evolucijski pritisak natjerao bi je da se razmnožava nespolno, odnosno partenogenezom. Na taj način najbrže i s najmanje utroška energije može stvoriti veći broj potomaka i tako osigurati opstanak svojih gena. Međutim, za opstanak vrste ili populacije, spolno razmnožavanje je povoljnije. Potomci koji nastaju spolnim razmnožavanjem su, zahvaljujući rekombinaciji, genski različiti od roditelja. Razmjena gena i rekombinacije omogućuju da se jedinke prilagode promjenjivim uvjetima okoliša, a „*outbreedingom*“ (nesrodnim križanjem, odnosno razmnožavanjem) se smanjuje vjerojatnost nakupljanja loših mutacija i pojave svojstava koja smanjuju reproduktivni uspjeh jedinke. Veća genetska raznolikost ili *gene pool* povećava vjerojatnost pojave fenotipa koji će biti preadaptiran za promjenjive uvjete u okolišu (Stearns i Hoekstra, 2005).

Često se u evoluciji zanemaruje značaj jedinke koje se nespolno razmnožavaju za specijaciju. Ukoliko se dogodi nasljedna mutacija kod ženke koja se razmnožava nespolno, ubrzo će nastati velik broj potomaka koji nose tu mutaciju. Tako je utjecaj jedinke koja se nespolno razmnožava na gensku raznolikost i nastajanje novih vrsta puno veći nego što se to uobičajeno smatra. Zbog toga što organizmi koji se nespolno razmnožavaju imaju manje raznolik *gene pool*, smatra se da su u nepovoljnijoj situaciji. Međutim, prethodno objašnjenim primjerom mutacije kod jedinke koja se nespolno razmnožava očito je da situacija nije tako crno-bijela (Stearns, 1987).

1.2. Kukci: evolucijska uspješnost i raznolikost

Razred Insecta (kukci) je vrstama daleko najbrojnija skupina životinja s do sada opisanih preko milijun vrsta, a procjenjuje se da ih je između dva i šest milijuna. Obuhvaćaju tridesetak redova, od koji se pet smatra "glavnima" zbog velikog bogatstva vrstama: Coleoptera (kornjaši) s preko 350 000 vrsta; Diptera (dvokrilci) sa 150.000 vrsta, koje uključuju dobro nam poznate komarce, muhe, i obade; Hymenoptera (opnokrilci) s preko 150.000 vrsta, kojima pripadaju pčele, ose, bumbari i mravi; Lepidoptera (leptiri) s oko 150.000 vrsta; te Hemiptera (polukrilci) s oko 100.000 vrsta. Ima ih različitih oblika, veličina i boja, a nalazimo ih gdje god pogledali (Gullan i Cranston, 2004).

Toliku brojnost i raznolikost kukaca omogućila je njihova veličina, građa i ponašanje. Kukci su relativno mali organizmi, dužina tijela im varira od svega par milimetara do par centimetara. Zahvaljujući tome, dostupno im je mnogo ekoloških niša kojima veći organizmi ne mogu pristupiti. Također, zato što su mali, nije im potrebno mnogo hrane. Imaju kratki životni vijek, ali zato imaju mogućnost stvoriti veliki broj potomaka. Zahvaljujući letu i zaštitnoj hitinskoj kutikuli lakše mogu izbjeći predatore, ali i raširiti se na nova staništa. U kukaca postoje raznovrsni oblici usnih organa: za grizenje, sisanje, bodenje i lizanje, što je također omogućilo zauzimanje dotad praznih ekoloških niša pa tako postoje kukci koji su herbivori, omnivori, predatori, nametnici, itd. Uzdušnički sustav jedna je od najznačajnijih prilagodbi za život na kopnu. Radi se o sustavu cjevčica kojima zrak struji sve do stanica i međustaničnih prostora, a ventilaciju omogućuju pokreti tijela. Imaju vrlo složen osjetilni sustav koji je analogan onome u kralježnjaka, više nego onome u beskralježnjaka (Gullan i Cranston, 2004; Habdija i sur., 2011).

1.2.1 Determinacija spola

Spol se kod kukaca determinira na više načina koji se često razlikuju i unutar redova. Kod većine vrsta spol se determinira kod oplodnje te ga određuje prisutnost jednog od spolnih kromosoma, omjer broja spolnih kromosoma ili stupanj ploidije. Ovisno o prisutnosti spolnih kromosoma, postoje XY/XX (ženka je homogametna), X0/XX (mužjaku nedostaje jedan spolni kromosom) i ZZ/ZW sustav (mužjak je homogametna). Spol gotovo svih vrsta unutar roda Hymenoptera određen je stupnjem ploidije, gdje su mužjaci haploidni, a ženke diploidne. Spol može biti određen i nakon oplodnje, odnosno majčinim učinkom, naknadnim utišavanjem gena

itd. Eksperimentalno je dokazano da se spol također može determinirati i okolišnim uvjetima (Bergerard, 1972).

U slučajevima kada dođe do greške kod npr. gametogeneze ili spajanja gameta, moguć je nastanak abnormalnog broja ili omjera kromosoma. Tada se javljaju različiti oblici interseksa, što može manje ili više utjecati na fertilitnost i preživljavanje jedinke.

Kod reda Phasmatodea (hrv. nakaznici), spol se većinski determinira sustavom X0/XX, primjerice u vrsta *Clonopsis algerica* (Pantel, 1890) i *Pijnackeria hispanica* (Bolívar, 1878). U nekim pak slučajevima, kao što je u vrste *Leptynia attenuata* Pantel, 1890, postoji Y kromosom koji određuje muški spol jedinke (XY/XX sustav). Kod potonje vrste smatra se da je naknadno „dobila“ spolni kromosom, tj. da je u nekom trenutku prešla s X0 na XY sustav (Sánchez, 2008; Milani i sur., 2010; Liehr i sur., 2017).

1.2.2. Partenogeneza

Partenogeneza je nespolni način razmnožavanja kod kojeg se neoplođena jajna stanica razvija u jedinku te na taj način nastaju klonovi majke. Zbog sudjelovanja jajne stanice u razmnožavanju smatraju je i jednospolnim razmnožavanjem. Postoji nekoliko podtipova partenogeneze; kod telitokije svi su potomci ženke, a kod arhenotokije mužjaci. Ukoliko nastaju oba spola, radi se o amfitokiji ili deuterotokiji. Partenogeneza se može dijeliti i s obzirom na način nastajanja jaja; kod apomiktičke partenogeneze jajna stanica se dijeli mitozom i nastaju dvije diploidne stanice (jaja); kod automiktičke jajna se stanica dijeli mejozom, međutim nakon završene diobe stapa se s drugom nastalom stanicom te postaje diploidna (More, 1996; Normark, 2002; Scali, 2009).

Ovim nespolnim načinom razmnožavaju se mnogi kukci i biljke, a zabilježen je i u nekoliko vrsta riba i gmazova. Razred Bdelloidea unutar koljena Rotifera (kolnjaci) već se milijunima godina razmnožava isključivo partenogenezom, te se smatra da mužjaci više ne postoje (Habdija i sur., 2011). Većina se vrsta ipak razmnožava fakultativnom partenogenezom; tijekom života izmjenjuju spolnu i nespolnu fazu.

2. Ciljevi rada

Istraživanjem će se utvrditi vrijeme potrebno za izlijeganje nimfi vijetnamskog paličnjaka (*Medauroidea extradentata* (Brunner von Wattenwyl, 1907)) u uzgojnim uvjetima, kao i uspješnost izlijeganja nimfi. Također, zabilježiti ćemo vrijeme potrebno od izlijeganja do prvog presvlačenja, kada je moguće odrediti spol jedinki.

Cilj ovog rada također je istražiti promjenu učestalosti pojave mužjaka unutar uzgojne populacije vijetnamskih paličnjaka pod utjecajem nekih okolišnih čimbenika.

Istražit ćemo da li na učestalost pojave mužjaka u vrste *M. extradentata* u uzgojnim uvjetima utječu:

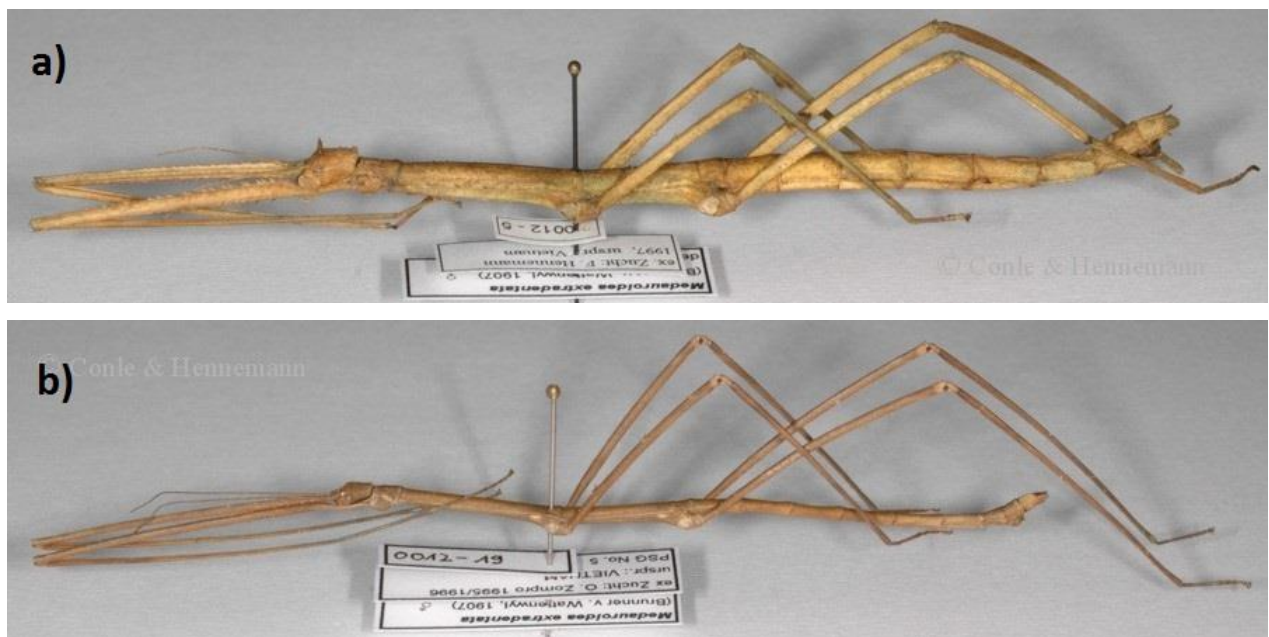
- a) povišena temperatura
- b) ultraljubičasto zračenje (UV)
- c) ionizirajuće zračenje i
- d) centrifugalna sila.

Pretpostavljamo da bi navedeni tretmani kojima simuliramo promjene okolišnih uvjeta mogli dovesti do povećane učestalosti pojave mužjaka u populaciji uzgajanih vijetnamskih paličnjaka. Rezultati bi se mogli primijeniti u proučavanju pojave spolnog razmnožavanja kod fakultativno partenogenetskih organizama, te njenog utjecaja na evoluciju.

3. Materijali i metode

3.1. Pokusni organizam

Vrsta *Medauroidea extradentata* (Brunner von Wattenwyl, 1907), vijetnamski paličnjak, pripada redu Phasmatodea (nakaznici). Prirodno stanište vrste je tropsko područje Vijetnama, međutim postoje brojne kulture u različitim ustanovama diljem svijeta. Na Biološkom odsjeku PMF-a u Zagrebu uzgajaju se 10-tak godina za potrebe nastave zoologije. Razmnožava se partenogenezom, točnije telitokijom (Sánchez, 2008), ali ponekad dolazi i do pojave mužjaka. Ima nepotpunu preobrazbu; iz jaja se izliježe stadij nimfe (Habdija i sur., 2011). Nakon što dosegne spolnu zrelost, stvara velik broj jaja, a jedino što zahtjeva pri uzgoju u terariju je visoka vlaga zraka i lišće kupine u prehrani (Boucher i Varady-Szabo, 2005). Ova vrsta odabrana je kao pokusni model upravo zbog fakultativno nespolnog razmnožavanja i lakog uzgoja.



Slika 1. Izgled jedinke vrste *M. extradentata*; a) ženka, b) mužjak (preuzeto iz http://www.phasmatodea.com/web/guest/photos?p_p_id=phasmatodeaimagegallery_WAR_phasmatodeade5231_INSTANCE_U96i&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&categoryId=921)

3.2. Metode

3.2.1. Uzgoj paličnjaka

Iz kulture vijetnamskog paličnjaka, u kojoj su prisutni i ženke i mužjaci, odabrano je 5 ženki približno jednake veličine i starosti (10 cm \pm 2 cm ukupne duljine tijela, oko godine dana starosti). Držane su u odvojenom plastičnom terariju, redovito hranjene kupinovim lišćem i prskane vodom iz boce štrcaljke radi održavanja visoke vlage zraka. Prostorija u kojoj se terarij imala je stalnu temperaturu zraka od 25 °C i također visoku vlažnost zraka. Fotoperioda je bila konstantna, izmjenjivalo se 14 sati svjetla i 10 sati tame što otprilike odgovara uvjetima prirodnog staništa. Istraživanje je provedeno tijekom 5 mjeseci, u razdoblju od studenog 2017. do travnja 2018. godine.

3.2.2 Prikupljanje jaja

Dva tjedna nakon izdvajanje ženki iz kulture započeto je skupljanje jaja koja su ženke polagale na dno terarija obloženo papirnatim ručnikom i potom su jaja skupljana jednom u svakih tjedan dana . Jaja su skupljana tijekom sedam tjedana, a ukupno ih je skupljeno 947. Jaja skupljena u svakom pojedinom tjednu spremna su u zasebne staklene Petrijeve zdjelice. U Petrijevim zdjelicama također su držana na papirnatom podlozi kako bi se smanjilo njihovo pomicanje i moguća oštećenja te su redovito prskana zbog održavanja vlage. Nakon sedmog tjedna, jaja različite „starosti“ su ravnomjerno podijeljena u odvojene skupine (Petrijeve zdjelice) koje će biti na različite načine tretirane te je za svaku starosnu skupinu jaja osigurana kontrola. Pripremljeno je ukupno 37 Petrijevih zdjelica s jajima različite starosti, a broj jaja u pojedinim skupinama pripremljenim za različite tretmane i kontrolu prikazan je u Tablici 1. Za tretman centrifugalnom silom su temeljem rezultata prethodnih istraživanja (Pijnacker, 1966) odvojena samo jaja jednog i dva tjedna starosti (Tablica 1).

Tablica 1. Broj jaja u pojedinim skupinama izdvojenim za određeni tretman

SKUPINA (starost jaja u tjednima)	A (7)	B (6)	C (5)	D (4)	E (3)	F (2)	G (1)
KONTROLA (K)	19	26	34	37	28	21	18
TEMPERATURA (T)	19	26	34	37	28	21	18
UV-3h (UV3)	19	26	34	37	28	21	18
UV-6h (UV6)	19	26	37	27	28	21	18
IONIZACIJSKO ZRAČENJE (R)	19	26	34	37	28	21	18
CENTRIFUGA (C)	/	/	/	/	/	21	18

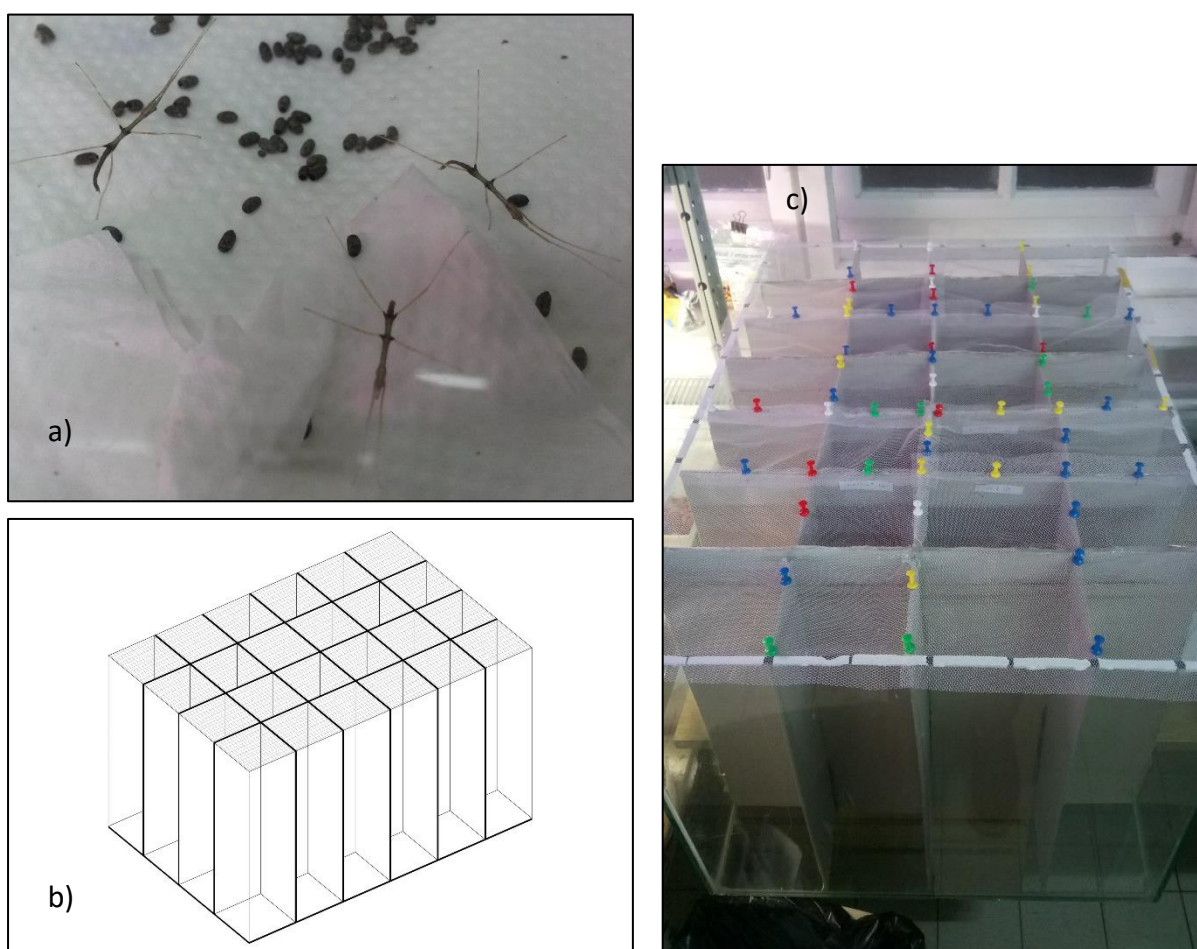
3.2.3. Metode tretiranja pojedinih skupina jaja paličnjaka

Razvrstane skupine jaja paličnjaka podvrgnute su različitim tretmanima kako bi se istražio njihov učinak na učestalost pojave mužjaka u populaciji. Jaja su tretirana na slijedeće načine:

- 1) **Povišenom temperaturom** - skupine jaja različite starosti su stavljene u termostat na temperaturu od 45 °C u trajanju od dva sata. Za vrijeme tretmana jaja su bila u poklopljenim Petrijevim zdjelicama.
- 2) **UV zračenjem** - jaja su izložena UV zračenju valne duljine 254 nm u trajanju od tri, odnosno 6 sati. Za vrijeme tretmana, Petrijeve zdjelice s jajima su otklopljene kako bi se osigurao učinak UV zračenja na jaja.
- 3) **Ionizacijskim zračenjem** - jaja su izložena ionizacijskom zračenju na udaljenosti 307 cm od centra izvora i visini 72 cm od poda. Korišten je panoramski izvor gama zračenja 60-Co, energije 1.25 MeV, brzine doze 24.5 mGy/s, a vrijeme zračenja bilo je 8.5 sekundi. Apsorbirana doza zračenja bila je 0.264 Gy. Zračenje je provedeno u Laboratoriju za radijacijsku kemiju i dozimetriju Instituta „Ruđer Bošković“ u Zagrebu.
- 4) **Centrifugalnom silom** - jaja su premještena u epruvete i centrifugirana na 4600 rpm u trajanju od 2 sata. Jaja su u epruvetama bila uložena u pamučnu vatu, kako bi se spriječilo gnječenje uzrokovano centrifugalnom silom. Na temelju prethodnih istraživanja (Pijnacker, 1966), centrifugiranjem su tretirana samo „najmlađa“ jaja, starosti jedan do dva tjedna (Tablica 1).

3.2.4. Održavanje tretiranih jaja i izlegnutih nimfi paličnjaka

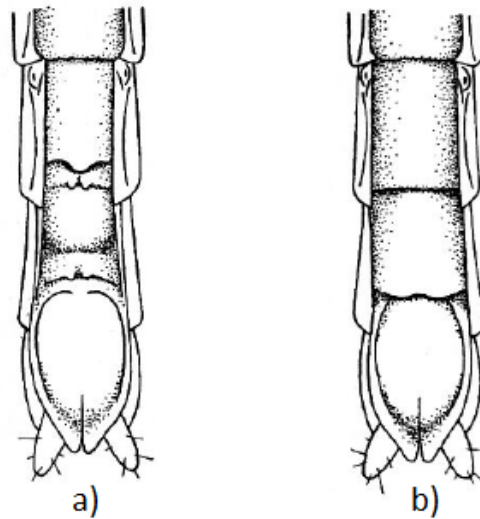
Nakon tretmana, jaja su držana u Petrijevim zdjelicama u istim uvjetima kao i prije tretmana. Nakon što je zabilježeno prvo izlijeganje juvenilnih jedinki (nimfa), one su prebačene u terarij koji je imao zasebne odjeljke za svaku tretiranu i kontrolnu skupinu jaja iz kojih su se izlijegale nimfe (Slika 2). Dimenzije odjeljaka u terariju bile su: 106 x 109 x 392 mm, a gornja ploha je pokrivena mrežicom kako bi zrak mogao cirkulirati. Izlegnute nimfe brojane su dva puta tjedno u razdoblju od 9. siječnja do 6. ožujka 2018. godine, a nakon tog razdoblja nimfe su se sporije izlijegale iz jaja pa je terarij pregledavan jednom tjedno sve do 20. ožujka.



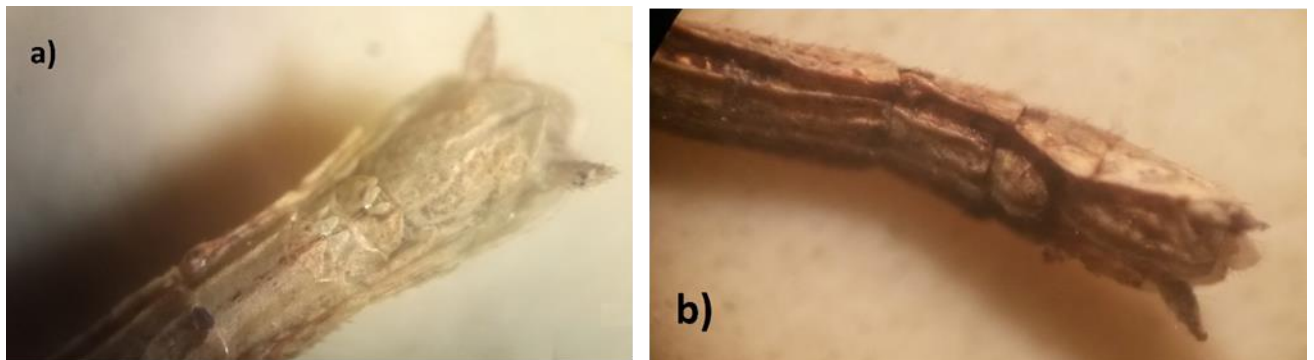
Slika 2. Uvjeti držanja jaja i izgled nimfi neposredno nakon izlijeganja (a) te shematski prikaz (b) i fotografija terarija (c) s odjeljcima u kojemu su nimfe paličnjaka držane nakon izlijeganja
(Fotografija: Dora Čuljak)

3.2.5. Određivanje spola nimfi paličnjaka

Spol je određivan na temelju morfologije zatka, odnosno na temelju građe vanjskih spolnih organa. Pri određivanju korišten je stereo-mikroskop Pro-lux, paličnjaci su promatrani pri ukupnom povećanju 40x, a kao ključ za određivanje spola korišten je slikovni prilog u publikaciji Wilbert (1953) (Slika 3) te fotografija zatka ženke i mužjaka vrste (Slika 4) koja je napravljena tijekom istraživanja.



Slika 3. Izgled trbušne (ventralne) strane zatka ovisno o spolu; a) ženka nakon prvog presvlačenja, b) mužjak nakon prvog presvlačenja (preuzeto iz: Wilbert, 1953)



Slika 4. Fotografija ventralne strane zatka; a) ženke, b) mužjaka
(Fotografija: Tea Hutten)

3.2.6. Kvantitativna obrada podataka

Svi grafički prikazi rezultata istraživanja izrađeni su u programu Microsoft Office Excell (Version 10.0), a statističke analize u programu Statistica (Version 13.3). S obzirom da su se u pojedinim starosnim skupinama nalazio različit broj jaja svi rezultati prikazani su kao %-tni udjeli u ukupnom broju tretiranih jaja u skupini. Kako bi se utvrdilo postoji li statistički značajna razlika između pojedinih starosnih kategorija jaja u broju izlegnutih jedinki i broju mužjaka za svaki pojedini tretman upotrijebljene su 2 x 7 kontingencijske tablice te je izračunat χ^2 pomoću algoritma na mrežnoj stranici http://www.physics.csbsju.edu/stats/contingency_NROW_NCOLUMN_form.html, a za tretman centrifugom 2 x 2 kontingencijske tablice.

Za utvrđivanje korelacije između broja izlegnutih mužjaka i broja izlegnutih nimfi upotrijebljen je neparametrijski Spearmanov test korelacije, a za utvrđivanje statističke značajnosti razlika u broju izlegnutih nimfi i broju mužjaka između kontrole i pojedinih tretmana neparametrijski Kruskal-Wallisov test u programu Statistica. Mann-Whitney U neparametrijskim testom uspoređen je % izlegnutih nimfi i % mužjaka za dvije starosne kategorije jaja (jedna i dva tjedna starosti) između kontrole i skupine tretirane centrifugalnom silom. U statističkim analizama korištena je razina značajnosti od 5 % ($p < 0,05$).

4. Rezultati

Budući da su jaja grupirana po tjednima u kojima su prikupljena, te je izlijeganje praćeno svakih nekoliko dana. U Tablici 2. prikazan je aproksimativni broj dana (± 3 dana) potrebnih za izlijeganje nimfi u kontrolnoj i tretiranim skupinama jaja različite starosti.

Tablica 2. Vrijeme potrebno za izlijeganje nimfi (u danima) u različitim starosnim kategorijama jaja (od jednog do 7 tjedana starosti) u kontrolnoj i tretiranim skupinama

STAROST JAJA (tjedni)	7	6	5	4	3	2	1	Prosječno vrijeme za sve starosne kategorije
KONTROLA	50	45	45	50	50	45	50	48
TEMPERATURA	/	55	45	50	80	65	70	61
CENTRIFUGA	/	/	/	/	/	70	65	68
UV - 3h	60	40	45	50	50	55	60	51
UV - 6h	50	45	45	55	50	45	55	49
IONIZACIJSKO ZRAČENJE	60	40	45	50	50	45	50	49

Nimfe su se iz jaja počele izlijevati najranije nakon 40 dana inkubacije u Petrijevim zdjelicama, a zadnje nimfe izlijegale su se nakon 80 dana (Tablica 2). Najkraće prosječno vrijeme izlijeganja jaja svih starosnih kategorija zabilježeno je u kontrolnoj skupini (48 dana), a najduže u skupini jaja tretiranih centrifugalnom silom (68 dana). U tretmanima UV i ionizacijskim zračenjem za izlijeganje nimfi je prosječno bilo potrebno oko 50 dana, a u tretmanu povišenom temperaturom 10 dana više.

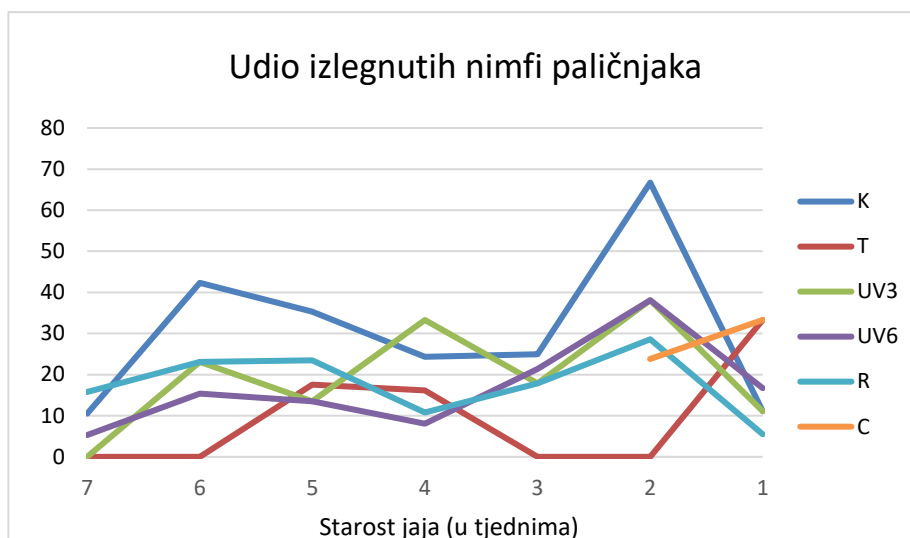
Od ukupno 947 skupljenih jaja, nimfe su se izlegle iz njih 184 (19,43 %). U tretiranim skupinama izleglo se u prosjeku 18,47 % jaja, dok se u kontrolnoj skupini izleglo 30,7 % jaja. Pojedinačne prosječne vrijednosti % uspješno izlegnutih jaja iznosile su slijedom za kontrolu, tretmane temperaturom, UV zračenjem tijekom tri i 6 sati, ionizacijskim zračenjem i temperaturom: 30,7 %; 9,6 %; 19,6 %, 17 %; 17,9 % i 28,6 %. Usporedbom broja izlegnutih nimfi u pojedinim starosnim kategorijama jaja kontrolne i svih tretiranih skupina utvrđene su statistički značajne razlike u % izlegnutih jaja između različitih starosnih kategorija samo za tretman temperaturom (Tablica 3).

Tablica 3. Statistička značajnost razlika u broju izlegnutih nimfi između različitih starosnih kategorija jaja za kontrolnu i svaku pojedinu tretiranu skupinu (* označene razlike koje su statistički značajne)

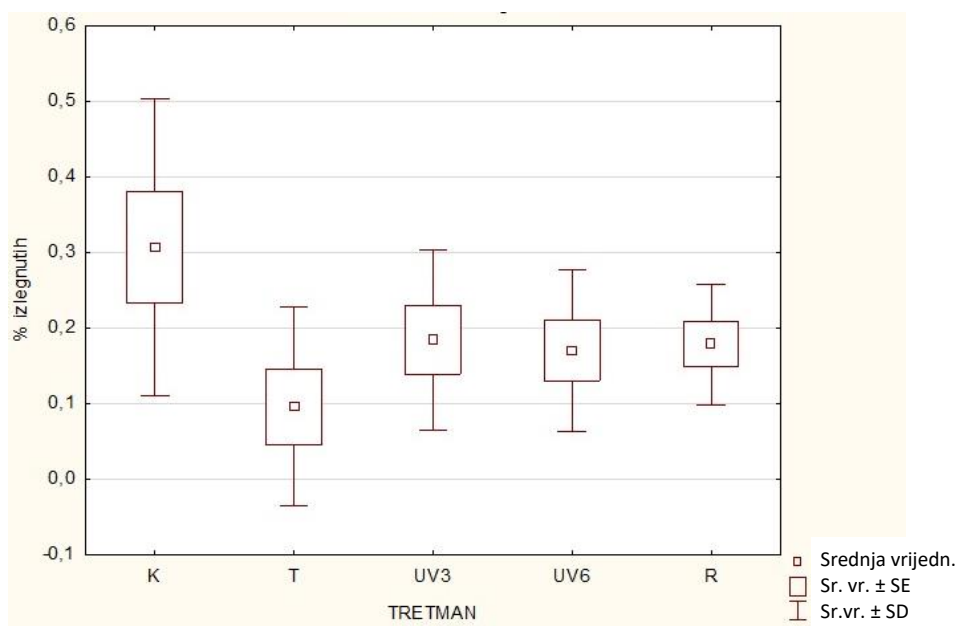
TRETMAN	df	p
KONTROLA	6	0,085
TEMPERATURA	6	0,003*
UV - 3h	6	0,241
UV - 6h	6	0,27
IONIZACIJSKO ZRAČENJE	6	0,643

Za tretman centrifugalnom silom kojem su podvrgnute samo dvije starosne kategorije jaja također nije utvrđena statistički značajna razlika u % izlegnutih nimfi između jaja starih jedan i dva tjedna ($df = 1$, $p = 0,623$)

Srednja vrijednost uspješnosti izlijeganja jaja u kontrolnoj skupini za sve starosne kategorije iznosila je 30,7 %. U skupinama jaja starih dva, tri, 6 i 7 tjedana tretiranih povišenom temperaturom iz jaja se uopće nisu izlegle nimfe (Slika 5). Također, najmanji broj jaja iz kojih su se izlegle nimfe zabilježen je u skupini tretiranoj povišenom temperaturom u kojoj se izleglo samo 9,84 % jaja. Iz Slike 5 vidljivo je da je broj izlegnutih nimfi u svim tretmanima manji nego u kontrolnoj skupini. Međutim, Kruskal-Wallis neparametrijskim testom (Slika 6), kojim nije obuhvaćen tretman centrifugalnom silom radi samo dvije tretirane starosne kategorije jaja, utvrđeno je da te razlike nisu statistički značajne ($df = 4$, $p = 0,3903$). Za tretman centrifugalnom silom koji je uspoređen s kontrolnom skupinom Mann-Whitney U testom za jaja stara jedan i dva tjedna također nisu utvrđene statistički značajne razlike u % izlegnutih nimfi za te dvije skupine jaja ($p = 1,000$).



Slika 5. Udio izlegnutih nimfi paličnjaka s obzirom na tretman i starost jaja (K – kontrola, T – tretman povišenom temperaturom; UV3 i UV6 – tretmani UV zračenjem tijekom tri i 6 sati; R – tretman ionizacijskim zračenjem; C – tretman centrifugalnom silom)



Slika 6. Analiza % izlegnutih nimfi za kontrolu i četiri tretirane skupine napravljena Kruskal-Wallis testom (K – kontrola, T – tretman povišenom temperaturom; UV3 i UV6 – tretmani UV zračenjem tijekom tri i 6 sati; R – tretman ionizacijskim zračenjem; C – tretman centrifugalnom silom)

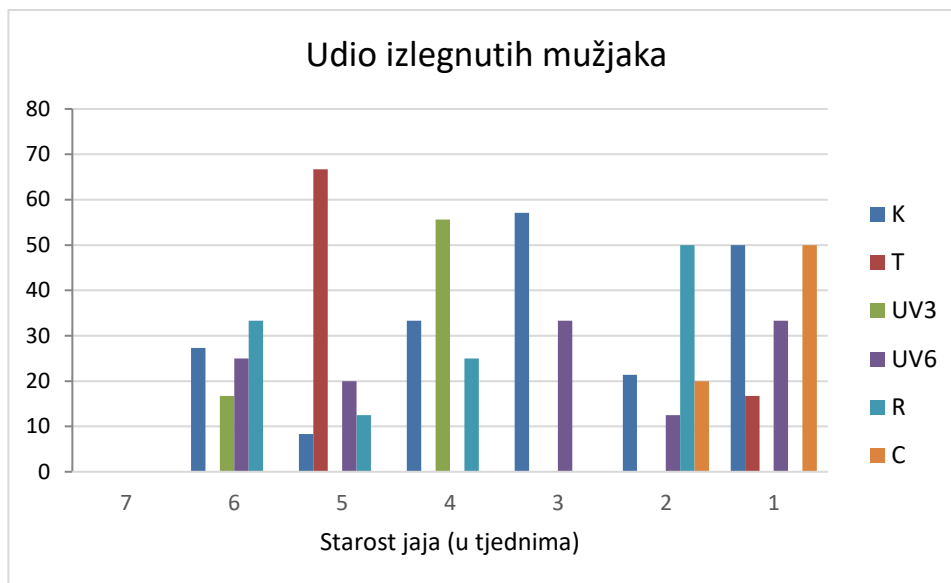
Prvo presvlačenje uočeno je u rasponu od 15 do 32 dana od izlijeganja nimfi, a prosječno su im bila potrebna 24 dana. Najbrže su se presvukle nimfe iz skupine jaja starosti tri tjedna tretiranih UV-zračenjem tijekom 6 sati, a najsporije nimfe iz kontrolne skupine jaja starosti pet tjedana.

Determinacijom spola nakon prvog presvlačenja u svim istraživanim skupinama ukupno je zabilježena 141 ženka i 43 mužjaka. Broj izlegnutih mužjaka u pozitivnoj je i statistički značajnoj korelaciji s brojem izlegnutih jedinki ($r = 0,34844^*$, $p < 0,05$, $N = 37$). Usporedbom broja izlegnutih mužjaka u pojedinim starosnim kategorijama jaja kontrolne i svih tretiranih skupina utvrđene su statistički značajne razlike u % izlegnutih mužjaka između različitih starosnih kategorija za tretmane temperaturom i UV- zračenjem tijekom tri sata (Tablica 4). Za tretman centrifugalnom silom razlika u % izlegnutih mužjaka između dviju starosnih kategorija također nije bila statistički značajna ($df = 0,1$, $p = 0,623$).

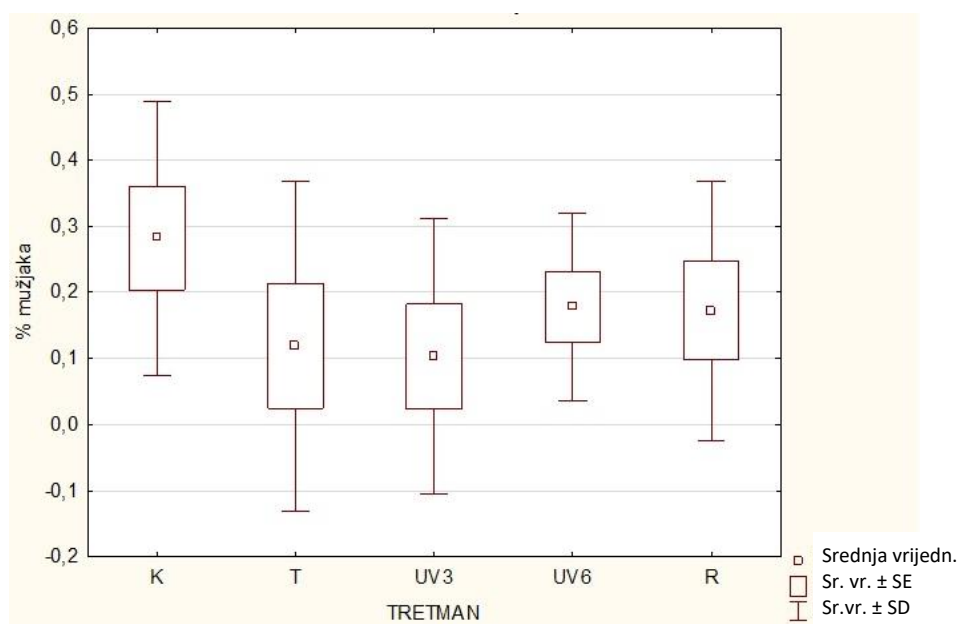
Tablica 4. Statistička značajnost razlika u broju izlegnutih mužjaka između različitih starosnih kategorija jaja za kontrolnu i svaku pojedinu tretiranu skupinu (* označene razlike koje su statistički značajne)

TRETMAN	df	p
KONTROLA	6	0,309
TEMPERATURA	2	0,027*
UV – 3h	5	0,019*
UV – 6h	6	0,886
IONIZACIJSKO ZRAČENJE	6	0,388

Udio izlegnutih mužjaka u svim starosnim kategorijama, kontroli i tretmanima prikazan je na Slici 7. Prosječni % mužjaka u kontroli iznosio je 32,9 %, a u tretmanima temperaturom, UV3, UV6, ionizacijski zračenjem i centrifugalnom silom slijedom: 41,7 %; 36,2 %; 24,8 %; 30,2 % i 35 %. Najveći % izlegnutih mužjaka zabilježen je u skupini tretiranoj povišenom temperaturom među jajima starih pet tjedana, 67 % izlegnutih nimfi bile su muškog spola, a najmanji u kontrolnoj skupini za jaja iste starosne kategorije (8,3 %) (Slika 7). Kruskal-Wallis testom (Slika 8) utvrđeno je da nema statistički značajne razlike u % izlegnutih mužjaka između četiri tretirane skupine i kontrole ($df = 4$, $p = 0,4177$), dok je Mann-Whitney U testom također utvrđeno da razlika u % izlegnutih mužjaka između kontrole i skupine tretirane centrifugalnom silom za dvije starosne kategorije jaja također nije statistički značajna ($p = 0,3333$).

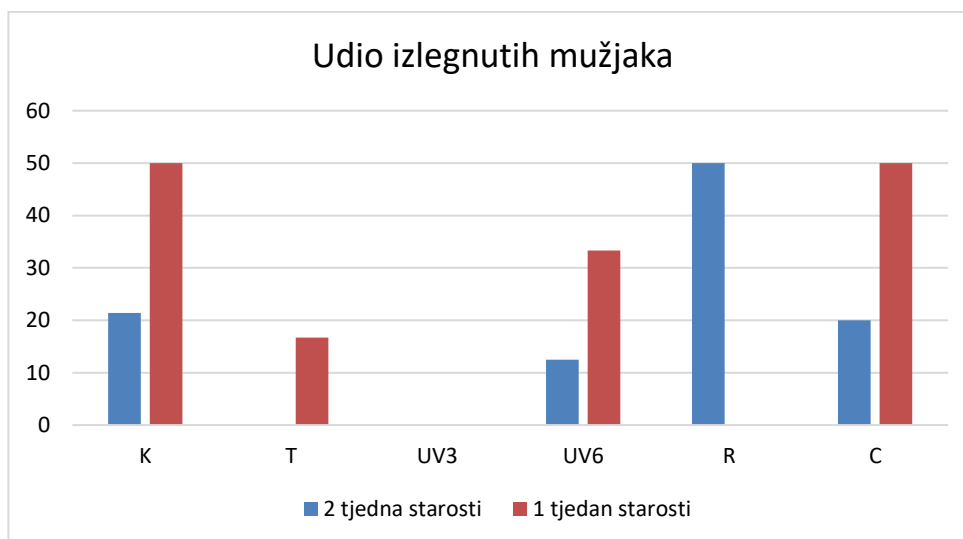


Slika 7. Udio izlegnutih mužjaka po skupinama u odnosu na starost jaja (K – kontrola, T – tretman povišenom temperaturom; UV3 i UV6 – tretmani UV zračenjem tijekom tri i 6 sati; R – tretman ionizacijskim zračenjem; C – tretman centrifugalnom silom)



Slika 8. Analiza % izlegnutih mužjaka za kontrolu i četiri tretirane skupine napravljena Kruskal-Wallis testom (K – kontrola, T – tretman povišenom temperaturom; UV3 i UV6 – tretmani UV zračenjem tijekom tri i 6 sati; R – tretman ionizacijskim zračenjem; C – tretman centrifugalnom silom)

Zasebno su uspoređeni % izlegnutih mužjaka za jaja stara jedan i dva tjedna za kontrolu i svih pet tretmana (uključujući tretman centrifugalnom silom) koji su prikazani na Slici 9. Kruskal-Wallis testom nisu utvrđene statistički značajne razlike među tretmanima za dvije starosne kategorije jaja niti u % izlegnutih nimfi ($df = 5$, $p = 0,7103$), niti u % izlegnutih mužjaka ($df = 5$, $p = 0,1562$).



Slika 9. Udio izlegnutih mužjaka ovisno o tretmanima za dvije starosne kategorije jaja

5. Rasprava

Prosječno vrijeme potrebno za izlijeganje nimfi vrste *M. extradentata* zabilježeno u našem istraživanju (49 dana) znatno je kraće u odnosu na literaturne podatke za slične vrste istog reda pa je tako primjerice za vrstu indijski paličnjak *Carausius morosus* (Sinéty, 1901) Wilbert (1953) zabilježio da je potrebno 100 dana za izlijeganje, a Bergerard (1961) 80 dana. Pretpostavljamo da su se vijetnamski paličnjaci kroz desetljeće uzgoja na fakultetu dobro prilagodili postojećim uzgojnim uvjetima te je to utjecalo na relativno kratko vrijeme embrionalnog razvitka. Kako nisu pronađeni podaci o trajanju embrionalnog razvitka za tu vrstu u prirodnom okuženju ne možemo utvrditi da li postojeći uvjeti skraćuju ili produljuju to vrijeme. Od prosječnog zabilježenog vremena potrebnog za izlijeganja u našem istraživanju odskaku vrijednosti dobivene za jaja tretirana povišenom temperaturom za čije izlijeganje je bilo potrebno prosječno 56 dana, dok su za jaja tretirana centrifugalnom silom bila potrebna čak 63 dana. Kako je pri tretmanu povišenom temperaturom ujedno zabilježen i najmanji % izlegnutih nimfi možemo pretpostaviti da je povišena temperatura u našem istraživanju negativno utjecala na embrionalni razvitak vijetnamskog paličnjaka što je u suprotnosti s nalazima Wilberta (1953) koji je za jaja tretirana povišenim temperaturama zabilježio uspješnost izlijeganja nimfi od 59,2 % (za temperaturu od 45 °C) i 78 % (za temperaturu od 35 °C). Za tretman centrifugalnom silom u našem istraživanju je zabilježen niski % izlijeganja nimfi (28,2 %) što je bitno različito od podatka u istraživanju Pijnacker-a (1966) provedenom na indijskom paličnjaku za koje je zabilježeno 66,7 % izlegnutih nimfi u istoj starosnoj kategoriji jaja. Možemo pretpostaviti da tretmani povišenom temperaturom i centrifugalnom silom negativno utječu na embrionalni razvitak vijetnamskog paličnjaka tako što odgađaju izlijeganje i povećavaju smrtnost (Tablica 2, Slika 5). Kako bi se pouzdano utvrdio učinak temperature i centrifugalne sile na embrionalni razvitak vijetnamskog paličnjaka bilo bi potrebno provesti istraživanje na znatno većem uzorku.

Srednja vrijednost uspješnosti izlijeganja nimfi za sve starosne kategorije jaja kontrolne skupine bila je vrlo niska i iznosila je samo 30,7 %, što je slično vrijednostima dobivenim u istraživanju Pijnacker-a (1966) od 35,38 % za vrstu indijski paličnjak, ali znatno manje od vrijednosti dobivenih za istu vrstu u kasnijim istraživanjima Pijnackera (1971) - oko 90 % te vrijednosti od 67,9 % zabilježenoj u istraživanju Wilbert-a (1953). Vrlo je mali broj izlegnutih nimfi u najstarijim i najmlađim skupinama jaja, a tome bi razlog moglo biti determinističko brazdanje jaja u kukaca (Gullan i Cranston, 2014). Najmlađa jaja tretirana su u najranijem periodu; budući da je brazdanje determinističko, ukoliko se ošteti jedna od stanica, druge ne

mogu preuzeti njenu ulogu niti se razviti u smjeru u kojem bi se trebale razviti. Tako su najmlađa jaja koja su bila oštećena tretmanom propala, te se nimfe nisu izlegle jer se ni embriogeneza nije odvila do kraja. Popravci su mogući sredinom embriogeneze, gdje već ima više stanica koje su diferencirane za neku ulogu, pa ako propadne jedna od njih, moguće ju je nadomjestiti. Najstarija jaja bila su u završnoj fazi embriogeneze pa pretpostavljamo da se oštećenja nisu stigla popraviti i stoga su se pokazala letalnim za embrije vijetnamskog paličnjaka.

Pretpostavljamo da uspješnost izlijeganja nimfi različitih vrsti paličnjaka ovise i o nizu abiotičkih i biotičkih čimbenika u uzgojnim kulturama (temperaturi, vlažnosti, gustoći populacije u terarijima i sl.). U svim tretmanima zabilježen je niži prosječni % izlegnutih jedinki za sve starosne kategorije u odnosu na kontrolnu skupinu, ali ta razlika nije bila statistički značajna. Razlika u % izlegnutih jedinki među različitim starosnim kategorijama jaja bila je statistički značajna samo za tretman temperaturom (Tablica 3), što govori u prilog pretpostavci da temperatura najviše utječe na embrionalni razvitak vijetnamskog paličnjaka. Najmanji prosječni % izlegnutih nimfi za sve starosne kategorije jaja također je zabilježen pri tretmanu temperaturom i iznosio je samo 9,6 %. U istraživanju Pijnacker-a (1971) se nakon tretiranja ionizacijskim zračenjem veće snage izleglo 90 % nimfi indijskog paličnjaka, dok je u našem istraživanju nakon tog tretmana uz manju snagu zračenja izlegnuto prosječno samo 17,9 % nimfi što govori o negativnom učinku tog zračenja na embrionalni razvoj vijetnamskog paličnjaka. Ovakva, neočekivano niska stopa izlijeganja nimfi smanjila je broj nimfi kojima je određivan spol, pa je mali uzorak vrlo vjerojatno utjecao na daljnje statističke analize u istraživanju.

Udio mužjaka bio je u pozitivnoj i statistički značajnoj korelaciji s % ukupno izlegnutih nimfi što znači da se udio mužjaka proporcionalno povećava s brojem izlegnutih nimfi odnosno da je udio mužjaka u populaciji relativno stalan, ali tu pretpostavku treba provjeriti. Kako su razlike u % izlegnutih mužjaka među različitim starosnim kategorijama jaja (Tablica 4) bile statistički značajne samo za tretmane temperaturom i UV-zračenjem tijekom tri sata to govori u prilog činjenici da ovi tretmani vjerojatno imaju učinka na određene stadije embriogeneze i pojavu mužjaka u populaciji, no zbog malog uzorka ovu pretpostavku bi svakako trebalo dodatno istražiti. Također, prosječni % izlegnutih mužjaka ponovno je bio najviši (41,7 %) u skupini jaja tretiranih temperaturom, dok se u ostalim tretmanima nije bitno razlikovao od kontrole i iznosio je oko 30 % što potvrđuje pretpostavku da je temperatura čimbenik koji najviše utječe na strategiju razmnožavanja vijetnamskih paličnjaka.

Za pouzdanije rezultate, istraživanje bi trebalo ponoviti na znatno većem broju jaja. Klimatske promjene koje su dovele do povišenja prosječne temperature zraka i vode u raznim klimatskim regijama Zemlje mogle bi dovesti do promjena reproduktivnih ciklusa i strategija razmnožavanja u različitim skupina organizama (Abucaya i sur., 1999; Janzen i Paukstis, 1991), uključujući i kukce koji su najbrojnija skupina životinja čemu u prilog govore rezultati našeg istraživanja.

Zanimljiva je činjenica da je % izlegnutih mužjaka u skupini tretiranoj centrifugalnom silom vrlo sličan % izlegnutih mužjaka u kontrolnoj skupini i iznosi oko 33 % što bi moglo ukazivati na činjenicu da ovaj tretman bitno ne mijenja reproduktivnu strategiju vijetnamskog paličnjaka. Pijnacker (1966) je tretiranjem jaja centrifugalnom silom dobio samo 5 % mužjaka indijskog paličnjaka, što je znatno manje nego u našem istraživanju, iako zbog malog uzorka u našem istraživanju rezultati nisu sasvim pouzdani i usporedivi.

Očekivalo se da će tretmani u nekoj mjeri povećati učestalost pojave mužjaka, kao što je bio slučaj u drugim prethodnim istraživanjima na indijskom paličnjaku (Wilbert, 1953; Pijnacker, 1966; Pijnacker, 1971; Bergerard, 1961), no % izlegnutih mužjaka nije statistički značajno različit između kontrolne i tretiranih skupina. Pretpostavljamo da je to rezultat relativno malog uzorka, odnosno, malog broja izlegnutih nimfi u svim skupinama. Također, razlog tome moglo bi biti držanje paličnjaka u uzgoju 10-tak godina, u uvjetima visoke gustoće populacije i malog prostora koji sami po sebi predstavljaju stresne uvjete zbog kojih se i u kontrolnoj skupini pojavilo oko 30 % mužjaka, slično kao i u nekim tretiranim skupinama. Mužjacima vrste *M. extradentata* mimikrija je manje izražena nego ženka. Više se kreću, površina tijela im je glatka i nemaju nabore na nogama (Slika 1). Time su uočljiviji predatorima pa bi u prirodnim uvjetima predatori nakon nekog vremena smanjili njihov broj te bi se populacija vjerojatno vratila u partenogenetski ciklus. U uzgojnim uvjetima mužjaci nemaju predatora pa to također pogoduje njihovoj većoj učestalosti već u kontrolnoj skupini, a zbog toga vjerojatno ni tretmani nisu uzrokovali pojavu većih odstupanja. Podložnost mužjaka vijetnamskog paličnjaka predatorima u prirodnim populacijama vjerojatno ne šteti populaciji jer nakon prenošenja gena u stresnim (promjenjivim) uvjetima povećava se *gene pool* vrste i time su obavili svoju zadaću.

Provedenim istraživanjem po prvi puta je praćen ciklus razmnožavanja vijetnamskog paličnjaka u uzgojnoj kulturi na Zoologijskom zavodu PMF-a u Zagrebu.

6. Zaključci

Temeljem provedenog istraživanja možemo zaključiti:

- Prosječno vrijeme potrebno za izlijeganje nimfi vijetnamskih paličnjaka u uzgojnoj kulturi je 49 dana.
- Udio izlijeganja nimfi vijetnamskih paličnjaka u kontrolnoj skupini iznosio je 31,2 %.
- Udio izlegnutih nimfi za sve tretirane skupine jaja bio je niži nego u kontrolnoj skupini, međutim ta razlika nije bila statistički značajna.
- Udio izlegnutih nimfi između različitih starosnih kategorija jaja bio je statistički značajno različit jedino za jaja tretirana povišenom temperaturom.
- Do prvog presvlačenja nimfi bilo je potrebno prosječno 24 dana.
- Udio mužjaka je u pozitivnoj i statistički značajnoj korelaciji s udjelom ukupno izlegnutih nimfi.
- Razlike u udjelu izlegnutih mužjaka među različitim starosnim kategorijama jaja statistički su značajne samo za tretmane temperaturom i UV zračenjem tijekom tri sata.
- Razlika u udjelu izlegnutih mužjaka između tretiranih skupina i kontrole nije statistički značajna iako je udio izlegnutih mužjaka bio prosječno najviši u skupini jaja tretiranih povišenom temperaturom, a u svim ostalim tretmanima nije se bitno razlikovao od kontrolne skupine.
- Radi neočekivano malog broja izlegnutih nimfi istraživanje je potrebno ponoviti na znatno većem uzorku.

7. Zahvale

Veliko hvala izv. prof. dr. sc. Jasni Lajtner na mentorstvu.

Iznimno zahvaljujemo suvoditeljici dr. sc. Andreji Lucić što nam je predložila i omogućila da krenemo u ovo istraživanje, za motivaciju koju nam je dala, za svo vrijeme koje je uložila u ovaj rad, te za iskustvo koje smo stekle.

Također, iznimno veliko hvala mag. biol. exp. Josipu Skeji na neiscrpnom izvoru ideja, objašnjenja, savjeta i smijeha.

Hvala dr. sc. Mariji Majer i Institutu Ruđer Bošković što su nam omogućili tretman ionizacijskim zračenjem i na savjetima vezanim uz doziranje zračenja.

Zahvaljujemo laboratorijima Biološkog odsjeka PMF-a u Zagrebu na ustupljenim uređajima za tretmane povišenom temperaturom, centrifugalnom silom i UV-zračenjem.

Hvala tehničaru Zoologijskog zavoda, Siniši Vajdiću na svojoj pomoći i ustupcima tijekom provođenja pokusa u uzgojnim laboratorijima.

8. Popis literature

- Abucaya, J.S., Mairb, G.C., Skibinskib, D.O.F., Beardmoreb, J.A. (1999): Environmental sex determination: the effect of temperature and salinity on sex ratio in *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture*, 173 (1-4), 219-234
- Bergerard, J. (1961): Analyse de la période sensible à la température pour la différenciation sexuelle de *Carausius morosus*. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences*, 253 (19), 2149.
- Bergerard, J. (1972): Environmental and physiological control of sex determination and differentiation. *Annual Review of Entomology*, 17, 54-74
- Boucher, S., Varady-Szabo, H. (2005): Effects of different diets on the survival, longevity and growth rate of the Annam stick insect, *Medauroidea extradentata* (Phasmatodea: Phasmatidae). *Journal of Orthoptera Research*, 14 (1), 115-118
- Gullan, P.J., Cranston, P.S. (2004): *The Insects: an outline of entomology*. Wiley Blackwell, West Sussex, UK
- Habdija, I., Primc Habdija, B., Radanović, I., Špoljar, M., Matoničkin Kepčija, R., Vujčić Karlo, S., Miliša, M., Ostojić, A., Sertić Perić, M. (2011): Protista - Protozoa; Metazoa – Invertebrata. Alfa, Zagreb, Hrvatska, 432-433
- Hoekstra R.F. (1987): The evolution of sexes. U: Stearns S.C. (ur.): *The Evolution of Sex and its Consequences. Experientia Supplementum*, 55
- Janzen , F.J., Paukstis, G.L. (1991): Environmental Sex Determination in Reptiles: Ecology, Evolution, and Experimental Design. *The Quarterly Review of Biology*, 66 (2), 149-179
- Liehr, T., Buleu, O., Karamysheva, T., Bugrov, A., Rubtsov, N. (2017): New Insights into Phasmatodea Chromosomes. *Genes*, 8 (11), 327
- Milani, L., Ghiselli, F., Pellecchia, M., Scali, V., Passamonti, M. (2010): Reticulate evolution in stick insects: the case of *Clonopsis* (Insecta Phasmida). *BMC Evolutionary Biology*, 10, 258
- More, E. (1996): Parthenogenesis explained. *Phasmid studies*, 5 (1 i 2), 62-69

- Normark, B.B. (2002): The evolution of alternative genetic systems in insects. *Annual Review of Entomology*, 48, 397-423
- Pijnacker, L.P. (1971): Effects of x-rays on different meiotic stages of oocytes in the parthenogenetic stick insect *Carausius morosus*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 13 (3), 251-262
- Pijnacker, L.P. (1966): Effect of Centrifugation of the Eggs on the Sex of *Carausius morosus* Br. *Nature*, 210, 1184
- Sánchez, L. (2008): Sex-determining mechanisms in insects. *Int. J. Dev. Biol.*, 52, 837-856
- Scali, V. (2009): Stick insects: parthenogenesis, polyploidy and beyond. *Life and Time: The Evolution of Life and its History*, 171-192
- Stearns, S.C. (1987): Why sex evolved and what differences it makes. U: Stearns S.C. (ur.): The Evolution of Sex and its Consequences. *Experientia Supplementum*, 55
- Stearns, S.C., Hoekstra, R.F. (2005): Evolution: an introduction. Oxford University Press, Oxford, UK
- Wilbert, H. (1953): Normales und experimentell beeinflusstes Auftreten von Männchen und Gynandromorphen der Stabheuschrecke. *Zool. Jahrb., Physiol.* 64, 470-495

Korištene mrežne stranice:

http://www.phasmatodea.com/web/guest/photos?p_p_id=phasmatodeaimagegallery_WAR_phasmatodeade5231_INSTANCE_U96i&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&categoryId=921 (pristupljeno 2. svibnja 2018.)

http://www.physics.csbsju.edu/stats/contingency_NROW_NCOLUMN_form.html
(pristupljeno 2. svibnja 2018.)

9. Sažetak

Tea Hutten, Dora Čuljak

POJAVA MUŽJAKA U VIJETNAMSKOG PALIČNJAKA, *Medauroidea extradentata* (Brunner von Wattenwyl, 1907) KOJI SE RAZMNOŽAVA PARTENOGENEZOM

Unutar populacije vrste *Medauroidea extradentata* (Brunner von Wattenwyl, 1907), vijetnamski paličnjak, uzgajane na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, primijećena je povećana pojava mužjaka iako se jedinke ove vrste uglavnom razmnožavaju partenogenezom, nespolnim načinom pri kojem se neoplođena jajna stanica razvija u novu jedinku, odnosno stvaraju se klonovi majke. Poznato je da u određenim uvjetima dolazi do prelaska na spolni način razmnožavanja pri čemu se pojavljuju i mužjaci pa stoga kažemo da se radi o fakultativnoj partenogenezi. Ovim istraživanjem željeli smo utvrditi koliko je vremena potrebno od polaganja jaja do izlijeganja nimfi vijetnamskih paličnjaka u uzgojnoj populaciji te koliko je vremena potrebno do prvog presvlačenja. Također, pokušali smo ustanoviti koji okolišni čimbenici mogu uzrokovati promjene u učestalosti pojave mužjaka unutar populacije uzgajane na fakultetu. Istražen je učinak četiri čimbenika: povišene temperature, ultraljubičastog zračenja, ionizirajućeg zračenja te centrifugalne sile. Jaja paličnjaka skupljana tijekom 7 tjedana jednokratno su izložena djelovanju navedenih čimbenika. Nakon što su se iz jaja izlegle nimfe i jednom presvukle, determiniran je spol jedinki. Osim pojave mužjaka unutar tretiranih skupina, zabilježen je i ukupan broj izlegnutih jedinki. Rezultati istraživanja pokazuju da u tretiranih skupina, u usporedbi s kontrolnom, nema statistički značajnih razlika u ukupnom broju izlegnutih jedinki, kao ni u broju izlegnutih mužjaka. Od polijeganja jaja do izlijeganja jaja bilo je potrebno prosječno 49 dana, a potom je do prvog presvlačenja nimfi proteklo prosječno 24 dana. Pretpostavljamo da već sami uvjeti uzgoja jedinki vijetnamskog paličnjaka u zatočeništvu uzrokuju dovoljan stres koji uvjetuje spolno razmnožavanje i pojavu mužjaka u populaciji.

Ključne riječi: *Medauroidea extradentata*, fakultativna partenogeneza, telitokija

10. Summary

Tea Hutten, Dora Čuljak

INCIDENCE OF MALE INDIVIDUALS IN POPULATION OF VIETNAMESE STICK INSECT, *Medauroidea extradentata* (Brunner von Wattenwyl, 1907) THAT REPRODUCE BY PARTHENOGENESIS

Within a population of the species *Medauroidea extradentata* (Brunner von Wattenwyl, 1907), Vietnamese stick insect, which has been grown at Department of Biology, Faculty of Science in Zagreb, a higher number of male individuals was noticed despite the fact that this species usually reproduces by parthenogenesis. Parthenogenesis is an asexual way of producing egg cells that are not being fertilized and grow into a new individual - a clone of the mother. It is well known that in certain conditions this species starts reproducing in a sexual way. Therefore, male individuals appear and that is what we call facultative parthenogenesis. In this research, the aim was to establish time needed from laying to hatching nymph of Vietnamese stick insect grown at the Faculty as well as time needed for nymph to moult for the first time. Moreover, we tried to determine which environmental factors could cause change in the frequency of male incidence within the population grown at the Faculty. The effects of four factors were investigated: higher temperature, ultraviolet radiation, ionizing radiation and centrifugal force. The eggs of the stick insects were collected through a period of 7 weeks and exposed to previously listed environmental factors. After the nymphs had hatched and moulted, their sex has been determined. Beside the incidence of the male individuals in particular treatment, total number of hatched nymphs was also been recorded. The results indicated that there were no statistically significant differences between the control and treated groups in number of hatched nymph as well as in the number of male individuals that appeared. Furthermore, from laying eggs to the hatching it was recorded average duration of 49 days and from hatching to the first moulting 24 days. We assume that the mere conditions of breeding this species in captivity was already enough stressful to cause sexual reproduction and appearance of males.

Key words: *Medauroidea extradentata*, facultative parthenogenesis, thelitoky