

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Mateo Miloš

Brzina probave dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*)

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj rad, izrađen na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Duje Lisičića, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

Zahvale

Prije svega, zahvaljujem se mentoru doc. dr. sc. Duji Lisičiću na svom trudu, poticanju i pomoći bez koje ovaj rad nikad ne bi bio napisan. Pokazao se kao izuzetno entuzijastičan i pristupačan profesor i mentor, što se i očekuje od sunarodnjaka po Dioklecijanu.

Veliko hvala i dipl.ing. biol. Maji Damjanović na svojoj pomoći i savjetima oko eksperimentalnog dijela rada, upoznavanja sa dragim nam „Dinaćima“, kao i na prijateljskom i ljubaznom druženju u Zoološkom vrtu grada Zagreba.

Zahvaljujem se i laboratorijskoj tehničarki Mariji Potočić, kao i ostalim djelatnicima Zavoda za animalnu fiziologiju na pomoći i ugodnom društvu tokom laboratorijskih analiza.

Hvala svim prijateljima i kolegama što su me ljubazno prihvatili nakon dolaska u Zagreb na četvrtoj godini, na svim druženjima tokom nastave, kao i u kantini nakon nje!

Na kraju, hvala mojim roditeljima. Svojom žrtvom, odricanjima i povjerenjem omogućili su mi sretno djetinjstvo, pratiti snove u životu i obrazovanje koje ovim radom stječem. Dug koji nikada neću moći, a zbog toga kakvi su roditelji, ni morati vratiti.

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Brzina probave dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*)

Mateo Miloš

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Biologija dinarskog voluhara slabo je istražena što ostavlja mnogo neodgovorenih pitanja iz područja njihove fiziologije, etologije i genetike. Biljojedi su i u divljini se hrane uglavnom travama i zeljastim biljem. Prehrambena strategija malih biljojednih sisavaca mediteranskog područja obično je konzumacija većih količina hrane i duže zadržavanje hrane u probavnom traktu kako bi kompenzirali nisku energetske profitabilnost hrane. Poznavanje brzine probave neke vrste također pomaže u razumijevanju ponašanja, pogotovo vezano uz prehrambene navike i interakcije sa hranom. Cilj istraživanja je određivanje brzine prolaska hrane kroz probavni trakt dinarskog voluhara. Istraživanje je provedeno na 13 jedinki tokom ljetne i zimske prehrambene sezone. Za istraživanje su korišteni fizikalni markeri u obliku plastičnih trakica. Hrana u potpunosti prolazi kroz probavni trakt u roku od 24 sata nakon što je pojedena, a počinje izlaziti već nakon prva 4 sata. Nisu uočene razlike u brzini probave među sezonama, kao ni među spolovima. Rezultati potvrđuju da je dinarski voluhar cekumski fermentor. Za potpuno poznavanje brzine probave potrebno je istražiti tekuću frakciju probave korištenjem kemijskih metoda.

(32 stranice, 16 slika, 3 tablice, 42 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: dinarski voluhar, brzina probave, fizikalni markeri, sezona, spol

Voditelj: doc. dr. sc. Duje Lisičić

Ocjenitelji: doc. dr. sc. Duje Lisičić

izv. prof. dr. sc. Davor Zanella

izv. prof. dr. sc. Antun Alegro

Rad prihvaćen: 17. veljače, 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation thesis

Digestion rate in Martino's Vole (*Dinaromys bogdanovi*)

Mateo Miloš

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Martino's Vole biology is largely unexplored, which leaves many unanswered questions in fields of their physiology, ethology and genetics. They are herbivores, and in the wild they eat mostly grasses and leafy plants. Dietary strategies of small mammalian herbivores in Mediterranean region is usually consumption of large amounts of food, and longer retention of food in digestive system in order to compensate for low energy profitability of foraged food. Knowing digestion rate of a species also helps in understanding behaviour, especially dietary behaviour and food interactions. The goal of this research is to discover the digestion rate of Martino's Vole. The research was conducted on 13 specimens during summer and winter season. Physical markers in form of small plastic strips were used for researching the digestion rate. Food passes through the digestive tract within 24 hours after it has been eaten, and it starts to exit the tract after the first 4 hours. No differences in digestion rate were noticed between seasons, nor genders. The results confirm that Martino's Vole is a cecum fermenter. For complete understanding of the digestion rate the liquid food fraction should be explored through use of chemical methods of digestion rate research.

(32 pages, 16 figures, 3 tables, 42 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: Martino's Vole, digestion rate, physical markers, season, gender

Supervisor: Dr. Duje Lisičić, Asst. Prof.

Reviewers: Dr. Duje Lisičić, Asst. Prof.

Dr. Davor Zanella, Assoc. Prof.

Dr. Antun Alegro, Assoc. Prof.

Thesis accepted: February 17. 2017.

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Potporodica Arvicolinae	1
1.2. Dinarski voluhar	2
1.2.1. Sistematika i evolucija	2
1.2.2. Filogenija i rasprostranjenost	3
1.2.3. Stanište	4
1.2.4. Stupanj ugroženosti i mjere zaštite	4
1.2.5. Biologija vrste	5
1.3. Istraživanje brzine probave	6
1.4. Obrazloženje teme	7
1.5. Cilj istraživanja	8
2. Materijali i metode	8
2.1. Životinje i uvjeti držanja	8
2.2. Postavke istraživanja	9
2.2.1. Markeri	10
2.2.2. Skupljanje uzoraka	11
2.2.3. Laboratorijska analiza uzoraka	12
2.3. Statistička analiza	13
3. Rezultati	14
3.1. Vremenski okvir probave	14
3.2. Brzina probave ljetne sezone	14
3.3. Brzina probave zimske sezone	20
3.3.1. Brzina probave mužjaka i ženki	20
3.4. Usporedba sezona	26
4. Rasprava	26
5. Zaključak	29
6. Literatura	29

1. Uvod

1.1. Potporodica Arvicolinae

Dinarski voluhar (*Dinaromys bogdanovi*; Martino, 1922) je biljojedni glodavac koji spada u potporodicu Arvicolinae. Potporodica Arvicolinae monofiletska je skupina mišolikih glodavaca (Myomorpha) (Bužan i sur., 2010; Bužan i sur., 2008) čiji su pripadnici voluharice, leminzi i muskrati. Unutar Arvicolinae opisana je 151 vrsta smještena unutar 28 rodova. Razvili su se prije 5,5 milijuna godina (Chaline i sur., 1999) s najstarijim fosilima koji datiraju iz pliocena s područja sjeverozapadne Azije, Europe i Sjeverne Amerike (Musser i Carleton, 2005). Potječu od hrčaka (Cricetidae), a glavna razlika je u morfologiji donje čeljusti. Kod Arvicolinae donja čeljust je kraća i dublja čime im je omogućen jači ugriz. Glavna morfološka razlika između voluhara i leminga je smještaj i veličina donjih sjekutića. Kod hrčaka i voluhara sjekutić je smješten dijagonalno od jezika prema usni između korijena drugog i trećeg kutnjaka. Uz to, voluhari imaju duge donje sjekutiće po čemu su sličniji hrčcima nego leminzi kod kojih su ti sjekutići kratki (Chaline i sur., 1999).

To su glodavci holarktičke distribucije (Bužan i sur., 2010; Nowak, 1999; Carleton i Musser, 1984). U prošlosti je širenje potporodice Arvicolinae bilo kontrolirano geografskim barijerama i klimom (Chaline i sur., 1999). Klimatske fluktuacije tijekom pliocena i pleistocena rezultirale su migracijama sa sjevera na jug i s istoka prema zapadu. Danas su na sjeveru rasprostranjeni do Arktičkog oceana, a na jugu do subtropske zone. Nastanjuju velik raspon staništa; najčešće kopnenih, u umjerenim, borealnim, polarnim i planinskim biomima.

Vrste su uglavnom kopnene, izuzev nekoliko akvatičkih, arborealnih i podzemnih (Feldhamer i sur., 2007). Gnijezda grade ispod zemlje i kamenja, u pukotinama stabala i grana. Neke vrste održavaju kompleksne sustave tunela, ispod zemlje, kroz travu ili ispod snijega. Razlikuju se i prema socijalnim karakteristikama; neke vrste su solitarne, agresivne i teritorijalne, a neke društvene i kolonijalne. (Nowak, 1999; Carleton i Musser, 1984).

Arvicolinae su mali zdepasti glodavci s okruglastim njuškama i repom koji nije dulji od polovine tijela te s kratkim nogama. Prosječna duljina tijela iznosi 10 - 11 cm, duljina repa 3 - 4 cm, teže u prosjeku 17 - 20 g. Jedu uglavnom zelene dijelove biljaka (neke vrste jedu i korijenje te mahovinu). Prehrana im se obično sezonski mijenja u ovisnosti o vrstama dostupnog bilja. Primarno su biljojedi, ali mnoge konzumiraju i druge tipove hrane. Neke vrste skladište hranu u gnijezdima ili skladištima, za upotrebu u periodima manjka hrane. Plijen su brojnim malim grabežljivcima. Većina vrsta je aktivna tijekom cijelog dana, dok su neke vrste strogo noćne, rijetko i dnevne (Nowak, 1999; Carleton i Musser, 1984).

R-seleksijski su tip skupine, imaju brzu izmjenu generacija, kratko žive (0.5 - 2 godine) te rano spolno sazrijevaju (ženke nakon 2 - 3 tjedna, a mužjaci nakon 6 - 8 tjedana starosti) (Bužan i sur., 2008). Većina vrsta potporodice Arvicolinae je promiskuitetna, ali neke vrste formiraju monogamne parove i zajedno brinu o mladima. Mnoge se vrste mogu pariti tijekom cijele godine, dok se neke pare samo tijekom toplijih mjeseci, od proljeća do jeseni. Broj legla

iznosi od jednog do sedam godišnje, a u prosjeku sadrži tri do sedam mladih koji se brzo razvijaju. U divljini uglavnom žive svega nekoliko mjeseci, dok u zatočeništvu mogu živjeti i nekoliko godina (Nowak, 1999; Gruder-Adams i Getz, 1985; Carleton i Musser, 1984).

Kod brojnih vrsta ove skupine sama prisutnost mužjaka potiče ovulaciju kod ženki, čak i bez fizičkog kontakta. Vrijeme normalne gestacije je 21 dan, ali u povoljnim uvjetima se može i skratiti. Mladunci su po porodu maleni, slijepi i nesamostalni. Cijelo leglo teži otprilike 22 – 28 % težine ženke. Broj mladunaca u leglu jako varira, a ovisno o vrsti, može biti od 1 - 12. Najčešće imaju po dva legla godišnje, premda neke vrste mogu imati četiri i više (Macdonald, 2001).

1.2. Dinarski voluhar

1.2.1. Sistematika i evolucija

Dinarski voluhari (Slika 1.) otkriveni su i opisani 1922. godine i svrstani u rod *Chionomys*. Nakon toga vrsta je smještena u rod *Dolomys*, da bi konačno, 1955. godine bili klasicifirani kao rod *Dinaromys* (Bužan i sur, 2008). Rod *Dinaromys* svrstan je u pleme *Pliomyini* čiji je jedini recentni predstavnik (Bužan i sur., 2008). Iz fosilnih nalaza iz perioda pliocena poznate su još dvije izumrle vrste ovog roda (*D. allegranzii* i *D. dalmatinus*), što ukazuje na nisku stopu evolucije (Kryštufek i Bužan, 2008). Klasifikacija Dinarskog voluhara opisana je u Tablici 1.



Slika 1. Dinarski voluhar (preuzeto sa: <http://www.planet-mammiferes.org/drupal/en/node/38?indice=Dinaromys+bogdanovi>, pristupljeno: 18. siječnja 2017.).

Unutar ove politipske vrste je do sad opisano osam podvrsta: *D. b. bogdanovi*, *D. b. coeruleus*, *D. b. grebenscikovi*, *D. b. korabensis*, *D. b. longipedis*, *D. b. marakovici*, *D. b. preniensis* i *D. b. trebevicensis*. Na temelju razlika u morfologiji prvih donjih kutnjaka, podvrste se mogu podijeliti u dvije grupe čiji su glavni predstavnici *D. b. bogdanovi* i *D. b. grebenscikovi* (Kryštufek, 1999; Kryštufek i sur., 2007).

Tablica 1.: Sistematika dinarskog voluhara (prema: Kryštufek, 2008)

Sistematska kategorija	Naziv
Carstvo	Animalia
Koljeno	Chordata
Potkoljeno	Vertebrata
Razred	Mammalia
Red	Rodentia
Porodica	Cricetidae
Podporodica	Arvicolinae
Rod	<i>Dinaromys</i>
Vrsta	<i>Dinaromys bogdanovi</i>

1.2.2. Filogenija i rasprostranjenost

Analiza na temelju mitohondrijskog gena citokrom b pak ukazuje na tri značajno različite alopatrijske filogeografske linije: sjeverozapadnu, centralnu i jugoistočnu liniju (Kryštufek i Bužan, 2008; Kryštufek i sur., 2007). Ove rezultate potvrđuju i morfološke razlike u lubanjama ovih triju linija (Kryštufek i sur., 2012). Linije potječu od alopatrijske fragmentacije što potvrđuje distribucija haplotipova u kojoj nema geografskog poklapanja (Kryštufek i sur., 2007). Genetička varijabilnost haplotipova smanjuje se iz smjera sjeverozapada prema jugoistoku. Ovakav geografski uzorak odgovara postepenoj južnoj ekspanziji dinarskog voluhara koja je rezultirala alopatrijom južno od rijeke Neretve i rijeke Drim. Ove rijeke su predstavljale prirodnu barijeru za migracije i doprinijele geografskoj izolaciji (Bužan i sur., 2010; Kryštufek i Bužan, 2008; Kryštufek i sur., 2007).

Izmjene glacijala i interglacijala imale su značajan utjecaj u evoluciji ove vrste. Ponavljanim fragmentacijama staništa i izolacijama populacija u glacijalnim refugijima dolazi do alopatrijskih izolacija sa povremenim sekundarnim kontaktima (Kryštufek i sur., 2007; Bilton i sur., 1998).

Paleontološki podatci pokazuju da je vrsta u prošlosti bila rasprostranjena na području sjevernog Jadrana i zapadnog Balkana, a taj areal je veći nego današnji (Bužan i sur., 2010; Kryštufek i Bužan, 2008). U sjevernoj Italiji pronađeni su fosilni ostaci dviju izumrlih vrsta roda *Dinaromys*, a potječu iz starijeg pleistocena (Brelj, 1986).

Areal vrste prostire se na području Hrvatske, Bosne i Hercegovine, Kosova, Crne Gore i zapadne Makedonije (Kryštufek i Tvrtković, 1988). Područje rasprostranjenosti moglo bi

obuhvaćati i Albaniju (Bego i sur., 2008; Kryštufek i Bužan, 2008), a možda i sjevernu Grčku, iako za to još nema dokaza (Kryštufek i Bužan, 2008).

Područje rasprostranjenja vrste procijenjeno je na 43 545 km², no s obzirom na specifičnost pri izboru staništa, područje stvarne naseljenosti je procijenjeno na oko 5 200 km² (Kryštufek i Bužan, 2008). Visoko fragmentirano i ograničeno područje rasprostranjenosti predstavlja sjeverozapadna linija (manje od 2000 km²) (Kryštufek i Bužan, 2008) sa samo 17 lokaliteta duž 300 kilometara planinskog lanca Dinarida (Kryštufek i sur., 2007).

U Hrvatskoj je zabilježen na području od Gornje Klade, Babarovače i Zavižana kraj Jurjeva na Velebitu i Vrhovine na Maloj Kapeli, na Dinari, Kozjaku i Biokovu, sve do Sniježnice u Konavlima (Tvrtković, 2006; Kryštufek i Tvrtković, 1988).

1.2.3. Stanište

Dinarski voluhar može se pronaći u širokom spektru staništa, od šume do golog kamenjara. Ipak, radi se o specijalisti koji obitava na stjenovitim područjima s izrazito razvijenim krškim reljefnim oblicima na vapnenačkoj podlozi (škrape, rasjedi, špilje, jame, ...) (Bužan i sur., 2010). Vrlo je povezan s podzemnim staništima, zabilježen je u nekim jamama i na 70 m dubine (Tvrtković, 2006).

Staništa dinarskog voluhara rijetka su i fragmentirana upravo zbog izbirljivosti životne niše, čak i u regijama gdje se vrsta relativno često pojavljuje. Postoji 17 poznatih lokaliteta koji se protežu u krugu od 300 km na području Dinarida (Kryštufek i sur., 2007).

Dinarski voluhar je visinski generalist. Zabilježen je na visinama manjim od 50 m iznad razine mora, pa sve do vrhova planina, na 2200 m. Ipak, većina opažanja odnosi se na populacije zabilježene na visinama iznad 1400 m (Bužan i sur., 2010).

Na istom staništu se mogu naći krški miš (*Apodemus epimelas*; Nehring, 1902) i vrtni puh (*Eliomys quercinus*; Linnaeus, 1766), a postoji mogućnost da je u kompeticiji sa sniježnom voluharicom (*Chionomys nivalis*; Martins, 1841) s kojom pretežito dijeli stanište (Kryštufek i Tvrtković, 1988).

1.2.4. Stupanj ugroženosti i mjere zaštite

Dinarski voluhar nalazi se na IUCN-uvom Crvenom popisu kao osjetljiva vrsta (VU – vulnerable; Kryštufek, 2008). Na nacionalnoj razini nema dovoljno informacija o ovoj vrsti (DD – data deficient; Kryštufek i Bužan, 2008).

Status ugroženosti mnogih vrsta malih sisavaca je vrlo malo poznat zbog slabog poznavanja taksonomskih odnosa između grupa te nedostatka informacija o statusu populacija (Kryštufek i sur., 2009). U Hrvatskoj je vrsta zaštićena zakonom kao strogo zaštićena svojta (NN 99/09). Zbog slabog poznavanja biologije ove vrste kao i nepoznatih uzroka smanjenja populacije ima još uvijek relativno nizak stupanj ugroženosti iako je nekoliko autora ustanovilo da su pojedine populacije blizu izumiranja ili su već nestale (Kryštufek i Bužan, 2008).

Prema Rabinowitzevom modelu „sedam oblika rijetkosti“, dinarski voluhar zadovoljava sve značajke rijetkosti (Bužan i sur., 2010; Kryštufek i Bužan, 2008). Taj model fokusira se na tri glavne značajke prema kojima se procjenjuje rijetkost neke vrste, a to su: područje rasprostranjenosti, raznolikost staništa na kojima vrsta obitava te lokalna gustoća populacije. Teritorij dinarskog voluhara je ograničen i fragmentiran, stanište vrlo specifično, a populacije su malene i često izolirane. Postoje i dokazi o kontinuiranom opadanju veličine teritorija, što dovodi u pitanje opstanak vrste (Kryštufek i sur., 2007).

Današnje populacije dinarskog voluhara su male i često izolirane zbog velike specifičnosti za stanište i nedostatka pogodnih koridora za selidbu jedinki (Bužan i sur. 2010). Kompeticija sa snježnom voluharicom koja se pojavljuje na istom staništu i sama degradacija staništa mogli bi biti važni uzroci ugroženosti.

Dinarski voluhar je paleoendem, jedini živući predstavnik roda *Dinaromys* koji potječe još iz tercijara. Vjerojatno je i jedini preživjeli predstavnik plemena *Pliomys*. Rasprostranjenost ovog roda i kroz povijest je bila uska, a stopa evolucije niska. Rasprostranjenost se smanjuje od pleistocena kada je bila najveća, te se kao uzrok ugroženosti navodi i općenita povećana osjetljivost paleoendema na izumiranje (Bužan i sur., 2010).

Cilj zaštite vrste bi trebalo biti očuvanje njenih ekoloških i evolucijskih procesa. Za to važne su evolucijski značajne jedinice (ESU - evolutionary significant units). To su jedinice populacije koje su kroz povijest izolirane i zasebno evoluiraju te predstavljaju temeljni element raznolikosti unutar vrste (Moritz, 1999). Kryštufek i suradnici (2007) predlažu da se sve tri visokodivergentne linije dinarskog voluhara (sjeverozapadna, centralna i jugoistočna) uvažavaju kao evolucijski značajne jedinice. Time bi vjerojatno porastao stupanj ugroženosti ove vrste na IUCN-ovoj crvenoj listi na ugroženu (EN - endangered) ili čak kritično ugroženu (CR - critically endangered) vrstu.

Brojni autori naglašavaju da je potreban dugoročni monitoring i bolje razumijevanje biologije ove vrste kako bi se mogla točno procijeniti ugroženost i pravovremeno poduzeti mjere zaštite (Kryštufek i Bužan, 2008; Kryštufek i sur., 2007; Kotrošan i sur., 2005).

1.2.5. Biologija vrste

Dinarski voluhar je vrlo slabo istražena vrsta (Kryštufek i sur., 2007). U Crvenoj knjizi sisavaca Hrvatske dinarski voluhar je kategoriziran kao nedovoljno poznata, vjerojatno ugrožena vrsta (Tvrtković, 2006).

Krznom je gusto i meko, sivo-smeđe ili plavo-sive boje na dorzalnom dijelu tijela, dok je s ventralne strane tijela krzno svjetlije, sivo-bijele boje. Velike uši pokrivene su gustim dlakama, a rep tankom dlakom sivo-smeđe boje s gornje strane, a bijelom dlakom s donje te bočnih strana. Noge su mu bijele, dlanovi i stopala nemaju dlake, osim na području u blizini peta. Palac ima mali spljošteni nokat, dok ostali prsti imaju kratke oštre kandže, podjednake duljine na prednjim i stražnjim nogama (Nowak, 1999). Za snalaženje u prostoru koristi se širokom lepezom osjetilnih dlaka (vibrissae) prosječne duljine šest centimetara (Grzimek, 1990). Mužjaci i ženke podjednake su veličine i mase. Duljina glave i tijela je u rasponu od 13

do 15 cm, dok je rep dug između 7,5 i 10,5 cm. Masa im varira od 60 do 80 g. Ne postoji spolni dimorfizam u vanjskom izgledu i masi (Kryštufek i Tvrtković, 1988).

Za razliku od drugih pripadnika potporodice Arvicolinae, dinarski voluhar ima značajke K-seleksijskog tipa vrste (Kryštufek i Bužan, 2008; Kryštufek i sur., 2000). Životni vijek mu je četiri godine, a spolnu zrelost doseže u drugoj godini. Stopa reprodukcije je niska, ima do dva legla godišnje (Kryštufek i Bužan, 2008), uglavnom između lipnja i kolovoza. Gestacija traje oko mjesec dana (<http://www.arkive.org/martinos-vole/dinaromys-bogdanovi/>). U leglu je od jednog do četiri mlada (Kryštufek i Bužan, 2008).

Različite podvrste buhe *Ctenophthalmus nifetodes* ssp. specifični su ektoparaziti za tri skupine populacija dinarskog voluhara. Ovakvo obilježje dodatni je pokazatelj genetičke izoliranosti populacija dinarskog voluhara (Tvrtković, 2006; Brelj, 1986).

To je jedini voluhar s područja Europe koji ima kutnjake s korijenjem. Korijen se razvija tijekom postnatalnog rasta. Duljina korijena kutnjaka može se koristiti kao indikator apsolutne starosti. Najveći udio populacije (46 %) su jedinke do jedne godine starosti, a udjelom od samo 8 % zastupljena je najstarija dobna skupina (u četvrtoj godini života) (Kryštufek i sur., 2000). Brojčana ravnoteža između spolova uspostavlja se oko prve godine života, dok u dobnoj skupini koja se nalazi u drugoj i trećoj godini života prevladavaju ženke.

Dinarski voluhari su biljojedi. Hrane se različitim vrstama biljaka: mladim lišćem bukve, mladima jele i travama. Hranu spremaju za zimu. U snježnicama na području Velebita na nekoliko mjesta su pronađene hrpe odgrizenog bilja koje je dinarski voluhar odložio na trajni led (Grzimek, 1990).

1.3. Istraživanje brzine probave

Izbori prilikom hranjenja uvelike ovise o ekološkom kontekstu u kojem se hranidbeno ponašanje odvija (Stephens i Krebs, 1986). Fiziološke karakteristike životinja, kao i kemijsko-strukturalne odlike hrane također imaju važan i relativno nepoznat efekt na odluke o hranjenju. Stoga, primijećene preferencije prilikom odabira hrane kod neke vrste nisu samo rezultat dostupnosti i energetske profitabilnosti hrane, nego ovise i o kemiji prehrambene fiziologije te vrste (Uden i sur., 1980).

Istraživanje brzine probave provodi se probavnim markerima. Markerima su neprobavljive tvari kojima se obilježava hrana korištena u eksperimentu, a mogu identificirati u fecesu. Kotb i Luckey (1972) klasificirali su markere u 3 kategorije: elemente, spojeve i partikulate (fizikalne markere). Uz to predložili su i daljnju podjelu na topive „urinske“ markere i netopive „fekalne“ markere. Spojeve još dijele i na vanjske i unutarnje markere, gdje vanjske markere predstavljaju umjetne tvari dane životinjama, a unutarnji markeri su neprobavljive tvari koje se već nalaze u hrani, a mogu se kvantificirati u fecesu (npr. lignin i celuloza).

Boje se koriste za označavanje hrane od 20-ih godina 20-og stoljeća (Kotb i Luckey, 1972), međutim ne postoje uspješne metode kvantifikacije tih boja, izuzev antrakinon ljubičaste.

Kotb i Luckey (1972) kasnije su otkrili kako se znatan dio te boje apsorbira u probavnom traktu, što čini metodu nepreciznom i nepouzdanom.

Rijetki i inertni elementi se koriste za označavanje hrane od sredine 20-og stoljeća (Martz i sur., 1974; Ellis i Huston, 1968; Smith, 1968). Biljne stanične stijenke mogu se označiti sa ^{14}C izotopom ugljika tako što se biljke uzgajaju u uvjetima sa $^{14}\text{CO}_2$ plinom. Problem s ovom tehnikom je što se doze ovakve hrane moraju prepravljati kinetičkim analizama probavnog trakta proučavane vrste kako bi se dobile precizne procjene brzine probave, što čini uloženi trud oko ovakve metode previsokim (Uden i sur., 1980).

Downes i McDonald (1964) predložili su metodu „tekućih“ markera koristeći kompleks krom-etilendiamintetraoctene kiseline (Cr-EDTA). Ovaj kompleks koristi se za označavanje staničnih stijenki biljne hrane. Cr-EDTA je uz Co-EDTA najraširenija metoda istraživanja brzine probave. Kompleksi su stabilni u uvjetima koji vladaju u probavnim sustavima životinja, nisu invazivni, pronalaze se u jako velikom postotku, a pošto se zadržavaju u tekućim frakcijama probave, pogodni su za precizno istraživanje brzine probave životinja koje imaju rumen ili cekum, u kojima se hrana razdvaja na tekuću i krutu frakciju (Uden i sur., 1980).

Inertni fizikalni markeri koriste se desetljećima za proučavanje probave (Rittenhouse i sur., 1982). Hoelzel (1930) je proučavao brzinu probave zečeva, zamoraca, pasa, mačaka, miševa, majmuna, golubova, pa i samoga sebe koristeći širok raspon inertnih materijala poput staklenih kuglica, gume, malih sjemenki, komadića aluminijske, čelika, srebra, zlata i šljunka. Važni kriteriji pri odabiru fizikalnih markera su veličina markera, njihova specifična masa i inertnost. Veliki markeri mogu biti detektirani kao strani predmet u probavnom traktu, te je uobičajena reakcija probavnog trakta pojačavanje peristaltičkih kontrakcija i što brže izbacivanje stranog predmeta. Markeri sa velikom specifičnom masom zadržavaju se duže u probavnom traktu od hrane koju su označili, a moguća je i sedimentacija u sporijim dijelovima probavnog trakta što vodi netočnim rezultatima i mogućim zdravstvenim problemima proučavane životinje. Vrlo je važno da su markeri potpuno inertni. Kemijske reakcije markera sa tvarima u probavnom traktu smanjuju postotak pronađenog markera u fecesu, i mogu izazvati ozbiljne zdravstvene probleme (Fuller i sur., 2011).

1.4. Obrazloženje teme

Kao i veliki dio biologije i fiziologije dinarskog voluhara, brzina probave je potpuno nepoznata. Biljna hrana mediteranske klime ima nisku energetske vrijednosti, a velike količine vlakana. Prehrambena strategija malih biljojednih sisavaca koji se hrane biljkama niske energetske vrijednosti obično je konzumacija većih količina hrane i duže zadržavanje hrane u probavnom traktu kako bi kompenzirali nisku energetske profitabilnost hrane. Zadržavanje hrane u probavnom traktu usko je povezano s učinkovitosti apsorpcije tvari iz hrane u epitel crijeva, kao i njihovom kasnijom asimilacijom u ostatku organizma. S obzirom da veliki broj voluharica ima cekum, prostranu šupljinu na početku debelog crijeva u kojem se zadržavaju tekuće frakcije hrane pune otopljenih tvari, dok kruta frakcija hrane brzo prolazi kroz crijevo (Pei i sur., 2001), očekivan je brz prolaz hrane kroz probavni trakt

dinarskog voluhara. Rezultati ovog istraživanja mogli bi indirektno potvrditi fiziološku važnost cekuma u probavnom traktu dinarskog voluhara, te dati doprinos u razumijevanju prehrambenih strategija ovih životinja.

1.5. Cilj istraživanja

Ciljevi ovog rada su:

- 1) Odrediti prosječnu brzinu probave dinarskog voluhara
- 2) Usporediti brzine probave jedinki dok su u ljetnim odnosno zimskim prehrambenim režimima.
- 3) Usporediti brzinu probave mužjaka i ženki u zimskoj sezoni

2. Materijali i metode

2.1. Životinje i uvjeti držanja

Istraživanje je provedeno u prostorima Zoološkog vrta u Zagrebu. Dinarski voluhari drže se pojedinačno u staklenim terarijima (Slika 2.) dimenzija 80 cm x 60 cm x 55 cm. Terariji na prednjoj strani imaju klizne staklene stijenke, a na gornjoj strani nalazi se žičana mreža. Dno terarija pokriveno je drvnom piljevinom dubine 3 cm, u terarijima se nalazi veliko kamenje i drvene grane za penjanje i sakrivanje. U svakom uglu terarija nalaze se po jedna glinena posuda koje voluhari koriste za spavanje, spremište hrane i mjesta ekskrecije, kao i jedna keramička posudica s vodom. Terariji su osvijetljeni žaruljama (60 W) kojima se reguliraju uvjeti fotoperioda ovisno o sezonskim promjenama. Prostorija u kojoj se terariji nalaze održava se na 10°C – 20°C, ovisno o dobu godine, sa relativnom vlažnošću zraka od oko 30 - 60% tokom godine.



Slika 2. Izgled terarija u kojem se drže dinarski voluhari; prostorija Zoološkog vrta Zagreb.

Provedena su dva kruga eksperimenta zbog različitih prehrambenih režima uspostavljenih u Zoološkom vrtu za ljetnu i zimsku sezonu. Ljeti su voluhari hranjeni mješavinom svježe pokošene trave i livadnog bilja koja je vrlo slična hrani koju voluhari jedu u divljini. Zimi se hrane različitim vrstama salate i lisnatog povrća iz komercijalnog uzgoja u kombinaciji sa peletiranom hranom za biljojedne majmune. Tokom obje sezone, voluharima je svakog dana omogućena količina svježe hrane dostatna za dnevne potrebe.

U ljetnom periodu eksperimenta istraživana je brzina probave 13 zdravih adultnih jedinki dinarskog voluhara (10 mužjaka, 3 ženke). U zimskom periodu istraživano je 13 zdravih adultnih jedinki (7 mužjaka, 6 ženki). U zimskom periodu sudjelovalo je 6 mužjaka i 2 ženke iz ljetnog perioda eksperimenta. Bolesne jedinke, ženke s mladunčadi u terariju i parovi uključeni u proces parenja isključeni su iz eksperimenta.

2.2. Postavke istraživanja

Istraživanje ljetne sezone izvršeno je u srpnju i listopadu 2016. godine, dok su eksperimenti zimske sezone obavljani u siječnju 2017. godine.

Eksperimentalno istraživanje obavljeno je u prostorijama Zoološkog vrta grada Zagreba, a laboratorijska obrada uzoraka povedena je u laboratoriju Zavoda za animalnu fiziologiju, PMF-a Zagreb.

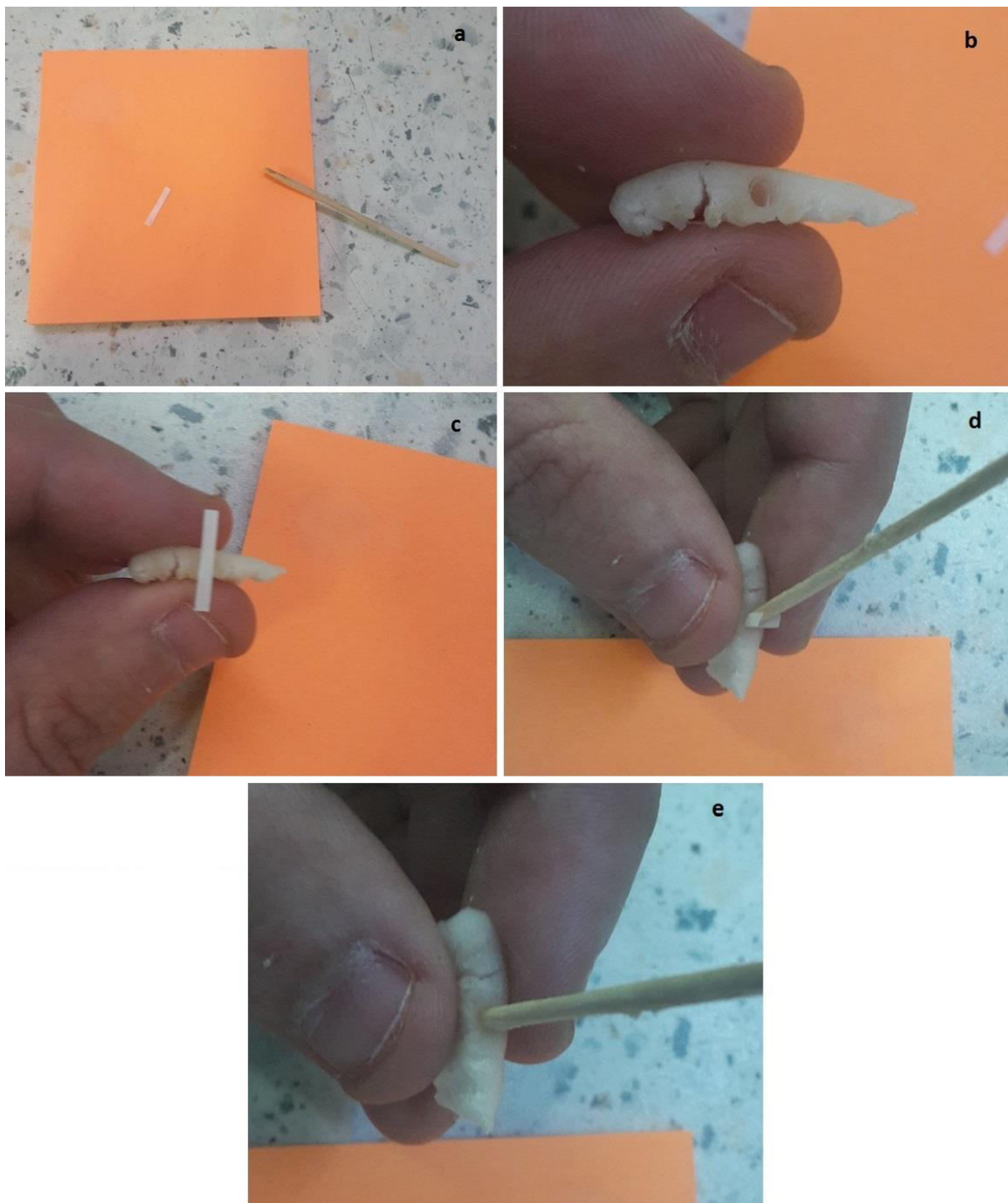
Svaka jedinka prošla je kroz 3 ciklusa eksperimenta za obje sezone. Ciklus eksperimenta sastoji se od davanja voluharima označene hrane, skupljanje uzoraka izmeta tokom 24 sata, te analize uzoraka u laboratoriju sljedeći dan.

2.2.1. Markeri

Plastični markeri korišteni u ovom istraživanju načinjeni su od bijele plastične folije korištene za proizvodnju plastičnih vrećica korištenih u prehrambene svrhe (HDPE – high density polyethylene) koja se smatra sigurnom za ingestiju, dimenzija 5 mm x 2 mm.

Prije nego što su eksperimenti započeti, provedeno je pilot istraživanje kojim se trebalo odrediti je li plastika sigurna za voluhare. Komadići plastike stavljeni su u 3 erlenmeyerove tikvice u kojima su se nalazile klorovodične kiseline različitih koncentracija. Nakon 24 sata u inkubatoru na 40°C markeri su pregledani te nije ustanovljena nikakva promjena na plastici. Dvije zdrave i odrasle jedinke voluhara odabrane su nasumično za testiranje sigurnosti markera. Ponuđena su im dva lista maslačka, u svakom se nalazilo po 4 markera, a nakon 24 sata pronađeno je svih 8 markera u izmetu voluhara. Voluhari su bili promatrani sljedećih 7 dana kako bi se uočile moguće posljedice prolaska markera kroz probavni trakt, no nisu uočene nikakve promjene. Slični plastični markeri korišteni su na pustinjским kornjačama (Meienberger i sur., 1993).

U ljetnom dijelu eksperimenta korišteni su listovi svježe ubranog maslačka, a u zimskom dijelu listovi komercijalno uzgojenog crvenog radiča. Listovi maslačka imaju široku i šuplju žilu kroz sredinu lista koja je pogodna za označavanje. Marker se položi preko sredine žile, te se debelom i tupom iglom ugura u žilu. Listovi radiča imaju debelu bazu koja se probuši iglom dubine oko 1 cm, koja se označi jednako kao i listovi maslačka (Slika 3.). Stavljena su 3 markera po listu, a voluharima su dana 2 označena lista po ciklusu eksperimenta. Marker ne mogu ispasti iz žile tokom hranjenja, a voluhari ih ne primijete kada jedu označene listove. Kako bi se osiguralo da voluhari pojedu označene listove u što kraćem vremenskom roku listovi maslačka koji se koriste za eksperiment se prerade u manje porcije. Odrežu se komadi dužine oko 4 cm od baze lista gdje je žila najšira u koje se uguraju markeri.



Slika 3. Proces označavanja lista radiča: a – plastični marker, b – baza lista radiča sa izbušenom rupom za označavanje, c – marker se položi preko rupe, d, e – iglom se marker ugura u rupu

2.2.2. Skupljanje uzoraka

Označeni listovi su stavljeni u terarij u 09:00 sati, prilikom čega su izvađeni svi ostaci prijašnje hrane i očišćeno mjesto ekskrecije u terariju. Direktnim promatranjem je utvrđeno da su jedinke pojele označenu hranu.

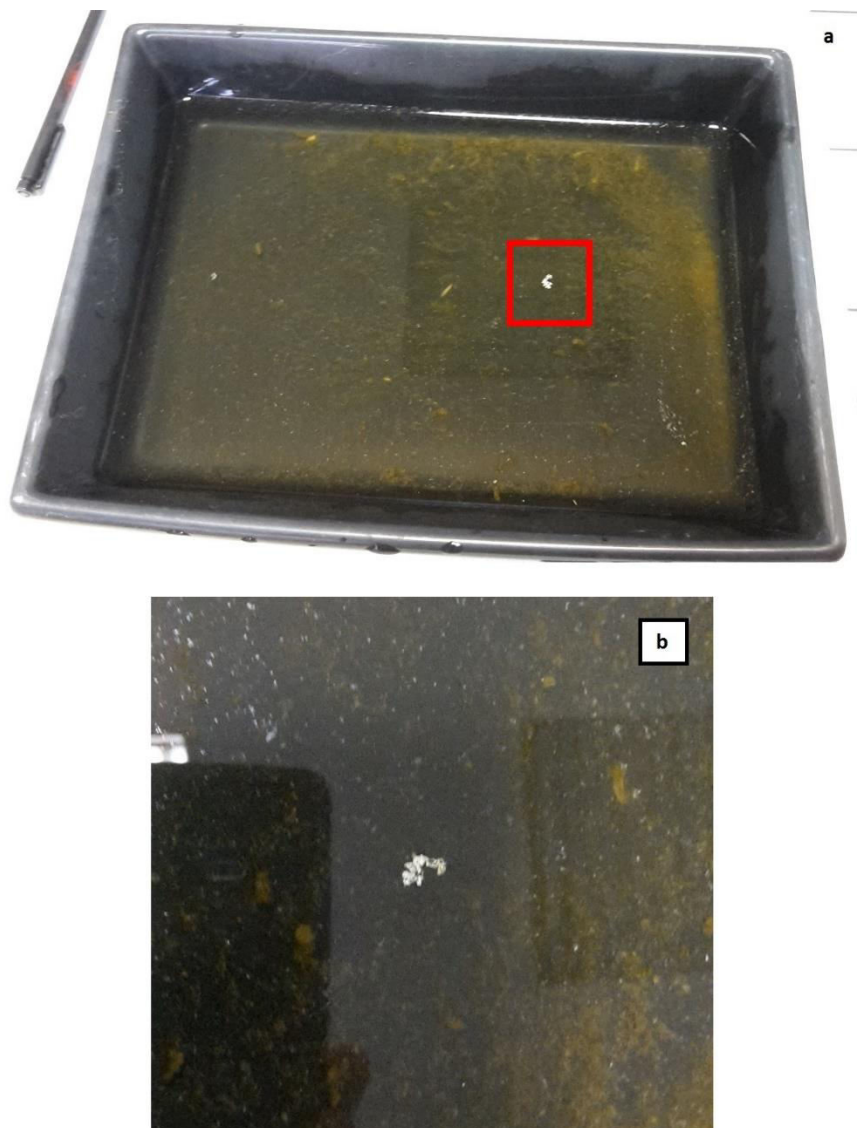
Uzorci su sakupljeni u intervalima od 4 sata prvih 12 sati (13:00 h, 17:00 h, 21:00 h), te još jednom nakon 12 sati (09:00 h sljedećeg dana).

Skupljanje uzoraka obavljeno je gumenom rukavicom. Ručno su odvojeni od komadića piljevine koji su slučajno pokupljeni s izmetom, te su spremljeni u označene epruvete i kivete. Čuvani su na sobnoj temperaturi.

2.2.3. Laboratorijska analiza uzoraka

Nakon što su prikupljeni uzorci nakon 24 sata od početka istraživanja, odneseni su u laboratorij Zavoda za animalnu fiziologiju, PMF-a Zagreb na analizu. Uzorci su raspoređeni po vremenskim kategorijama tako da je svaka plastična epruveta napunjena 1/4 volumena uzorcima izmeta. Toplom vodom iz vodovoda napune se 2/3 volumena epruvete, čvrsto se začepi epruveta te se energično protrese. Tako pripremljene smjese uzoraka i vode ostavljene su na 15 minuta, uz povremeno snažno protresanje.

Omekšana smjesa se izlije u crnu plastičnu posudu dimenzija 30 cm x 20 cm x 10 cm, u kojoj se nalazi voda koja zauzima oko 20% volumena posude. Omekšana smjesa se razrijedi kad se izlije u plastičnu posudu te su bijeli markeri jasno vidljivi i brojivi u tamnoj smjesi i posudi (Slika 4.). Nakon što su svi markeri pronađeni za pojedinu epruvetu, sadržaj posude se isprazni i proces se ponovi za sljedeću epruvetu.



Slika 4. Traženje markera u laboratorijskoj analizi: a – omekšana smjesa uzorka izmeta u crnoj posudi (crveno označen marker), b – uvećana slika markera u smjesi

2.3. Statistička analiza

Za statističku analizu korišteni su programi Excel 2013 i Statistica (StatsSoft 7.0. inc.).

Prvi korak statističke obrade podataka bio je deskriptivnom statistikom odrediti centralnu tendenciju i raspon vrijednosti dobivenih mjerenjem brzine probave. Ovo je učinjeno za svaku vremensku kategoriju (4, 8, 12 i 24 h) posebno.

Za svaku jedinku određeni su medijan, minimum i maksimum iz 3 kruga provedenog eksperimenta. Izračunat je prosječni medijan, minimum i maksimum svih 13 jedinki u 4 vremenska intervala.

Zbog malog broja uzoraka provedena je neparametrijska analiza upotrebom Friedmanovog testa na razini značajnosti $p < 0,05$, a rezultati su prikazani grafički Box-Whisker Plot grafovima. Za standardizaciju podataka napravljen je medijan svih uzoraka sa graničnim vrijednostima od 25% i 75%.

Rezultati vremenskih kategorija na istim životinjama unutar ljetne i zimske prehrabene sezone uspoređeni su Friedmanovim testom. Usporedba među sezonama testirana je Mann-Whitney testom kako bi se otkrile moguće razlike u brzini probave vezane za sezonalne razlike u kvaliteti hrane ili vanjskih parametara okoliša. Uz to, rezultati posebno mužjaka i ženki zimske sezone su uspoređeni Mann-Whitney testom kako bi se otkrile razlike brzine probave među spolovima. Usporedba brzine probave među spolovima obavljena je samo na podacima zimske sezone zbog malog broja ženki koje su korištene u istraživanju ljetne sezone.

3. Rezultati

3.1. Vremenski okvir probave

U istraživanju sakupljeno je po 12 uzoraka izmeta za svaku od 13 jedinki voluhara za ljetnu, odnosno za zimsku prehrabenu sezonu. Podaci su prvo obrađeni i prikazani deskriptivnom statistikom, ukazujući na raspored markera u određenim vremenskim kategorijama, kao i ukazujući na krajnje vrijednosne granice podataka (min i max).

Prilikom prikupljanja podataka sve jedinke koje nisu pojele komade označene hrane u prva 2 sata bile su diskvalificirane za taj krug eksperimenta. Kod svih 13 jedinki svih 6 markera je pronađeno unutar prva 24 sata za svaki krug eksperimenta.

3.2. Brzina probave ljetne sezone

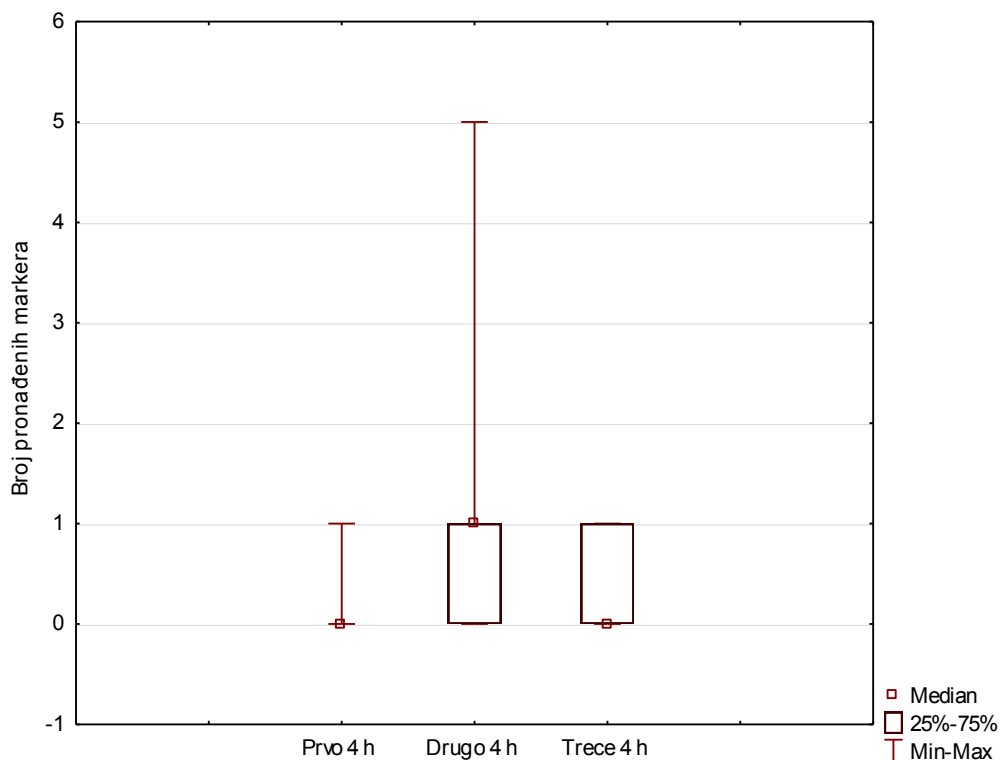
Za svaku jedinku određeni su medijan, minimum i maksimum iz 3 kruga provedenog eksperimenta. Izračunat je prosječni medijan, minimum i maksimum svih 13 jedinki u 4 vremenska intervala (Tablica 2.).

Tablica 2. Deskriptivna statistika za pronađene markere u ljetnoj sezoni (podaci za vremenske kategorije prikazani su medijanima podataka za te kategorije; M = mušjaci, F = ženke)

Vrem. kat. Spol	Prvo mjerenje		Drugo mjerenje		Treće mjerenje	
	M	F	M	F	M	F
4 h	0	0	1	0	0	1
8 h	2	2	2	2	2	2
12 h	2	2	1	3	2,5	1
24 h	1	2	0,5	0	2	2

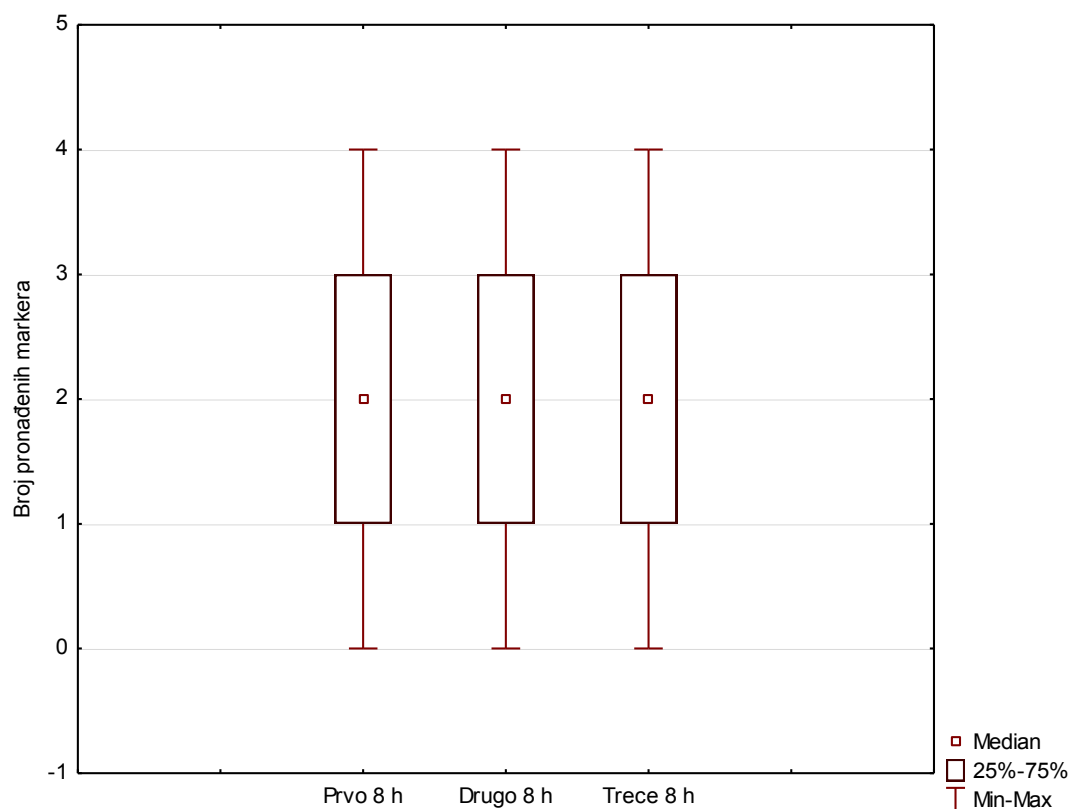
Podaci korišteni u statističkoj analizi su premali za usporedbu podataka mušjaka i ženki koristeći Hi-kvadrat test (manji su od 5), a i broj ženki u ljetnoj sezoni je premali za usporedbu među spolovima. Nadalje, rezultati deskriptivne statistike ne ukazuju na velika odstupanja između dva spola, stoga su u daljnjoj analizi podaci oba spola analizirani zajedno.

Usporedbom podataka brzine probave između tri kompleta mjerenja na istim životinjama za prva četiri sata nije pronađena značajna razlika (Slika 5.) (Friedman ($N = 13$, $df = 2$) = 5,87 $p = 0,05$). Iako je u drugom krugu eksperimenta zamijećen ekstrem, on nije utjecao na prosječnu raspodjelu markera kroz 3 kruga eksperimenta.



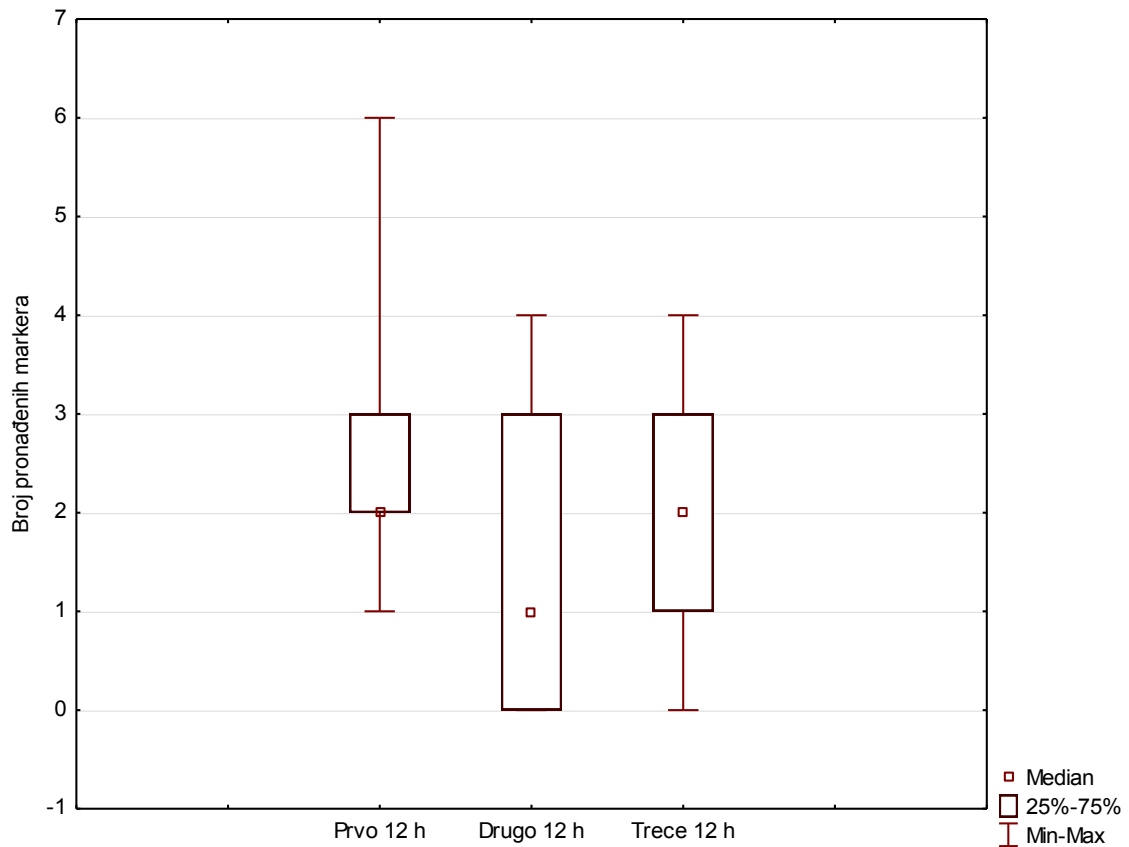
Slika 5. Raspodjela markera iz 3 kruga eksperimenta unutar prva 4 sata nakon što je označena hrana pojedena.

Usporedbom podataka brzine probave između tri kompleta mjerenja na istim životinjama za sljedeća četiri sata nije pronađena značajna razlika, medijan, minimum i maksimum su identični za sva 3 kruga eksperimenta (Slika 6.) (Friedman ($N = 13$, $df = 2$) = 0,42 $p = 0,80$).



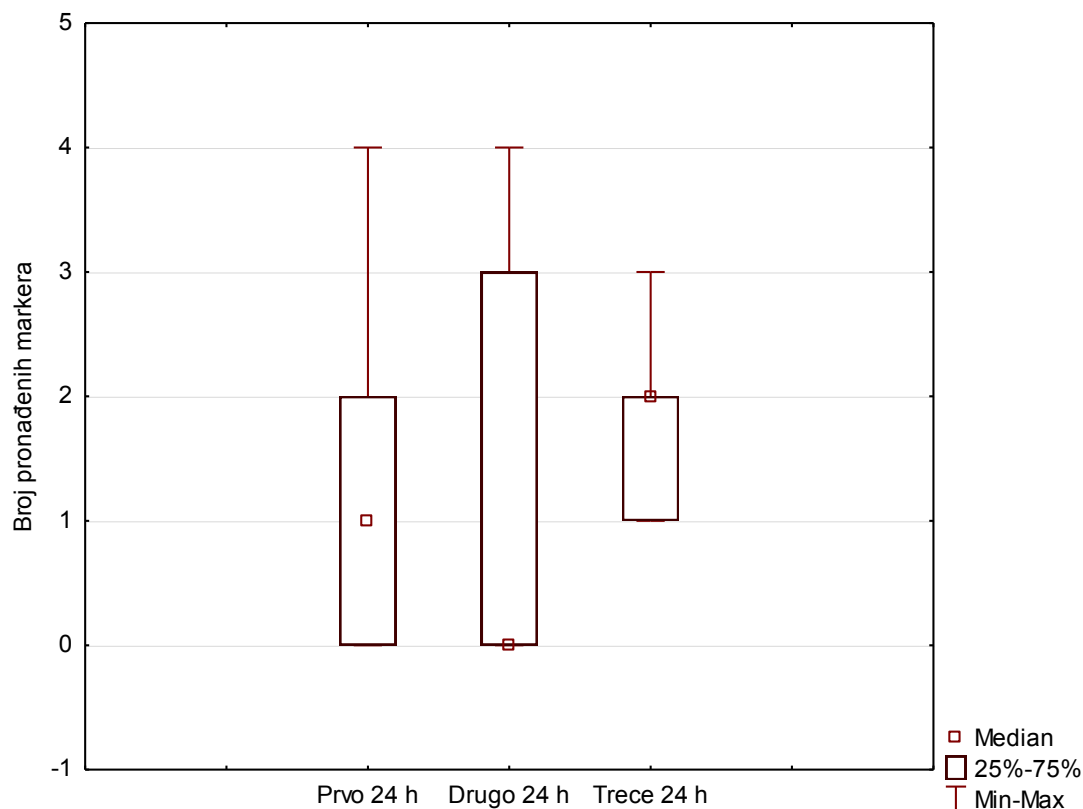
Slika 6. Raspodjela markera iz 3 kruga eksperimenta od 4 do 8 sati nakon što je označena hrana pojedena.

Usporedba podataka brzine probave između tri kompleta mjerenja na istim životinjama za sljedeća četiri sata nema značajne razlike (Slika 7.) (Friedman ($N = 13$, $df = 2$) = 3,95 $p = 0,13$).



Slika 7. Raspodjela markera iz 3 kruga eksperimenta od 8 do 12 sati nakon što je označena hrana pojedena.

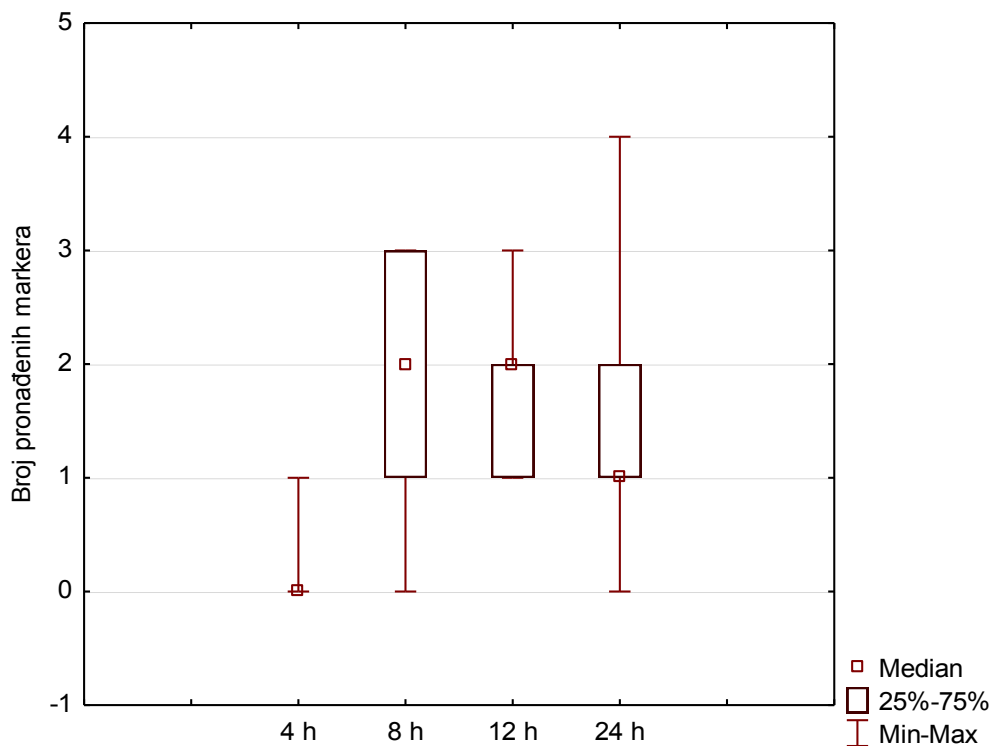
Podaci zadnjih dvanaest sati ne pokazuju značajne statističke razlike (Slika 8.) (Friedman ($N = 13$, $df = 2$) = 1,72 $p = 0,42$). Raspon medijana je veći nego u ostalim vremenskim kategorijama, međutim statističke razlike između 3 provedena kruga eksperimenta su male.



Slika 8. Raspodjela markera iz 3 kruga eksperimenta zadnjih 12 sati nakon što je označena hrana pojedena.

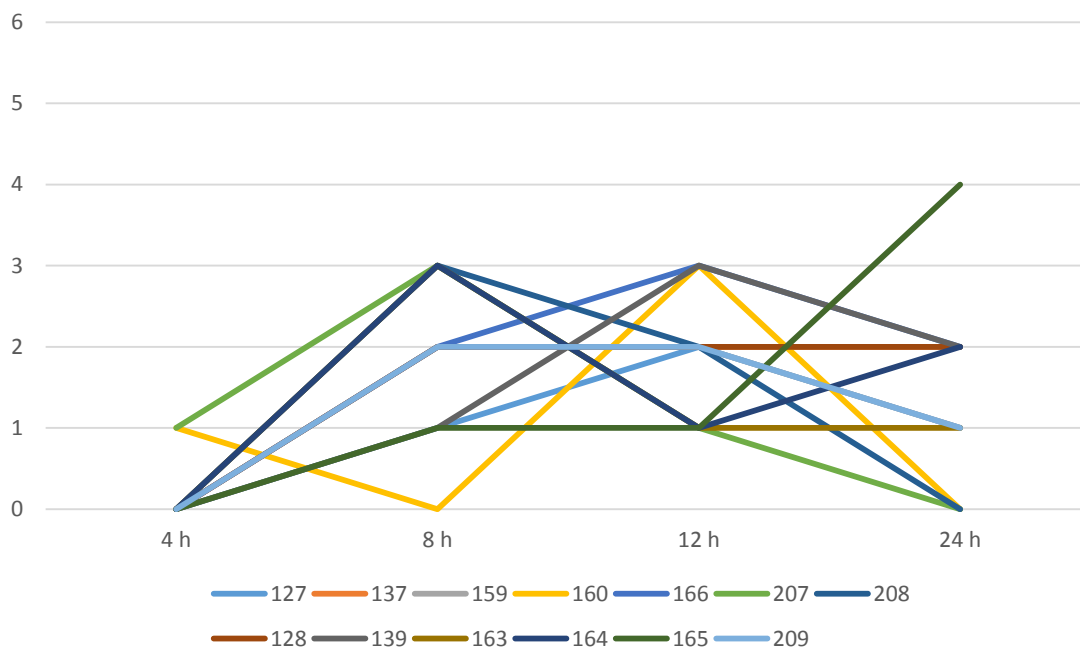
Deskriptivna statistika pokazuje kako su statističke razlike između 3 provedena kruga za svaku kategoriju male. Ovo je omogućilo spajanje podataka 3 kruga eksperimenta u jedan set podataka za pripadajuću vremensku kategoriju preko medijana. Ovako analizirani podaci Friedmanovim testom daju prosječan raspored markera za sve jedinice.

Podaci prikupljeni u ljetnoj sezoni pokazuju da postoji značajna razlika pojave markera u izmetu između različitih vremena uzorkovanja. Naime, markeri se pojavljuju unutar prva 4 sata i ta se vrijednost značajno razlikuje od ostalih, a nakon prva 4 sata izlaze iz probavnog trakta ujednačenom brzinom (Slika 9.) (Friedman ($N = 13$, $df = 3$) = 20,097 $p < 0,0001$). Dodatna potvrda je provedena analizom kategorija od 8, 12 i 24 sata koja potvrđuje kako među njima nema značajnih razlika te da u tim periodima markeri izlaze ujednačenom brzinom (Friedman ($N = 13$, $df = 2$) = 4,10 $p = 0,12$).



Slika 9. Raspodjela markera kod svih jedinki u ljetnoj sezoni.

Rezultati Friedmanovog testa podudaraju se i sa rezultatima deskriptivne statistike u rasporedu markera kroz vremenske kategorije (Slika 10.).



Slika 10. Raspodjela markera za svaku jedinku posebno (označeno šifriranim brojem jedinke i odgovarajućim bojom) po vremenskim kategorijama (vrijednosti su prikazane medijanima sva tri provedena eksperimenta po vremenskoj kategoriji).

3.3. Brzina probave zimske sezone

Za svaku jedinku određeni su medijan, minimum i maksimum iz 3 kruga provedenog eksperimenta. Izračunat je prosječni medijan, minimum i maksimum svih 13 jedinki u 4 vremenska intervala (Tablica 3.).

Tablica 3. Deskriptivna statistika za pronađene markere u zimskoj sezoni (podaci za vremenske kategorije prikazani su medijanima podataka za te kategorije; M = mušjaci, F = ženke)

Vrem. kat. Spol	Prvo mjerenje		Drugo mjerenje		Treće mjerenje	
	M	F	M	F	M	F
4 h	0	0	0	0	0	0
8 h	1	2	2	2	2	2
12 h	2	2	2	2,5	1	2,5
24 h	2	1,5	2	1	2	1,5

3.3.1. Brzina probave mušjaka i ženki

Podaci prikupljeni u zimskoj sezoni podvrgnuti su Mann-Whitney testom kako bi se utvrdile razlike u brzini probave među spolovima, s obzirom da u ovoj sezoni postoji dovoljan broj jedinki oba spola potreban za statističku analizu.

Rezultati analize potvrđuju kako među mušjacima i ženkama nema značajne razlike u brzini probave u prvoj vremenskoj kategoriji od 4 h (Mann-Whitney U test: $U = 185,5$; $Z = -0,084$; $p = 0,922$).

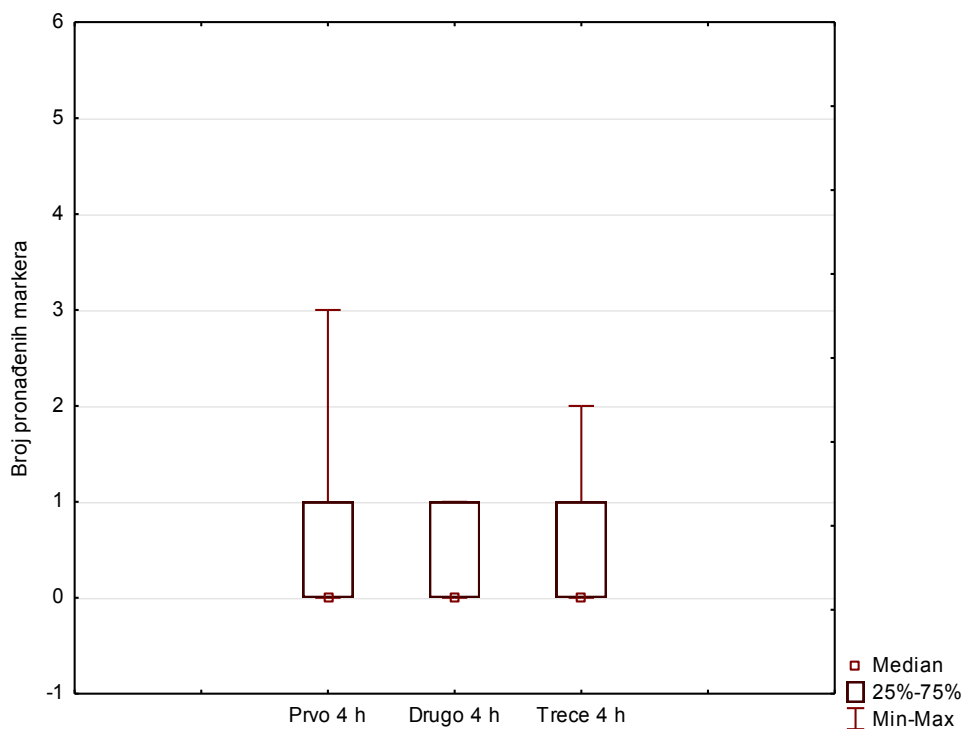
Rezultati analize potvrđuju kako među mušjacima i ženkama nema značajne razlike u brzini probave u drugoj vremenskoj kategoriji od 4 - 8 h (Mann-Whitney U test: $U = 175$; $Z = 0,380$; $p = 0,706$).

Rezultati analize potvrđuju kako među mušjacima i ženkama nema značajne razlike u brzini probave u trećoj vremenskoj kategoriji od 8 – 12 h (Mann-Whitney U test: $U = 161,5$; $Z = 0,760$; $p = 0,442$).

Rezultati analize potvrđuju kako među mušjacima i ženkama nema značajne razlike u brzini probave u četvrtoj vremenskoj kategoriji od 12 – 24 h (Mann-Whitney U test: $U = 141$; $Z = -1,338$; $p = 0,182$).

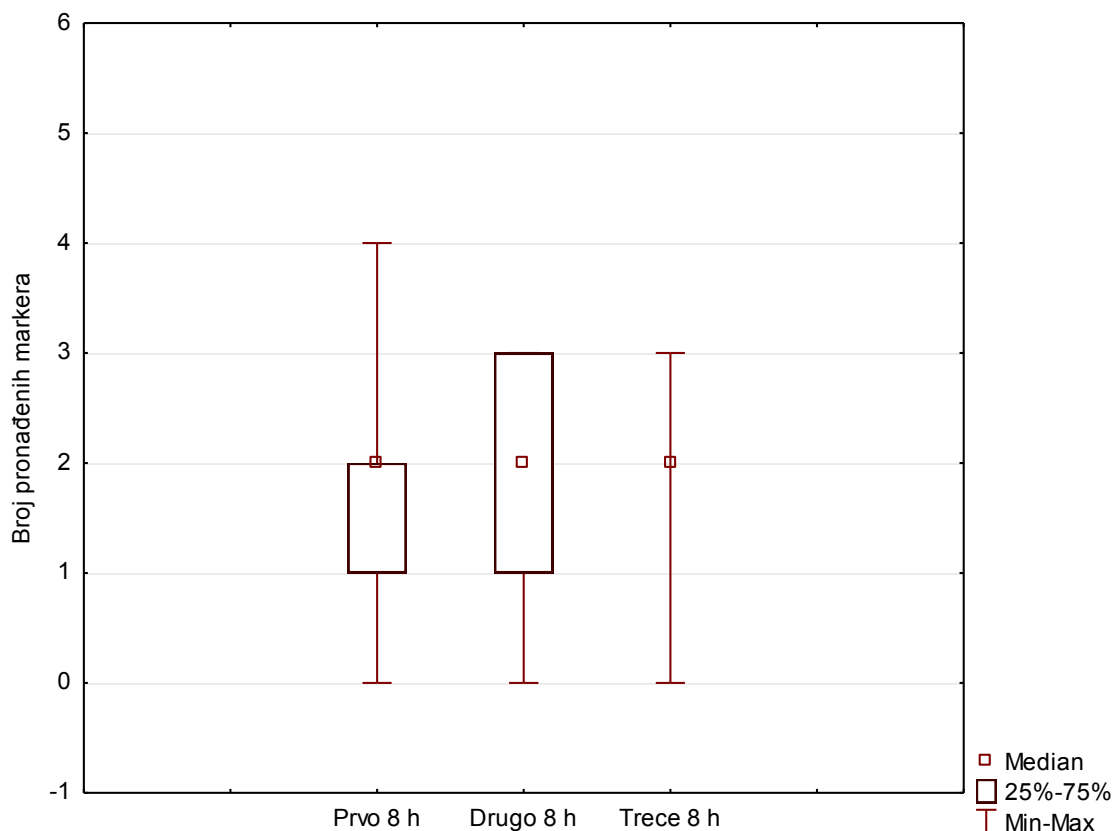
S obzirom na nepostojanje razlika među spolovima vezano za pojavljivanje markera u izmetu, daljnje analize obuhvaćaju podatke za oba spola.

Medijani podataka brzine probave za tri kompleta mjerenja na istim životinjama za prva četiri sata (Slika 11.) su vrijednosti 0, što onemogućava analizu Friedmanovim testom, logički dovodi do zaključka kako među njima nema razlika.



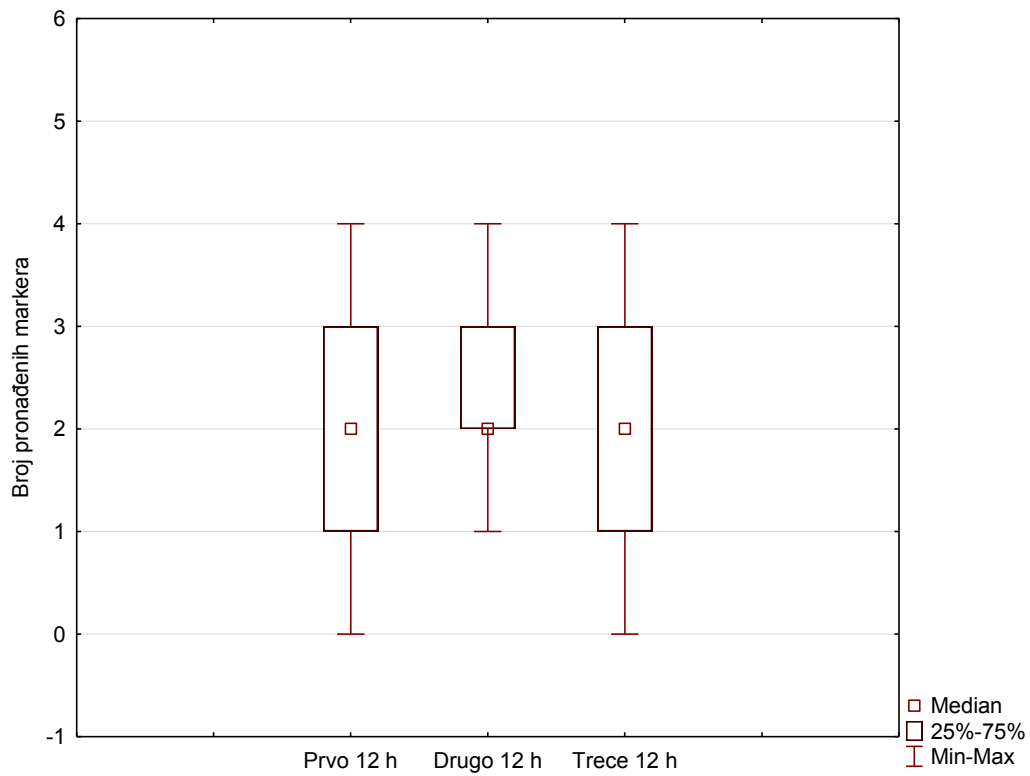
Slika 11. Raspodjela markera iz 3 kruga eksperimenta unutar prva četiri sata nakon što je označena hrana pojedena.

Usporedbom podataka brzine probave između tri kompleta mjerenja na istim životinjama za sljedeća četiri sata nije pronađena značajna razlika (Slika 12.) (Friedman ($N = 13$, $df = 2$) = 1,60 $p = 0,44$).



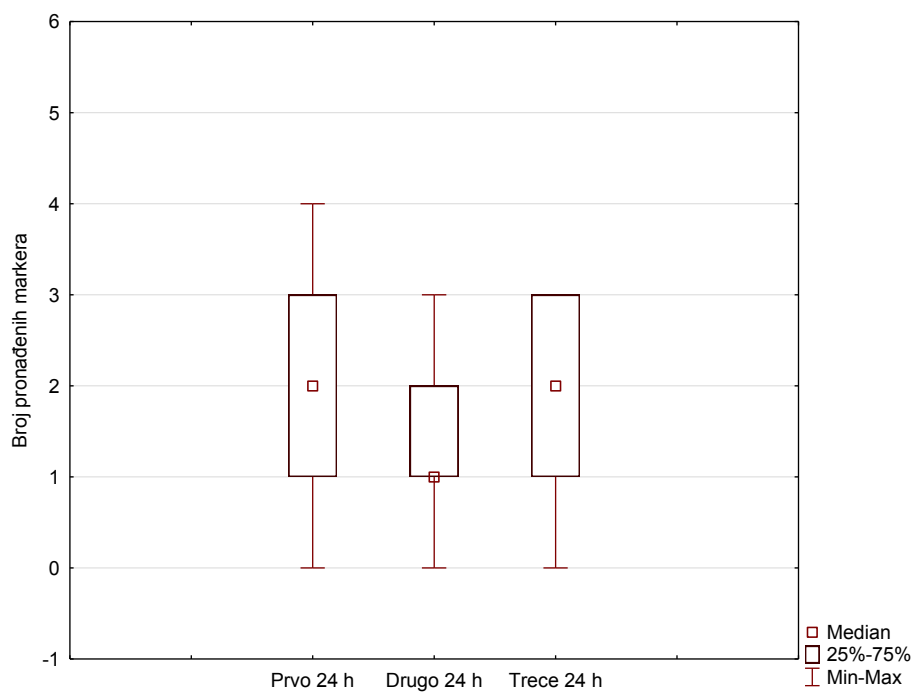
Slika 12. Raspodjela markera iz 3 kruga eksperimenta od 4 do 8 h nakon što je označena hrana pojedena.

Usporedbom podataka brzine probave između tri kompleta mjerenja na istim životinjama za sljedeća četiri sata nema značajne razlike (Slika 13.) (Friedman ($N = 13$, $df = 2$) = 1,44 $p = 0,48$).



Slika 13. Raspodjela markera iz 3 kruga eksperimenta od 8 do 12 h nakon što je označena hrana pojedena.

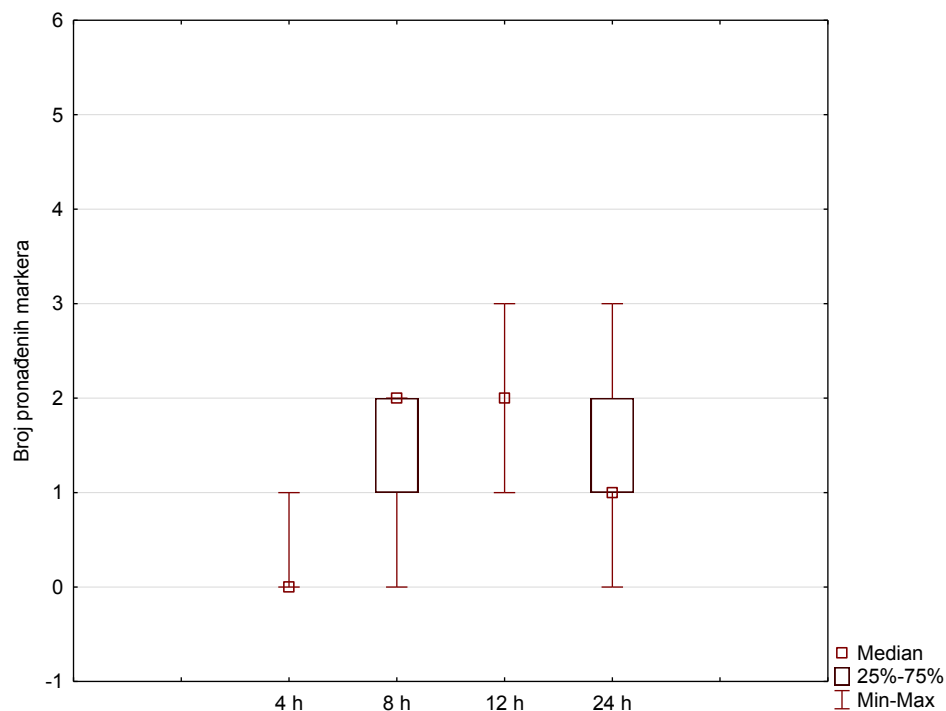
Podaci zadnjih dvanaest sati ne pokazuju značajne statističke razlike (Slika 14.) (Friedman ($N = 13, df = 2$) = 1,05 $p = 0,59$).



Slika 14. Raspodjela markera iz 3 kruga eksperimenta u zadnjih 12 h nakon što je označena hrana pojedena.

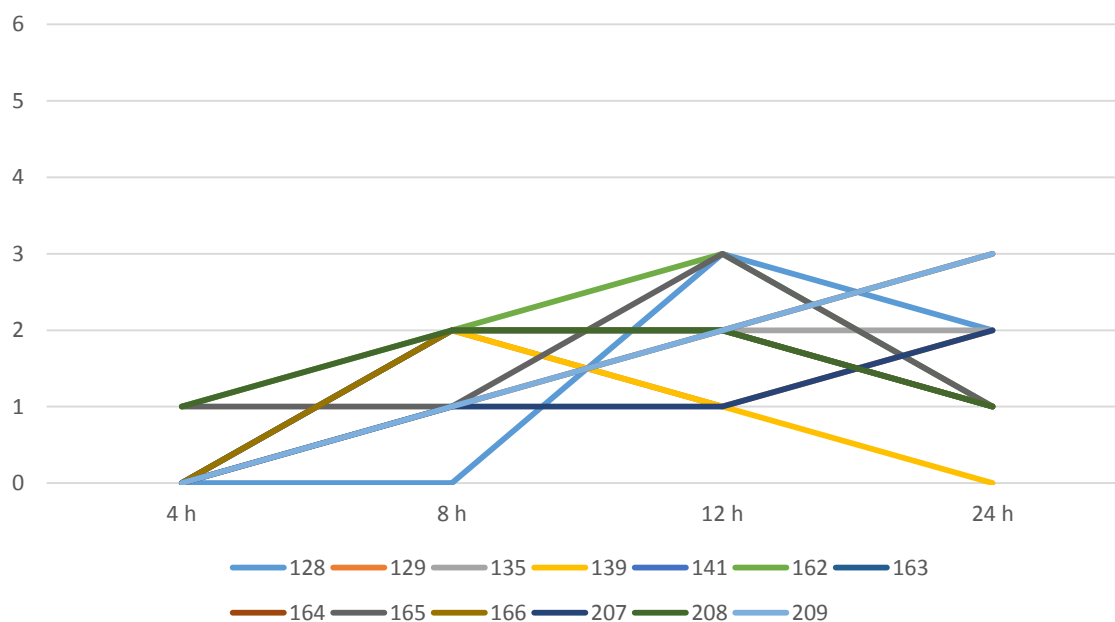
Deskriptivna statistika pokazuje kako su statističke razlike između 3 provedena kruga za svaku kategoriju male. Ovo je omogućilo spajanje podataka 3 kruga eksperimenta u jedan set podataka za pripadajuću vremensku kategoriju preko medijana. Ovako analizirani podaci Friedmanovim testom daju prosječan raspored markera za sve jedinke.

Podaci prikupljeni u zimskoj sezoni pokazuju da je pojavljivanje markera ovisno o vremenskoj kategoriji prikupljanja značajno različito (Friedman ($N = 13$, $df = 3$) = 21,40 $p < 0,0001$). Grafički prikaz ukazuje da je pojavljivanje markera nakon prva 4 sata različito od ostalih vremenskih kategorija. (Slika 15.) Dodatna analiza kategorija od 8, 12 i 24 sata potvrđuje kako među njima nema značajnih razlika te da u tim periodima markeri izlaze ujednačenom brzinom (Friedman ($N = 13$, $df = 2$) = 2,09 $p = 0,35$).



Slika 15. Raspodjela markera kod svih jedinke u zimskoj sezoni.

Rezultati Friedmanovog testa podudaraju se i sa rezultatima deskriptivne statistike u rasporedu markera kroz vremenske kategorije (Slika 16.).



Slika 16. Raspodjela markera svih jedinki (označeno šifriranim brojem jedinke i odgovarajućim bojom) po vremenskim kategorijama (vrijednosti su prikazane medijanima svih provedenih eksperimenata).

3.4. Usporedba sezona

Proveden je Mann-Whitney test na medijanima rezultata svih testiranih životinja, koji su grupirani u dvije skupine: ljetna i zimska sezona kako bi se utvrdile razlike u brzini probave među sezonama:

Rezultati analize potvrđuju kako među sezonama nema značajne razlike u brzini probave u prvoj vremenskoj kategoriji od 4 h (Mann-Whitney U test: $U = 78$; $Z = -0,307$; $p = 0,762$).

Rezultati analize potvrđuju kako među sezonama nema značajne razlike u brzini probave u drugoj vremenskoj kategoriji od 4 - 8 h (Mann-Whitney U test: $U = 62,5$; $Z = 1,102$; $p = 0,264$).

Rezultati analize potvrđuju kako među sezonama nema značajne razlike u brzini probave u trećoj vremenskoj kategoriji od 8 – 12 h (Mann-Whitney U test: $U = 79,5$; $Z = -0,230$; $p = 0,801$).

Rezultati analize potvrđuju kako među sezonama nema značajne razlike u brzini probave u četvrtoj vremenskoj kategoriji od 12 – 24 h (Mann-Whitney U test: $U = 75,5$; $Z = -0,435$; $p = 0,649$).

4. Rasprava

Vremenski okvir probave

U obje sezone istraživano je po 13 nasumično odabranih odraslih jedinki. U zimskoj sezoni, međutim naglasak je stavljen na uključivanje što većeg broja ženki kako bi se omogućila usporedba rezultata među spolovima. Tokom eksperimenta u ljetnom periodu većina ženki je bila uključena u proces parenja pa su te ženke izostavljene iz istraživanja da se smanji moguće uznemiravanje koje može nastati redovitim uklanjanjem svježeg izmeta iz terarija. Većina ženki izostavljenih iz eksperimenta ljetne sezone uključene su u eksperiment u zimskoj sezoni.

Mali biljojedi (do 5 g mase tijela) često imaju vrlo brz protok hrane kroz probavni trakt. Njihove energetske potrebe su previsoke kako bi se dugo fermentiranje energetski siromašnih tvari isplatilo. Velike krute čestice nakon odvajanja od tekuće frakcije hrane u prednjem crijevu vrlo brzo prolaze kroz ostatak probavnog trakta i izlaze u obliku tvrdog izmeta (Sakaguchi, 2003). Ovo se vrlo dobro podudara s našim rezultatima. Svi voluhari uključeni u istraživanje izbacili su sve markere u prva 24 sata nakon što su pojeli označenu hranu. Prvi markeri pojavljuju se u izmetu već nakon prva 4 sata od ingestije označene hrane. Nakon prva četiri sata markeri izlaze iz probavnog trakta ravnomjernom brzinom. Prijašnja istraživanja na voluharicama pokazala su vrlo brz prolaz krute mase kroz probavni trakt, oko 20h u prosjeku (National Research Council, 1995). Drugi glodavci poput zečeva i zamoraca imaju duže vrijeme probave, 30 – 40h, dok štakori i hrčci imaju vrlo sličnu brzinu probave s rezultatima ovog istraživanja od oko 20h, s pojavom markera već oko 3-4h od ingestije označene hrane (Chiou i sur., 2000).

Razlika među sezonama

Razlika u hrani između ljetne i zimske prehrane uspostavljene u Zoološkom vrtu grada Zagreba je velika. Ljeti su voluhari hranjeni mješavinom svježih pokošene trave, u kojoj se nalazi mnogo vrsta trava i različitih dijelova biljaka, što omogućava voluharima veliku raznovrsnost hrane. Uz to, takva hrana vrlo je slična onoj koju bi jeli u divljini (Grzimek, 1990). Zimi voluhari su hranjeni komercijalno uzgojenim lisnatim biljem poput crvenog radiča, matovilca i rikole. Ova hrana je značajno manje raznolika nego mješavina trave.

Početna hipoteza je bila kako će probava zimi biti sporija zbog pretpostavljene veće energetske vrijednosti hrane. Međutim, nisu uočene značajne razlike rezultata ljetne i zimske sezone. Predlažem tri glavne hipoteze koje objašnjuju zašto nije uočena razlika u brzini probave. Prva hipoteza pretpostavlja kako razlika u brzini među sezonama ipak postoji, ali se nalazi u tekućoj frakciji hrane, te bi se mogla otkriti kemijskim metodama određivanja brzine probave. Druge dvije hipoteze pretpostavljaju kako među sezonama ipak nema razlike u brzini probave, a to tumače različitim uzrocima. Druga hipoteza predlaže kako između hrane ljetne i zimske sezone ipak nema toliko značajnih razlika u hranjivim tvarima koliko je bilo pretpostavljeno u početnoj hipotezi pa zbog toga i nema značajne razlike u brzini probave tih

dvaju hranidbenih režima. Bilo bi korisno istražiti energetske razlike među dva tipa hrane, razliku u sastavu važnih mineralnih tvari kao i pojedenu količinu hrane u oba prehrambena režima kako bi se dobio odgovor na ovu hipotezu. Istraživanje koje su proveli Owl i Batzli (1998) stavlja ovu hipotezu pod sumnju. Testirali su promjene u morfologiji probavnog trakta, probavljivosti hrane i brzine probave između dviju vrsta voluharica hranjenih dvama različitim tipovima hrane. Njihovo istraživanje pokazalo je kako energetska razlika u hrani dovodi do promjena u probavi kod obe vrste voluharica. Treća hipoteza predlaže da je evolucijski uvjetovan probavni sistem razdvajanja hrane na dvije frakcije u svrhu bržeg protoka hrane kroz probavni trakt inertan na male kalibracije u brzini protoka hrane ovisno o energetskom sastavu hrane. Ovo bi moglo biti pojašnjeno detaljnijim istraživanjem prehrane voluhara u divljini i mogućih sezonskih varijacija u energetskom sastavu pojedene hrane. Ova hipoteza mogla bi biti opovrgnuta rezultatima istraživanja promjene morfologije probavnog trakta prerijske voluharice (*Microtus ochrogaster*; Wagner, 1842). Promjene u temperaturama u kojima su životinje držane, kao i energetskim vrijednostima hrane koja je korištena u eksperimentu dovele su do značajnih promjena u morfologiji probavnog trakta (Gross i sur., 1985).

Razlika među spolovima

Razlika brzine probave među spolovima istraživana je samo u zimskoj sezoni, no zbog sličnosti prosječnih rezultata brzine probave među sezonama odlučili smo kako se rezultati usporedbe među spolovima u zimskoj sezoni mogu interpretirati kao općenita prosječna razlika u brzini probave.

Nije uočena nikakva značajna razlika u brzini probave. Mužjaci i ženke ne razlikuju se značajno u masi tijela, i osim u sezoni parenja i podizanja mladih njihove energetske potrebe se ne razlikuju. Stoga se ovakvi rezultati slažu s početnom hipotezom prilikom uspoređivanja rezultata brzine probave mužjaka i ženki.

Razlika u brzini probave među spolovima rijetko se istražuje, međutim Leite i sur. (2015) istraživali su brzinu probave mužjaka, ženki i kastriranih mužjaka koza koristeći 3 metode: hranu označenu iterbijem (Yb), unutaršnjeg neprobavljivog NDF markera i Cr-EDTA markera. Koze koje su bile uključene u istraživanje stavljali su pod različite hranidbene restrikcije. Nisu otkrili nikakve značajne razlike u brzini probave kao ni u retenciji hrane u različitim dijelovima probavnog trakta među spolovima.

Valjanost fizikalnih markera u istraživanju brzine probave

Istraživanje potvrđuje kako su korištene plastične trakice inertne u probavnom traktu dinarskog voluhara i nisu se pokazale opasne za njihovo zdravlje. Uz to pokazuju se kao dostatno suptilni markeri jer nije uočeno ponašanje koje bi ukazivalo kako su voluhari otkrili markere tokom manipulacije hranom, niti su ih osjetili u usnoj šupljini dok su jeli označenu hranu. Svi markeri koje su voluhari pojeli u označenoj hrani kasnije su pronađeni u izmetu, bez slučajeva ekstremno brzog ili sporog prolaza kroz probavni trakt što dodatno potvrđuje da markeri nisu invazivna metoda određivanja brzine probave.

Rezultati ovog istraživanja potvrđuju vrijednost korištenja fizikalnih markera, no u slučaju životinja kod kojih dolazi do frakcije hrane i selektivnog zadržavanja dijela pojedene hrane u svrhu fermentacije ovakvi markeri pružaju samo pola ukupne slike brzine probave. Ovo se podudara i sa mišljenjem koje su Uden i sur. (1980) predstavili u radu u kojem predlažu danas široko korištene kemijske metode određivanja brzine probave.

Fizikalni markeri ne mogu se zadržavati u tekućoj frakciji hrane, koja se u cekumu zadržava neko vrijeme kako bi se omogućila fermentacija energetski važnih spojeva uz pomoć simbiotskih bakterija. Oni nastavljaju put kroz probavni trakt zajedno s ostatkom krute frakcije probave te, u slučaju dinarskog voluhara vrlo brzo izlaze iz probavnog trakta kako bi se omogućila konzumacija velike količine hrane.

Stoga kako bi se brzina probave dinarskog voluhara u potpunosti razumjela potrebno je provesti istraživanje korištenjem ustaljenih kemijskih metoda koje će omogućiti praćenje zadržavanja i izlaska pojedених tvari u tekućoj frakciji probave.

5. Zaključak

Hrana odijeljena od tekuće frakcije prolazi kroz probavni trakt dinarskog voluhara u roku od jednog dana, a počinje izlaziti iz probavnog trakta već u prva 4 sata nakon što je pojedena. Ovakva brzina prolaska hrane slaže se sa brzinom probave srodnih skupina glodavaca (cekum fermentera).

Nije zamijećena značajna razlika u brzini probave između ljetne i zimske prehrane sezone. Nisu zamijećene ni razlike u brzini probave među spolovima.

Istraživanje je ukazalo na sistem podjele hrane na krutu i tekuću frakciju kod dinarskog voluhara. Fizikalni markeri prikladna su metoda istraživanja brzine probave kod dinarskog voluhara, ali samo za krutu frakciju probave. Brzinu tekuće frakcije probave trebalo bi istražiti upotrebom kemijskih markera, kako bi se dobila potpuna slika brzine probave dinarskog voluhara.

Ovi rezultati pružaju uvid u dosad nepoznate prehrane i probavne strategije dinarskog voluhara, te otvaraju vrata daljnjim istraživanjima probave dinarskog voluhara, kao i provjere istraživačkih metoda.

6. Literatura

- Bego F., Kryštufek B., Paspali G., Rogozi E. (2008): Small terrestrial mammals of Albania: Annotated list and distribution. *Hystrix It. J. Mamm.* 19 (2), 3-21.
- Bilton D. T., Miroll P. M., Mascheretti S., Fredga K., Zima J., Searle J. B. (1998): Mediterranean Europe as an area of endemism for small mammals rather than a source for northwards postglacial colonization. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 265, 1219-1226.
- Brelih S. (1986): Ectoparasitical entomofauna of Yugoslav mammals. II. Siphonaptera from *Dinaromys bogdanovi* and *Chionomys nivalis* (Rodentia: Cricetidae). *SCOPOLIA.* 11, 1-47.
- Bužan E., Kryštufek B., Hänfling B., Hutchinson W. F. (2008): Mitochondrial phylogeny of Arvicolinae using comprehensive taxonomic sampling yields new insights. *Biological Journal of the Linnean Society.* 94 (4), 825-835.
- Bužan E. V., Kryštufek B., Bryja J. (2010): Microsatellite markers confirm extensive population fragmentation of the endangered Balkan palaeoendemic Martino's vole (*Dinaromys bogdanovi*). *Conserv Genet.* 11, 1783-1794.
- Carleton M., Musser G. (1984): Muroid rodents. U: Anderson S., Jones Jr. J. (ur.): *Orders and Families of Recent Mammals of the World.* John Wiley and Sons, New York. 289-379.
- Chaline J., Brunet-Lecomte P., Montuire S., Viriot L. i Courant F. (1999): Anatomy of the arvicoline radiation (Rodentia): palaeogeographical, palaeoecological history and evolutionary data. *Ann. Zool. Fennici.* 36, 239-267.
- Chiou P. Wen-Shyg, Yu B., Kuo Chung-Yi (2000): Comparison of digestive function among rabbits, guinea-pigs, rats and hamsters. I. Performance, digestibility and rate of digesta passage. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences.* 13(11): 1499-1507.
- Downes A. M., McDonald I. W. (1964): The chromium-51 complex of ethylenediamino tetraacetic acid as soluble rumen marker. *Brit. J. Nutrition.* 18, 153-162.
- Ellis W. C., Huston J. E. (1968): ^{144}Cr - ^{144}Pr is a particulate digesta flow marker in ruminants. *J. Nutr.* 95, 67-78.
- Feldhamer G. A., Drickamer L. C., Vessey S. H., Merritt J. F., Krajewski C. (2007): *Mammalogy: adaptation, diversity, and ecology.* The Johns Hopkins University Press, Baltimore. 768 str.
- Fuller G., Margulis S. W., Santymire R. (2011): The effectiveness of indigestible markers for identifying individual animal feces and their prevalence of use in North American zoos. *Zoo Biol.* 30, 379-398.
- Gross J. E., Wang Z., Wunder B. A. (1985): Effects of Food Quality and Energy Needs: Changes in Gut Morphology and Capacity of *Microtus ochrogaster*. *Journal of Mammalogy.* 66(4): 661-667.

Gruder-Adams S., Getz L. (1985): Comparison of the mating system and paternal behavior in *Microtus ochrogaster* and *Microtus pennsylvanicus*. *Journal of Mammalogy*. 66 (1), 165-167.

Grzimek B. (1990): Grzimek's encyclopedia of mammals. McGraw-Hill Publishing company, New York.

Hoelzel F. (1930): The rate of passage of inert materials through the digestive tract. *American Journal of Physiology*. 92 (2), 466-497.

<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T6607A12790367.en>, pristupljeno: 25. studenog 2016.

<http://www.arkive.org/martinos-vole/dinaromys-bogdanovi/>, pristupljeno: 25. studenog 2016.

Kotb A., Luckey T. (1972): Markers in nutrition. *The commonwealth bureau of nutrition - Nutrition abstracts and reviews*. 42 (3), 813-845.

Kotrošan D., Bjedov V., Kryštufek B. (2005): Stanje istraženosti faune sisara Bosne i Hercegovine. *Works of Faculty of Forestry, University of Sarajevo*. 1, 29-55.

Kryštufek B., Tvrtković N. (1988): Insectivores and Rodents of the Central Dinaric Karst of Yugoslavia. *SCOPOLIA*. 15, 1-59.

Kryštufek B. (1999): *Dinaromys bogdanovi* (Martino, 1922). U: *Atlas of European Mammals* (Ur. A.J. Mitchell-Jones, G. Amori, W. Bogdanowicz, B. Kryštufek, P.J.H. Reijnders, F. Spitzenberger, M. Stubbe, J.B.M. Thissen, V. Vohralik i J. Zima). Academic Press, London, UK. str. 218-219.

Kryštufek B., Kolarič K., Paunović M. (2000): Age determination and age structure in Martino's vole *Dinaromys bogdanovi*. *Mammalia*. 64 (3), 361-370.

Kryštufek B., Bužan E. V., Hutchinso W. F., Hänfling B. (2007): Phylogeography of the rare Balkan endemic Martino's vole, *Dinaromys bogdanovi*, reveals strong differentiation within the western Balkan Peninsula. *Molecular Ecology*. 16, 1221-1232.

Kryštufek B., Bužan E. V. (2008): Rarity and decline in palaeoendemic Martino's vole *Dinaromys bogdanovi*. *Mammal Rev*. 38 (4), 267-284.

Kryštufek B., Vohralik V., Obuch J. (2009): Endemism, vulnerability and conservation issues for small terrestrial mammals from the Balkans and Anatolia. *Folia Zool*. 58 (3), 291-302.

Leite R. F., Krizsan S. J., Figueiredo F. O., Carvalho V. B., Teixeira I. A., Huhtanen P. (2015): Contribution of different segments of the gastrointestinal tract to digestion in growing Saanen goats. *Animal Science Journal*. 93 (4): 1802-14.

Macdonald D. (2001): *The new encyclopedia of mammals*. Oxford University Press.

Martz F. A., Van Soest P. J., Vogt J. K., Hildebrand E. S. Use of elemental tracers and activation analysis in digestion, rate of digesta flow and food particle tracking studies in cattle. *Proc. 6th Symp. Energy Metabl. Stuttgart, Germany*. 111-114.

- Meienberger Christian, Wallis Ian R., Nagy Kenneth A. (1993): Food Intake Rate and Body Mass Influence Transit Time and Digestibility in the Desert Tortoise (*Xerobates agassizii*). *Physiological zoology*. 66 (5), 847-862.
- Moritz C. (1999): Conservation units and translocations: strategies for conserving evolutionary processes. *Hereditas*. 130, 217-228.
- Musser G., Carleton M. (2005): Superfamily Muroidea. U: Wilson D., Reeder D. (ur.): *Mammal Species of the World*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London.
- National Research Council (1995): *Nutrient Requirements of Laboratory Animals*. Fourth Revised Edition. National Academy Press, Washington, D.C.
- Nowak R. (1999): *Walker's Mammals of the World*, vol. II. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London. Oxford.
- Owl M. Y., Batzli G. O. (1998): The integrated processing response of voles to fibre content of natural diets. *Functional Ecology*. 12: 4-13.
- Pei Y.X., Wang D.H., Hume I.D. (2001): Selective digestaretenion and coprophagy in Brandt's vole (*Microtus brandti*). *Journal of Comparative Physiology B*. 171 (6), 457-464.
- Rittenhouse L. R., Johnson D. E., Borman M. M. (1982): Comparison of faecal excretion and intake estimates obtained from external markers and total faecal collection. *American Society of Animal Science*. 33, 284-286.
- Sakagushi E. (2003): Digestive strategies of small hindgut fermenters. *Animal Science Journal*. 74 (5), 327-337.
- Smith L. S. (1968): The influence of particle size and lignification upon rates of digestion and passage of uniformly labelled ¹⁴C cell walls in the sheep. PhD thesis, University of Maryland, USA. 29, 2693-2694.
- Stephens D. W., Krebs J. R. (1986): *Foraging theory*. Princeton University Press, str. 1-247.
- Tvrčković N. (2006): *Crvena knjiga sisavaca Hrvatske*. Ministarstvo kulture, Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb.
- Udén P., Colucci P. E., Van Soest P. J. (1980): Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta rates of passage studies. *J. Sci. Food Agric*. 31, 625-632.

Životopis

Osobni podaci

Ime i prezime: Mateo Miloš

Datum i mjesto rođenja: 15.10.1992., Split

Mjesto prebivališta: Cesta dr. F. Tuđmana 1014, Kaštel Novi

e-mail adresa: mateo.milos92@gmail.com

Obrazovanje

2014. – 2017. Sveučilište u Zagrebu; Prirodoslovno-matematički fakultet Zagreb, smjer biologija, modul eksperimentalna biologija-zoologija - diplomski studij
2011. – 2014. Sveučilište u Splitu; Odjel za studije mora, smjer biologija mora - preddiplomski studij
2007. – 2011. Gimnazija Ivana Lucića Trogir, opći smjer
1999. – 2007. Osnovna škola Bijaći, Kaštel Novi

Znanja i vještine

engleski jezik, odlično znanje (C2)

talijanski jezik, odlično znanje (C1)

dozvola za ronjenje, prvi rang