

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Maja DERLINK

**VIBRACIJSKI SIGNALI, REPRODUKTIVNA  
IZOLACIJA IN NASTANEK VRST V RODU  
*Aphrodes* CURTIS, 1883 (Hemiptera: Cicadellidae)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Maja DERLINK

**VIBRACIJSKI SIGNALI, REPRODUKTIVNA IZOLACIJA IN  
NASTANEK VRST V RODU *Aphrodes* CURTIS, 1883 (Hemiptera:  
Cicadellidae)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**VIBRATIONAL SIGNALS, REPRODUCTIVE ISOLATION AND  
SPECIATION IN THE GENUS *Aphrodes* CURTIS, 1883 (Hemiptera:  
Cicadellidae)**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2014

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa 20. seje Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 21. 9. 2011 je bilo potrjeno, da kandidatka Maja Derlink izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti, znanstveno področje *biologija*. Doktorsko delo je bilo opravljeno v laboratorijih Oddelka za entomologijo Nacionalnega inštituta za biologijo in Oddelku za poljedelstvo in semenarstvo Kmetijskega inštituta Slovenije. Za mentorico je bila imenovana doc. dr. Meta Virant-Doberlet.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Rudi VEROVNIK

Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: znan. svet. doc. dr. Meta VIRANT-DOBERLET

Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za entomologijo

Član: prof. dr. Andrej ČOKL

Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za entomologijo

Član: prof. dr. Dušan DEVETAK

Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Maja Derlink

### Ključna dokumentacijska informacija (KDI)

ŠD Dd  
DK UDK 595.7:595.753:591.18(043.3)=163.6  
KG Aphrodes/Cicadellidae/vibracijski signali/spolna komunikacija/reproduktivna izolacija/speciacija/COI/integrativna taksonomija  
AV DERLINK, Maja, univ. dipl. biol.  
SA VIRANT-DOBERLET, Meta (mentorica)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študijski program Bioznanosti, znanstveno področje: biologija  
LI 2014  
IN VIBRACIJSKI SIGNALI, REPRODUKTIVNA IZOLACIJA IN NASTANEK VRST V RODU APHRODES, CURTIS 1883 (HEMIPTERA: CICADELLIDAE)  
TD Doktorska disertacija  
OP XIII, 115 str., 12 pregl., 50 sl., 187 vir., 11 pril.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Škržatki iz rodu *Aphrodes* (Hemiptera, Cicadellidae) predstavljajo idealen sistem za raziskovanje razhajanja populacij na osnovi vibracijskih signalov ter s tem nastanka vrst. V nasprotju z do sedaj raziskovanimi paritvenimi sistemi, ki temeljijo na zvočnih signalih, se pri teh škržatkih pozivni napevi samcev med vrstami bistveno razlikujejo ne-le na osnovi kvantitativnih razlik v časovnih in frekvenčnih parametrih, temveč tudi v sami temeljni zgradbi (oz. kvalitativno), medtem ko so odzivni napevi samic variacije istega osnovnega vzorca in se med sabo ločijo le kvantitativno. Celostna taksonomija na osnovi vedenjskih, genetskih in morfoloških znakov je pokazala, da so *A. aestuarina*, *A. bicincta*, *A. diminuta* in *A. makarovi* jasno ločene vrste. V Sloveniji smo našli slednje tri vrste ter osebk tipa *A. 'Dragonja'*, katerih pozivni napevi se ločijo od drugih. Samice se v splošnem bolje odzivajo na pozivne napeve samcev lastne kot na katerikoli napev tuje vrste (oz. tipa), vendar imajo pozivni napevi, ki jih sestavljajo podobni elementi, le omejeno vlogo pri vzdrževanju predparitvene reproduktivne izolacije. Pokazalo se je, da v sistemih, ki temeljijo na duetu, v nekaterih primerih, samci prispevajo več k spolni izolaciji med vrstami kot samice. Analiza mitohondrijske DNA je osebk tipa *A. 'Dragonja'* uvrstila med škržatke vrste *A. bicincta*, vendar je bil uspeh obeh recipročnih križanj med vrsto *A. bicincta* in tipom *A. 'Dragonja'* zelo nizek.

### Key words documentation (KWD)

DN Dd  
DC UDC 595.7:595.753:591.18(043.3)=163.6  
CX Aphrodes/Cicadellidae/vibrational signals/sexual communication/reproductive isolation/speciation/COI/integrative taxonomy  
AU DERLINK, Maja  
AA VIRANT-DOBERLET, Meta (supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biosciences, Field: Biology  
PY 2014  
TI VIBRATIONAL SIGNALS, REPRODUCTIVE ISOLATION AND SPECIATION IN THE GENUS APHRODES CURTIS, 1883 (HEMIPTERA: CICADELLIDAE)  
DT Doctoral dissertation  
NO XIII, 115 p., 12 tab., 50 fig., 187 ref., 11 ann.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Leafhoppers of the genus *Aphrodes* (Hemiptera, Cicadellidae) provide an ideal system to study the role of signal divergence in speciation. In contrast to up to now studied mating systems based on acoustic signals, in this genus male advertisement calls are highly divergent and primarily differ qualitatively between species, while female signals are variations on the same basic pattern but differ quantitatively in signal characteristics. Integrated taxonomy based on behavioural, molecular and morphological data confirmed *A. aestuarina*, *A. bicincta*, *A. diminuta* in *A. makarovi* as distinct species. In Slovenia the latter three species were found, as well as individuals belonging to the type *A. 'Dragonja'* which emit advertisement calls that differ from the ones described in the above mentioned four species. Females responded preferentially to the advertisement calls of conspecific males, however, male calls composed of similar elements played only limited role in mate recognition. Nevertheless, in mating systems based on a duet, at least in some cases, males contribute more than females to sexual isolation between species. Analyses of mtDNA sequences grouped individuals of *A. 'Dragonja'* together with *A. bicincta*, however, the success in both reciprocal heterospecific matings with *A. bicincta* was very low.

## KAZALO VSEBINE

|   |           |
|---|-----------|
| Ključna dokumentacijska informacija (KDI)   | III       |
| Key words documentation (KWD)   | IV        |
| Kazalo vsebine  | V         |
| Kazalo preglednic   | VII       |
| Kazalo slik   | VIII      |
| Kazalo prilog   | XII       |
| Okrajšave in simboli  | XIII      |
| <b>1 UVOD</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1 VLOGA ZVOČNIH SIGNALOV V REPRODUKTIVNI IZOLACIJI  | 2         |
| <b>1.1.1 Sporazumevanje z vibracijskimi signali</b>   | <b>3</b>  |
| 1.1.1.1 Vloga vibracijskih signalov v speciaciji  | 4         |
| 1.2 ROD <i>APHRODES</i>   | 5         |
| <b>1.2.1 Taksonomija rodu <i>Aphrodes</i></b>   | <b>5</b>  |
| <b>1.2.2 Ekologija in biologija škržatkov iz rodu <i>Aphrodes</i></b>                           | <b>6</b>  |
| <b>1.2.3 Vibracijski signali škržatkov iz rodu <i>Aphrodes</i></b>                              | <b>7</b>  |
| 1.3 TIP <i>APHRODES</i> 'DRAGONJA'  | 10        |
| 1.4 UPORABA MOLEKULSKIH MARKERJEV V GENETSKIH ANALIZAH  | 11        |
| 1.5 NAMEN DELA IN HIPOTEZE  | 12        |
| <b>2 MATERIALI IN METODE</b>  | <b>14</b> |
| 2.1 VZORČENJE ŠKRŽATKOV IN VZDRŽEVANJE V LABORATORIJU   | 14        |
| 2.2 VEDENJSKI POSKUSI   | 17        |
| <b>2.2.1 Določevanje vrst na osnovi registracije vibracijskih signalov</b>                      | <b>17</b> |
| <b>2.2.2 Analiza vrstno-specifičnih vibracijskih signalov</b>                                   | <b>19</b> |
| <b>2.2.3 Določanje preference samic za pozivne napeve samcev lastne in drugih vrst</b>          | <b>20</b> |
| <b>2.2.4 Določanje odzivnosti samic na vrstno-specifične elemente v pozivnih napevih samcev</b> | <b>22</b> |
| <b>2.2.5 Znotrajvrstna in medvrstna parjenja</b>  | <b>23</b> |
| <b>2.2.6 Statistične analize</b>  | <b>25</b> |
| 2.3 MOLEKULARNI MARKERJI  | 25        |
| <b>2.3.1 Izolacija DNA</b>  | <b>25</b> |
| <b>2.3.2 Mitohondrijska DNA</b>   | <b>25</b> |
| <b>2.3.3 Mikrosateliti</b>  | <b>26</b> |
| 2.4 MORFOMETRIČNE MERITVE IN ANALIZA  | 30        |
| <b>3 REZULTATI</b>  | <b>34</b> |
| 3.1 VZORČENJE ŠKRŽATKOV IZ RODU <i>APHRODES</i>   | 34        |
| 3.2 VIBRACIJSKI SIGNALI ŠKRŽATKOV IZ RODU <i>APHRODES</i>                                       | 35        |

|              |   |    |
|--------------|---|----|
| <b>3.2.1</b> | <b>Pozivni napevi samcev</b>  | 35 |
| <b>3.2.2</b> | <b>Odzivni napevi samic in duet</b>   | 41 |
| <b>3.2.3</b> | <b>Dvojice v pozivnih napevih samcev <i>A. bicincta</i> in tipa <i>A. 'Dragonja'</i></b>                              | 47 |
| <b>3.2.4</b> | <b>Atipični pozivni napevi tipa <i>A. 'Dragonja'</i></b>  | 52 |
| <b>3.3</b>   | <b>PREFERENCE SAMIC ZA POZIVNE NAPEVE SAMCEV<br/>LASTNE IN DRUGIH VRST</b>  | 56 |
| <b>3.3.1</b> | <b>Vrste <i>A. aestuarina</i>, <i>A. bicincta</i>, <i>A. diminuta</i> in <i>A. makarovi</i></b>                       | 56 |
| <b>3.3.2</b> | <b>Tip <i>A. 'Dragonja'</i></b>   | 58 |
| <b>3.4</b>   | <b>ODZIVNOSTI SAMIC NA VRSTNO-SPECIFIČNE ELEMENTE<br/>V POZIVNIH NAPEVIH SAMCEV</b>                                   | 59 |
| <b>3.4.1</b> | <b>Vrste <i>A. aestuarina</i>, <i>A. bicincta</i>, <i>A. diminuta</i> in <i>A. makarovi</i></b>                       | 59 |
| <b>3.4.2</b> | <b>Tip <i>A. 'Dragonja'</i></b>   | 62 |
| <b>3.5</b>   | <b>ZNOTRAJVRSTNA IN MEDVRSTNA PARJENJA</b>  | 63 |
| <b>3.5.1</b> | <b>Znotrajvrstna parjenja</b>   | 63 |
| <b>3.5.2</b> | <b>Medvrstna parjenja</b>   | 65 |
| 3.5.2.1      | Recipročno parjenje <i>A. aestuarina</i> x <i>A. bicincta</i>   | 65 |
| 3.5.2.2      | Recipročno parjenje <i>A. bicincta</i> x <i>A. 'Dragonja'</i>   | 68 |
| <b>3.6</b>   | <b>GENETSKE ANALIZE</b>   | 70 |
| <b>3.6.1</b> | <b>Fragment COI</b>   | 70 |
| <b>3.6.2</b> | <b>Mikrosateliti</b>  | 72 |
| <b>3.7</b>   | <b>MORFOMETRIČNE ANALIZE</b>  | 73 |
| <b>3.7.1</b> | <b>Samci</b>  | 73 |
| 3.7.1.1      | Samci tipa <i>A. 'Dragonja'</i>   | 76 |
| <b>3.7.2</b> | <b>Samice</b>   | 79 |
| <b>4</b>     | <b>RAZPRAVA</b>   | 83 |
| <b>4.1</b>   | <b>RAZŠIRJENOST ŠKRŽATKOV RODU <i>APHRODES</i></b>  | 83 |
| <b>4.2</b>   | <b>VLOGA VIBRACIJSKIH SIGNALOV PRI NASTANKU IN<br/>VZDRŽEVANJU REPRODUKTIVNE IZOLACIJE<br/>V RODU <i>APHRODES</i></b> | 83 |
| <b>4.2.1</b> | <b>Primer vrst <i>A. aestuarina</i> in <i>A. bicincta</i></b>   | 84 |
| <b>4.2.2</b> | <b>Tip <i>A. 'Dragonja'</i></b>   | 87 |
| <b>4.3</b>   | <b>RAZHAJANJE POZIVNIH NAPEVOV</b>  | 88 |
| <b>4.4</b>   | <b>MORFOLOGIJA</b>  | 89 |
| <b>4.5</b>   | <b>STATUS TIP A. 'DRAGONJA'</b>   | 90 |
| <b>5</b>     | <b>SKLEPI</b>   | 92 |
| <b>6</b>     | <b>POVZETEK (SUMMARY)</b>   | 94 |
| 6.1          | POVZETEK  | 94 |
| 6.2          | SUMMARY   | 96 |
| <b>7</b>     | <b>VIRI</b>   | 99 |

## KAZALO PREGLEDNIC

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Pregl. 1:  | Vzorčna mesta v Sloveniji in Italiji z oznako vrst nabranih na teh lokacijah  | 15 |
| Pregl. 2:  | Stimulacijski programi (s1-s5) za ugotavljanje preference samic za pozivne napeve samcev lastne in drugih vrst  | 21 |
| Pregl. 3:  | Stimulacijska zaporedja (e1-e5) za določanje odzivnosti samic na vrstno-specifične elemente pozivnih napevov samcev   | 23 |
| Pregl. 4:  | Uspešno pomnoženi mikrosatelitni lokusi, njihov pričakovani motiv glede na pirosekvenciranje (Roche 454 Titanium) in oligonukleotidni začetniki   | 28 |
| Pregl. 5:  | PCR protokoli za uspešno pomnožene mikrosatelitne lokuse  | 29 |
| Pregl. 6:  | Opis morfometričnih znakov izmerjenih na telesu in aedeagusu ter razmerij, ki smo jih vključili v linearno diskriminantno analizo za razlikovanje med vrstami rodu <i>Aphrodes</i>  | 32 |
| Pregl. 7:  | Časovni parametri in dominantna frekvenca vrstno-specifičnih zvočnih elementov samcev   | 39 |
| Pregl. 8:  | Časovni parametri in dominantna frekvenca vrstno-specifičnih odgovorov samic  | 46 |
| Pregl. 9:  | Različni parametri poteka znotrajvrstnih parjenj  | 64 |
| Pregl. 10: | Rezultati zadrževanja samcev in samic na rastlini v poskusih medvrstnih križanj med <i>A. bicincta</i> in <i>A. 'Dragonja'</i> , ki se niso končali s kopulacijo  | 69 |
| Pregl. 11: | Povprečna razlika med sekvencami znotraj štirih vrst rodu <i>Aphrodes</i> in tipom <i>A. 'Dragonja'</i> , ter med štirimi vrstami, tipom <i>A. 'Dragonja'</i> in še dvema vrstama iz družine Aphrodinae <i>Anoscopus limicola</i> in <i>Planaphrodes trifasciata</i> izračunano z dvoparametričnim modelom zamenjav po Kimuri | 72 |
| Pregl. 12: | Parametri variabilnosti po posameznih mikrosatelitnih lokusih   | 73 |



## KAZALO SLIK

|         |   |    |
|---------|---|----|
| Sl. 1:  | Predstavnik samca in samice škržatkov rodu <i>Aphrodes</i> (Hemiptera: Cicadellidae)  | 5  |
| Sl. 2:  | Pozivni napevi samcev vrst <i>A. aestuarina</i> , <i>A. bicincta</i> , <i>A. diminuta</i> in <i>A. makarovi</i>             | 9  |
| Sl. 3:  | Pozivni napev samca tipa <i>A. 'Dragonja'</i>   | 10 |
| Sl. 4:  | Eksperimentalna postavitve za registracijo vibracijskih signalov in predvajanje predhodno posnetih stimulacijskih signalov  | 18 |
| Sl. 5:  | Primerjava časovnih parametrov ponavljajočih se dvojic v pozivnih napevih samcev <i>A. bicincta</i> in <i>A. 'Dragonja'</i> | 20 |
| Sl. 6:  | Eksperimentalna postavitve za poskuse s parjenjem   | 24 |
| Sl. 7:  | Slika gela iz elektroforeze s pomnožki dveh izbranih mikrosatelitnih lokusov  | 29 |
| Sl. 8:  | Morfometrični parametri izmerjeni na telesu in aedeagusu  | 31 |
| Sl. 9:  | Prisotnost različnih tipov napevov rodu <i>Aphrodes</i> v Sloveniji   | 35 |
| Sl. 10: | Celotni pozivni napev samca vrste <i>A. aestuarina</i> in posamezna zvočna elementa   | 36 |
| Sl. 11: | Pozivni napev samca vrste <i>A. bicincta</i> in posamezni zvočni elementi   | 36 |
| Sl. 12: | Celotni pozivni napev samca vrste <i>A. diminuta</i> in posamezni zvočni elementi   | 37 |
| Sl. 13: | Celotni pozivni napev samca vrste <i>A. makarovi</i> in posamezni zvočni elementi   | 37 |
| Sl. 14: | Pozivni napev samca vrste <i>A. 'Dragonja'</i> in posamezni zvočni elementi   | 38 |

|         |  |    |
|---------|--|----|
| Sl. 15: | Primerjava parametrov vrstno-specifičnih elementov v pozivnih napevih samcev štirih vrst rodu <i>Aphrodes</i> in tipom <i>A. 'Dragonja'</i>  | 41 |
| Sl. 16: | Odgovor samice vrste <i>A. aestuarina</i>  | 41 |
| Sl. 17: | Odgovor samice vrste <i>A. bicincta</i>  | 43 |
| Sl. 18: | Odgovor samice vrste <i>A. diminuta</i>  | 43 |
| Sl. 19: | Odgovor samice vrste <i>A. makarovi</i>  | 45 |
| Sl. 20: | Odgovor samice vrste <i>A. 'Dragonja'</i>  | 45 |
| Sl. 21: | Razlike v ponavljalnih časih in dolžini odzivnega napeva samic štirih vrst rodu <i>Aphrodes</i> in tipa <i>A. 'Dragonja'</i>   | 47 |
| Sl. 22: | Primerjava časovnih parametrov ponavljajočih se dvojic pulzov in čirikov v pozivnih napevih samcev <i>A. bicincta</i> in <i>A. 'Dragonja'</i>  | 49 |
| Sl. 23: | Primerjava časovnih parametrov pulza in čirika dvojic <i>A. bicincta</i> in <i>A. 'Dragonja'</i>   | 50 |
| Sl. 24: | Detajlna predstavitev ponavljajočih se dvojic pulza in čirika v pozivnem napevu <i>A. 'Dragonja'</i> na različnih časovnih oseh  | 51 |
| Sl. 25: | Primeri atipičnih pozivnih napevov tipa <i>A. 'Dragonja'</i> , ki ponazarjajo možne prehode v strukturi zvočnih elementov med tipičnimi dvojicami <i>A. 'Dragonja'</i> in <i>A. bicincta</i> | 53 |
| Sl. 26: | Primeri atipičnih pozivnih napevov tipa <i>A. 'Dragonja'</i> , ki ponazarjajo možne prehode v strukturi zvočnih elementov med tipičnimi dvojicami <i>A. 'Dragonja'</i> in <i>A. bicincta</i> | 54 |
| Sl. 27: | Primeri atipičnih pozivnih napevov tipa <i>A. 'Dragonja'</i> , ki ponazarjajo možne prehode v strukturi zvočnih elementov med tipičnimi dvojicami <i>A. 'Dragonja'</i> in <i>A. bicincta</i> | 55 |
| Sl. 28: | Delež odgovorov samic na pozivne napeve samcev vseh vrst in tip <i>A. 'Dragonja'</i>   | 56 |

|         |  |    |
|---------|--|----|
| Sl. 29: | Delež odgovorov samic <i>A. aestuarina</i> na prvih deset dvojic pozivnega napeva samcev <i>A. bicincta</i>  | 57 |
| Sl. 30: | Delež odgovorov samic <i>A. 'Dragonja'</i> na pozivne napeve samcev vseh vrst in tip <i>A. 'Dragonja'</i>  | 58 |
| Sl. 31: | Natančna predstavitev odgovorov 15 samic tipa <i>A. 'Dragonja'</i> na pozivne napeve samcev vseh vrst in tip <i>A. 'Dragonja'</i>  | 58 |
| Sl. 32: | Dendogram evklidskih razdalj izračunanih iz odgovorov 15 samic tipa <i>A. 'Dragonja'</i> na napeve samcev vseh vrst in tip <i>A. 'Dragonja'</i>  | 59 |
| Sl. 33: | Delež odgovorov samic vseh vrst na zvočne elemente pozivnih napevov samcev vseh vrst in tip <i>A. 'Dragonja'</i>   | 62 |
| Sl. 34: | Delež odgovorov samic <i>A. 'Dragonja'</i> na zvočne elemente samcev vseh vrst in tip <i>A. 'Dragonja'</i>   | 62 |
| Sl. 35: | Dvorjenje v rodu <i>Aphrodes</i>   | 63 |
| Sl. 36: | Uspeh medvrstnih parjenj med vrstama <i>A. aestuarina</i> in <i>A. bicincta</i>  | 65 |
| Sl. 37: | Vedenjski parametri znotrajvrstnih in medvrstnih parjenj vrst <i>A. aestuarina</i> in <i>A. bicincta</i>   | 68 |
| Sl. 38: | Uspeh medvrstnih parjenj med vrsto <i>A. bicincta</i> in tipom <i>A. 'Dragonja'</i>  | 69 |
| Sl. 39: | Čas, ki so ga na rastlini preživeli samci, ki so sodelovali v križanjih <i>A. aestuarina</i> x <i>A. bicincta</i> ter <i>A. 'Dragonja'</i> x <i>A. bicincta</i> in se niso zaključili s kopulacijo | 70 |
| Sl. 40: | Filogenetsko drevo po metodi združevanja sosedov in dvoparametričnim modelom zamenjav po Kimuri (Kimura 1980) za 600 bp dolg COI fragment za 52 haplotipov osebkov rodu <i>Aphrodes</i>            | 71 |
| Sl. 41: | Linearna diskriminantna analiza na osnovi 14 morfoloških znakov za samce štirih vrst   | 74 |

|         |  |    |
|---------|--|----|
| Sl. 42: | Telo samcev in aedeagusi s frontalne strani štirih vrst rodu <i>Aphrodes</i>   | 75 |
| Sl. 43: | Lateralni pogled na aedeaguse vseh štirih vrst rodu <i>Aphrodes</i>  | 75 |
| Sl. 44: | Telo samca tipa A. ' <i>Dragonja</i> ' in aedeagus (frontalno in od strani)  | 76 |
| Sl. 45: | Linearna diskrimantna analiza na osnovi 14 morfoloških znakov za samce štirih vrst in tip A. ' <i>Dragonja</i> '                       | 77 |
| Sl. 46: | Linearna diskrimantna analiza 14 morfometričnih znakov za samce štirih vrst in A. ' <i>Dragonja</i> ' nabrane samo v Sloveniji         | 78 |
| Sl. 47: | Linearna diskrimantna analiza na osnovi 7 morfoloških znakov za samice štirih vrst rodu <i>Aphrodes</i>                                | 79 |
| Sl. 48: | Samice vseh štirih vrst rodu <i>Aphrodes</i> in tipa A. ' <i>Dragonja</i> '  | 80 |
| Sl. 49: | Linearna diskrimantna analiza na osnovi 7 morfoloških znakov za samice štirih vrst rodu <i>Aphrodes</i> in tipa A. ' <i>Dragonja</i> ' | 81 |
| Sl. 50: | Linearna diskrimantna analiza na osnovi 7 morfoloških znakov za vse samice iz rodu <i>Aphrodes</i> nabrane samo v Sloveniji            | 82 |

## KAZALO PRILOG

- PRILOGA A: Seznam osebkov, ki so bili vključeni v vedenjsko, morfološko in/ali genetsko analizo.
- PRILOGA B: Seznam osebkov, ki so bili vključeni v vedenjsko, morfološko in/ali genetsko analizo.
- PRILOGA C: Obseg vrednosti morfoloških znakov izmerjenih na telesu samcev štirih vrst rodu *Aphrodes* (prirejeno po Bluemel in sod., 2014).
- PRILOGA D: Obseg vrednosti morfoloških znakov izmerjenih na aedeagusu samcev štirih vrst rodu *Aphrodes* (prirejeno po Bluemel in sod., 2014).
- PRILOGA E: Obseg vrednosti morfoloških znakov izmerjenih na telesu samic štirih vrst rodu *Aphrodes* (prirejeno po Bluemel in sod., 2014).
- PRILOGA F: Obseg vrednosti razmerij morfoloških znakov izmerjenih na telesu samcev štirih vrst rodu *Aphrodes* izključenih iz LDA analiz (prirejeno po Bluemel in sod., 2014).
- PRILOGA G: Obseg vrednosti razmerij morfoloških znakov izmerjenih na aedeagusu samcev štirih vrst rodu *Aphrodes* izključenih iz LDA analiz (prirejeno po Bluemel in sod., 2014).
- PRILOGA H: Obseg vrednosti razmerij morfoloških znakov izmerjenih na telesu samic štirih vrst rodu *Aphrodes* izključenih iz LDA analiz (prirejeno po Bluemel in sod., 2014).
- PRILOGA I: Obseg vrednosti morfoloških znakov izmerjenih na telesu samcev vrst *A. bicincta* in tipa *A. 'Dragonja'*.
- PRILOGA J: Obseg vrednosti morfoloških znakov izmerjenih na aedeagusu samcev *A. bicincta* in tipa *A. 'Dragonja'*.
- PRILOGA K: Obseg vrednosti morfoloških znakov izmerjenih na telesu samic vrst *A. bicincta* in tipa *A. 'Dragonja'*.

### Okrajšave in simboli

|              |  |
|--------------|--|
| <b>COI</b>   | podenota I citokrom c oksidaze                                 |
| <b>Čirik</b> | zvok iz skupine pulzov, ki ga naš sluh prepozna kot eno enoto  |
| <b>LDA</b>   | linearna diskriminantna analiza                                |
| <b>mtDNA</b> | mitohondrijska deoksiribonukleinska kislina                    |
| <b>PCR</b>   | verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction) |
| <b>Pulz</b>  | homogena enota zvoka končnega trajanja                         |

## 1 UVOD

Biotsko raznovrstnost (biodiverzitet) predstavljajo ne le sezname z imeni vrst, temveč tudi ogromna količina variabilnosti (morfološke, genetske in vedenjske), ki je skrita v osebkih teh vrst (de Carvalho in sod., 2008). Razlike znotraj geografsko široko razširjenih vrst zastavljajo eno od pomembnih osnovnih vprašanj v evoluciji: ali predstavljajo začetno stopnjo v nastanku vrst (oz. vrste v nastajanju), prikrite (kriptične) vrste ali pa samo visok nivo variabilnosti znotraj vrste?

Biodiverzitet je rezultat dveh procesov, nastanka in izginjanja (izumiranja ali zlitja) vrst (Boake, 2000). Nastanek vrst ostaja eden od najpomembnejših, a še vedno težko opredeljivih konceptov v evolucijski biologiji predvsem zato, ker vključuje tako naravno (ekološko) kot tudi spolno selekcijo ter številne procese (npr. poliplodizacijo, hibridizacijo, genetski drs, ustanoviteljev učinek, ozka grla, fiksacijo nekompatibilnih alelov v alopatričnih populacijah, ojačenje (ang. reinforcement) (Coyne in Orr, 2004; Rundle in Nosil, 2005; Futuyma, 2005; Maan in Seehausen, 2011; Marie Curie Speciation Network, 2012).

V skladu z biološkim konceptom vrste, ki ga je leta 1942 opredelil Ernst Mayr, je reproduktivna izolacija kriterij za razločevanje vrst (Mayr, 1942). Za razumevanje tako nastanka kot tudi zlitja vrst je potrebno identificirati vzroke, ki v naravi vodijo do nastanka in vzdrževanja reproduktivne izolacije.

Ekološka speciacija, pri kateri se reproduktivna izolacija razvije kot rezultat razhajanja na osnovi naravne selekcije, se nanaša na procese, pri katerih ovira pretoku genov med populacijami nastane kot rezultat razlik v selekciji na osnovi ekoloških procesov (pregled npr. v Rundle in Nosil, 2005). Le-ti pa so posledica interakcij osebkov z okoljem in ekološka speciacija vključuje ne-le vplive okolja (habitata), temveč tudi vplive plenilcev in tekmecev prisotnih v tem okolju.

Spolna selekcija je različno uspešna reprodukcija osebkov, ki je posledica ali neposredne kompeticije med pripadniki istega spola ali izbire spolnega partnerja (npr. Panhuis in sod., 2001). O nastanku vrst na osnovi spolne selekcije govorimo v primeru, ko so vzporedne spremembe v sekundarnih spolnih znakih (npr. zvočnih signalih) in v procesu izbora partnerjev znotraj populacije, osnovni vzrok za nastanek reproduktivne izolacije med naravnimi populacijami (pregled npr. v Panhuis in sod., 2001). Izrazite razlike v signalih in preferenci pri izboru partnerjev med ozko sorodnimi vrstami v povezavi z razlikami v teh značilnostih med geografsko ločenimi populacijami posamezne vrste, so znak delovanja spolne selekcije v procesu nastanka vrst.

V skladu s hipotezo o vplivu senzoričnega pritiska (ang. sensory drive) na nastanek vrst, se celoten sistem sporazumevanja prilagaja lokalnemu okolju, tako da so signali bolj zaznavni in prepoznavni (npr. prevajanje signalov v okolju, uglasenost prejemnika) (Endler in Basolo, 1998). Reproductivna izolacija nastane kot stranski rezultat razhajanja med populacijami zaradi vedenjskega prilagajanja okolju in tako naravna (ekološka) kot tudi spolna selekcija sta vpleteni v divergenco paritvenih signalov (Endler in Basolo, 1998; Boughman, 2002).

## 1.1 VLOGA ZVOČNIH SIGNALOV V REPRODUKTIVNI IZOLACIJI

Signali, ki jih živali uporabljajo pri spolni komunikaciji imajo pomembno vlogo pri nastanku in vzdrževanju predparitvene reproduktivne izolacije med vrstami (Panhuis in sod., 2001; Coyne in Orr, 2004; Ritchie, 2007; Kraaijeveld in sod., 2010). Ker se spolni signali med ozko sorodnimi vrstami običajno razlikujejo (npr. Ryan in Rand, 1995; Mullen in sod., 2007; Seehausen in sod., 2008; Arnegard in sod., 2010), jih pogosto uporabljajo za prepoznavanje kriptičnih vrst (npr. Angulo in Reichle, 2008; Braune in sod., 2008; Henry in sod., 2013). Da bi pojasnili procese, ki so osnova nastanka vrst, so sporazumevanje med spolnimi partnerji in vedenjsko izolacijo med ozko sorodnimi vrstami obširno raziskovali (pregled v Coyne in Orr, 2004; Pillay in Rymer, 2012). Zvočni signali so še posebej primerni za prepoznavanje spolnih partnerjev, saj jih partnerji lahko uporabljajo tudi kadar niso v neposredni bližini (Wilkins in sod., 2013). Razlike v zvočni komunikaciji med ozko sorodnimi vrstami so raziskovali v številnih živalskih skupinah, vključno s sesalci (npr. Ptacek, 2000; Braune in sod., 2008; Campbell in sod., 2010), ptiči (npr. Ratcliffe in Grant, 1985; Dingle in sod. 2010; Cardoso in sod., 2012) in ribami (Verzijden in sod. 2010; Danley in sod., 2012).

Najbolj raziskane primere zvočnih signalov in z njimi povezanih preferenc prejemnika najdemo pri žabah (npr. Gerhardt in Huber, 2002; Ryan in sod., 2003; Boul in sod., 2007; Klymus in sod., 2012) in žuželkah iz skupine ravnokrilcev (Orthoptera) (npr. Gray, 2005; Honda-Sumi, 2005; Jang in Gerhardt, 2006; Beckers in Schul, 2010; Grace in Shaw, 2011). Posledica tega je, da je bila večina raziskav prepoznavanja spolnih partnerjev osredotočena na tiste sisteme, v katerih samci oddajajo zvočne signale, ki se prenašajo po zraku in se neme samice približajo pojočim samcem (vendar glej tudi Emerson in Boyd, 1999; Bailey 2003). Vendar pa je nedavno pričel prevladovati pogled, da je najbolj razširjena oblika zvočne komunikacije sporazumevanje z zvočnimi signali, ki se prenašajo preko podlage (vibracijska komunikacija) (Virant-Doberlet in Čokl, 2004; Cocroft in Rodríguez, 2005; Hill, 2009).



### 1.1.1 Sporazumevanje z vibracijskimi signali

Čeprav je obstoj vibracijske komunikacije poznan že stoletja, se njenega dejanskega pomena dolgo časa nismo zavedali. Najnovejše raziskave kažejo, da se z zvokom, ki se prenaša preko podlage sporazumeva preko 220.000 vrst živali. Vibracijska komunikacija je najbolj razširjena med členonožci (Virant-Doberlet in Čokl, 2004; Coccoft in Rodríguez, 2005) najdemo pa jo tudi pri vretenčarjih, vključno s sesalci (Hill, 2009). Vibracijsko komunikacijo kot del paritvenega vedenja so do sedaj opisali pri naslednjih skupinah žuželk: Orthoptera, Embioptera, Mantophasmatodea, Plecoptera, Thysanoptera, Hemiptera, Coleoptera, Neuroptera, Megaloptera, Raphidioptera, Coleoptera, Mecoptera, Trichoptera, in Diptera (pregled v Virant-Doberlet in Čokl, 2004). V nasprotju s komunikacijskim sistemom, ki ga poznamo pri žabah in ravnokrilcih, se partnerja, ki se sporazumevata z vibracijskimi signali v večini primerov oglašata v duetu in samec se približa mirujoči samici (Claridge, 1985; Bailey, 2003; Virant-Doberlet in Čokl, 2004; Virant-Doberlet in sod., 2006a). Ne-glede na razširjenost in pomen vibracijske komunikacije so vlogo vibracijskih signalov in strukture dueta v predparitveni izolaciji le redko sistematično raziskovali, poleg tega pa so rezultati pokazali bistvene razlike med temi komunikacijski sistemi.

Pri tenčičaricah iz skupine *Chrysoperla carnea* (Stephens) samec in samica oddajata enake, vendar vrstno-specifične vibracijske signale (Wells in Henry, 1998; Henry in Wells, 2010; Noh in Henry, 2010). Tenčičarice obeh spolov preferirajo napev lastne vrste, hkrati pa osebki, ki pogosteje odgovarjajo na napev lastne vrste, pogosteje odgovarjajo tudi na napeve drugih vrst (Noh in Henry, 2010). Vrste so se med seboj razlikovale še v odzivnosti in pri nekaterih so samice bolj razlikovale med napevi različnih vrst kot samci (Noh in Henry, 2010).

Pri grbastih škržatkah iz kompleksa *Enchenopa binotata* Say so vibracijski signali vrstno- in spolno-specifični, vendar so slednji med vrstami le variacije istega vzorca (Rodríguez in sod., 2004; Rodríguez in Coccoft, 2006; Coccoft in sod., 2010). Samice pogosteje odgovarjajo na pozivni napev samca iste vrste, vendar kažejo visoko odzivnost tudi na signale samcev nekaterih drugih vrst v kompleksu (Rodríguez in sod., 2004). Samci ne preferirajo vibracijskih signalov samic lastne vrste (Rodríguez in sod., 2012).

Tudi pri škržatkah iz rodu *Ribautodelphax* Wagner so vibracijski signali vrstno- in spolno-specifični in variacije istega vzorca (den Bieman, 1986), vendar je preferenca samic do pozivnih napevov samcev lastne vrste zelo šibka, medtem ko samci dobro razlikujejo med signali samic različnih vrst (de Winter in Rollenhagen, 1990).

V paritvenih sistemih, ki temeljijo na duetu, vrstno- in spolno-specifični signali omogočajo identifikacijo (vrsto in spol) oddajnika in tudi prispevajo informacijo potrebno za lokalizacijo oddajnika (Bailey, 2003; Legendre in sod., 2012; Virant-Doberlet in sod., 2006a). V takih sistemih lahko oba spola različno prispevata k izločilnemu parjenju (ang. assortative mating) in s tem k reproduktivni izolaciji med vrstami (Kozak in sod., 2009; Servedio, 2007). Izmenjevanje samčevih in samičnih signalov je kompleksen in dinamičen proces, v katerem oba partnerja prilagajata signale in vedenje odgovoru partnerja (de Groot in sod., 2012; Mazzoni in sod., 2009, Rodríguez in sod., 2012). V tistih duetnih sistemih v katerih samci tudi lokalizirajo samice, se ti praviloma ne približajo samici, ki ne odgovarja. Poleg tega lahko neprimeren odgovor samice zmanjša možnost parjenja, ali zato, ker jo samec ne prepozna kot zaželenega partnerja ali zato, ker tak odgovor ne omogoča uspešne ali hitre lokalizacije samice (de Groot in sod., 2011; de Winter in Rollenhagen, 1990).

#### 1.1.1.1 Vloga vibracijskih signalov v speciaciji

Vlogo vibracijskih signalov v procesu nastanka vrst so opisali le v dveh modelnih skupinah.

Pri škržatkih iz kompleksa *E. binotata* so raziskovali vlogo vibracijske komunikacije v procesu simpatričnega nastanka vrst (pregled v Cocroft in sod., 2008; 2010). V tej skupini, ki jo sestavlja 11 ozko sorodnih vrst prilagojenih na specifične gostiteljske drevesne vrste, se pozivni napevi samcev različnih vrst razlikujejo predvsem v dominantni frekvenci (Cocroft in sod. 2010). Predvidevajo, da je razhajanje v frekvenci vibracijskih signalov med posameznimi vrstami posledica prilagajanja gostiteljskim rastlinam, ki se razlikujejo v prevajalnih lastnostih (ang. sensory drive) (McNett in Cocroft, 2008). Samice izbirajo med potencialnimi partnerji na osnovi variabilnosti med samci znotraj vrste, kar nakazuje na vpliv spolne selekcije (Rodríguez in sod., 2004) in preferenca samic, je po vsej verjetnosti vplivala na evolucijo vibracijskih pozivnih napevov samca (Rodríguez in sod., 2006).

Vibracijski signali imajo glavno vlogo v predparitveni reproduktivni izolaciji med kriptičnimi vrstami tenčičaric iz skupine *Chrysoperla carnea* (pregled v Henry in sod., 2013). Rezultati kažejo na konvergenco evolucije vibracijskih napevov pri vrstah, ki živijo na različnih kontinentih (Henry in sod., 1999), vendar naj adaptacija vibracijskih signalov na rastline, na katerih se tenčičarice zadržujejo, ne bi vplivala na evolucijo signalov (Henry in Wells, 2004). Predpostavljajo, da je, čeprav razhajanje vrst pri tenčičaricah sproži naključna mutacija, osnovni vzrok zanj izključno spolna selekcija (Henry in sod., 2002; Henry in Wells, 2004).

## 1.2 ROD APHRODES

Škržatki iz rodu *Aphrodes* Curtis, 1833, so predstavniki družine Cicadellidae (Hemiptera: Auchenorrhyncha), ki je s preko 22.000 vrstami ena najštevilčnejših skupin rastlinojedih žuželk (Dietrich, 2004). Ti škržatki so relativno veliki (samci približno 6 mm, samice 7 mm) (slika 1). So pogosti in splošno razširjeni v Palearktiki ter tudi v S Ameriki, kamor naj bi jih zanesel človek (Hamilton, 1983; Tishechkin 1998; Nickel in Remane, 2002). Razširjenost vrste *A. aestuarina* je po vsej verjetnosti omejena na J in V Anglijo (Bluemel in sod, 2011, 2014), čeprav v literaturi navajajo njeno prisotnost tudi v Nemčiji (Nickel in Remane, 2002), Italiji (d'Urso, 1995), Poljski (Nast, 1987), Nizozemski (den Bieman in sod., 2011), Irski (Helden, 2005) in Danski (Endrestøl, 2013). Favna škržatkov Slovenije vsebuje vrsti *A. makarovi* in *A. bicincta* (Seljak, 2004, Holzinger in Seljak, 2001).



Slika 1: Predstavnika samca in samice škržatkov rodu *Aphrodes* (Hemiptera: Cicadellidae) (Kunz in sod., 2011)

Figure 1: Representatives of a male and a female leafhopper from the genus *Aphrodes* (Hemiptera: Cicadellidae) (Kunz et al., 2011)

### 1.2.1 Taksonomija rodu *Aphrodes*

Rod *Aphrodes* je poznan kot taksonomsko zahtevna skupina in vključuje najmanj štiri morfološko izjemno podobne vrste, ki jih tudi poznavalci pogosto uvrščajo le v skupino *Aphrodes bicincta sensu lato*. Vrste v tem rodu bi lahko označili tudi kot kriptične (Bickford in sod., 2007), saj so jih zaradi morfološke podobnosti v preteklosti razvrščali kot ekotipe ene same vrste (Le Quesne, 1965; Nast, 1972).

Štiri najpogosteje omenjene vrste so *A. aestuarina* (Edwards), 1908, *A. bicincta* (Schrank), 1776, *A. diminuta* Ribaut, 1952 in *A. makarovi* Zachvatkin, 1948. Znaki za razpoznavanje samcev so nezanesljivi, določanje ličink in samic na osnovi morfoloških znakov pa vsaj trenutno ni možno. Obarvanost ter velikost in oblika aedeagusa so zelo variabilni in morfološki znaki za določanje samcev se med vrstami prekrivajo. Težave pri določanju vrst iz tega rodu še dodatno povečuje dejstvo, da zaradi nedoslednosti pri določanju vrst in številnih taksonomskih revizij obstaja veliko število nerazjasnenih sinonimov (npr. Hamilton, 1975; 1983). Zmedo v taksonomiji tega rodu najboljše

ponazarja dejstvo, da je v internetni zbirki podatkov Fauna Europea navedenih 12 vrst, medtem ko Species 2000 & ITIS Catalogue of Life vsebuje 28 vrst tega rodu. V prvi od teh internetnih taksonomskih baz vrsta *A. diminuta* ni vključena, medtem ko druga ne navaja nobene od zgoraj omenjenih vrst.

Do začetka 20. stoletja se morfologija aedeagusa ni rutinsko uporabljala kot taksonomski znak v sistematiki škržatkov in vrste so pogosto opisovali zgolj na osnovi barve, velikosti in oblike telesa ter ekologije. Mnogi muzejski primerki škržatkov iz rodu *Aphrodes* so ličinke ter samice in zaradi tega pogosto ni mogoče uporabiti muzejskih primerkov za preverjanje svežega materiala ali pa za potrditev taksonomske pripadnosti tipskih muzejskih primerkov na osnovi novih spoznanj. Nedavno so molekularne analize muzejskih primerkov iz tega rodu pokazale, da je bila večina analiziranih osebkov uvrščena v napačno vrsto ter da je sintipska serija za vrsto *A. aestuarina* sestavljena iz osebkov vrst *A. makarovi* in *A. aestuarina* (Bluemel in sod., 2011).

Povezovanje različnih vrst taksonomskih podatkov (morfoloških, molekularnih, vedenjskih in ekoloških) v celostno taksonomijo (ang. integrative taxonomy) je prepoznano kot najzanesljivejša metoda za prepoznavanje vrst (Schlick-Steiner in sod., 2010). Tishechkin (1998) je prvi uporabil vrstno-specifične pozivne napeve samcev iz rodu *Aphrodes* kot osnovo za določanje morfoloških razlik med vrstami *A. bicincta*, *A. diminuta* in *A. makarovi* (vrste *A. aestuarina* ni vključil v svojo študijo). Registriral je napeve manjšega števila samcev na določeni lokaciji in zatem povezal določen akustični profil z morfološkimi znaki vseh samcev nabranih na tej lokaciji. Vrstno pripadnost samic je določil na osnovi vrst samcev najdenih na določeni lokaciji. Njegovi rezultati so v sistematiko tega rodu vnesli dodatne nejasnosti, saj pri svojem delu ni upošteval možnosti, da se na isti lokaciji mogoče istočasno nahaja več vrst.

### **1.2.2 Ekologija in biologija škržatkov iz rodu *Aphrodes***

Vrste iz tega rodu so pomembni predstavniki travniških združb (Nickel in Achtziger, 2005), medtem ko vrsto *A. aestaurina* najdemo le v predelih estuarijev, ki jih redno poplavlja morska voda (Bluemel in sod., 2014). So tudi prenašalci fitoplazem, ki povzročajo bolezni rastlin (Lee in sod., 1998; Weintraub in Beanland, 2006). Škržatki iz tega rodu so zaradi svoje razširjenosti in številčnosti pogosto omenjeni v ekoloških raziskavah (Brown in sod., 1992; Hollier in sod., 1994; Jobin in sod., 1996; Huusela-Veistola in Vasarainen, 2000; Eyre in sod., 2001, 2005; Eyre, 2005; Fisher-Barham in Stewart, 2005; Maczey in sod., 2005; Morris in sod., 2005; Nickel in Achtziger, 2005; Strauss in Biederman, 2006, 2008; Kattwinkel in sod., 2009, 2011; Keathley in Potter, 2012; Körösi in sod., 2012; Schuch in sod., 2012; Trivellone in sod., 2012). Kot potencialni vektorji so bili vključeni tudi v raziskave prenosa rastlinskih patogenov

(Denes in Sinha, 1992; Carraro in sod., 2004; Bressan in sod., 2006; Riedle-Bauer in sod., 2008).

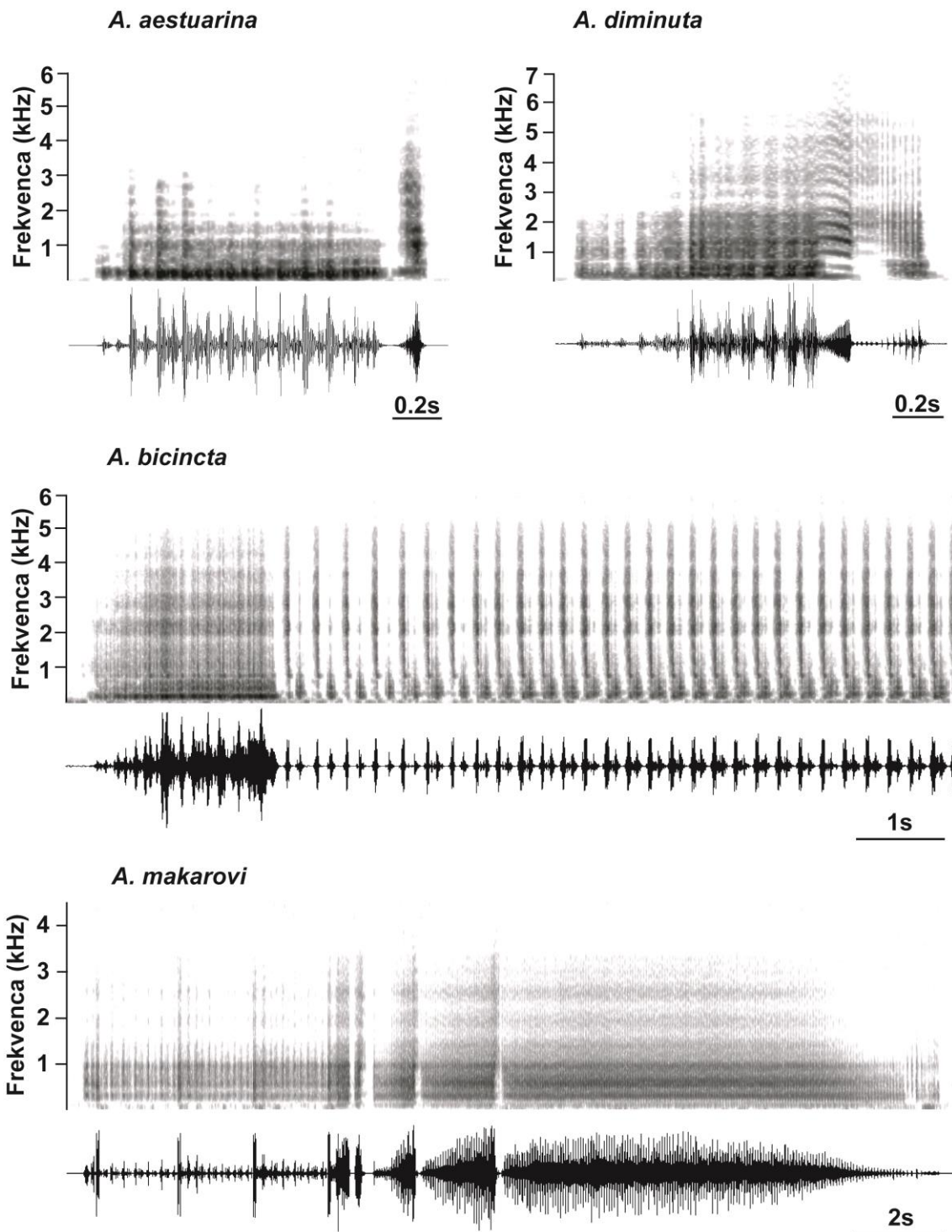
Škržatki iz rodu *Aphrodes* se hranijo z rastlinskimi sokovi in zanje v glavnem navajajo, da se nahajajo na specifičnih gostiteljskih rastlinah (npr. Tishechkin, 1998; Nickel, 2003). Za vrsto *A. makarovi* naj bi bila tipična gostiteljska rastlina velika kopriva (*Urtica dioica*), vrsti *A. bicincta* in *A. diminuta* naj bi se hranili z rastlinami družine metuljnic (Fabaceae). Vrsto *A. aestuarina* so našli na tolščakasti lobodi (*Atriplex portulacoides*) (Bluemel in sod., 2014).

Ti škržatki imajo eno generacijo letno in prezimijo v stadiju jajčec, ki jih odlagajo v rastlinska tkiva (Chiykowski, 1970). V Sloveniji se prvi odrasli osebki pojavijo v drugi polovici maja (na Obali), samice pa v notranjosti najdemo v naravi tudi še v začetku oktobra (Derlink, osebna opažanja). Za življenjski cikel teh škržatkov sta značilni protandrija in reproduktivna asinhronost (Calabrese in Fagan, 2004). Odrasli samci se pojavijo pred samicami ter tudi prej spolno dozori in umrejo. Tekom sezone se število samcev v populaciji postopno zmanjšuje in v pozni sezoni, ko populacijo sestavljajo le še samice, so nekatere med njimi nesparjene (Derlink, osebna opažanja). V naravi se številčnost populacije zelo razlikuje tako med posameznimi lokacijami kakor tudi med leti (Derlink, osebna opažanja). Vrste, ki živijo na isti lokaciji, dosežejo spolno zrelost istočasno. Paritveni sistem škržatkov iz rodu *Aphrodes* lahko opišemo kot poliginijo s podaljšanim iskanjem (Wickman in Rutowski, 1999), pri kateri se samci naključno premikajo v okolju in iščejo razpršene samice. Medtem, ko se samci pariyo večkrat, za samice predvidevajo, da po vsej verjetnosti kopulirajo le enkrat v življenju, čeprav možnosti večkratnega parjenja ne izključujejo (Chiykowski, 1970).

### 1.2.3 Vibracijski signali škržatkov iz rodu *Aphrodes*

Kot pri vseh škržatkih imajo tudi v rodu *Aphrodes* vibracijski signali glavno vlogo pri prepoznavanju in lokalizaciji partnerja (Claridge, 1985; Virant-Doberlet in Čokl, 2004; de Groot in sod., 2011, 2012). Pri vseh vrstah se sporazumevanje med partnerjema prične z oddajanjem samčevega pozivnega napeva in samec in samica si nato izmenjujeta signale v duetu (Tishechkin, 1998, 2000; de Groot in sod., 2012). Načelno velja, da samcem odgovarjajo le spolno zrele deviške samice škržatkov (Heady, 1993; Wood in Guttman, 1983). Pri iskanju samic samci uporabljajo »let/skok-klic-hoja« strategijo (ang. fly/jump-call-walk strategy) (Hunt in Nault, 1991; de Luca in Cocroft, 2011). V odsotnosti odgovora samice samci z letom ali skokom na novo rastlino ali drug del rastline povečajo svoj komunikacijski prostor (ang. signalling space) in s tem tudi verjetnost odgovora samice. Odgovor samice sproži pri samcu iskanje samice na rastlini, ki se izrazi kot hoja med odzivom samice ali tik po njem (de Groot in sod. 2011, 2012).

Pri obeh spolih vibracijski signali nastanejo s pomočjo mehanizma, ki je morfološko podoben in mogoče celo homologen timbalnemu mehanizmu pri škržadih in se nahaja na prvem členu zadka (Claridge, 1985; Ossiannilsson, 1949; Pringle, 1957). Med pozivnimi napevi samcev vrst iz rodu *Aphrodes* najdemo le malo podobnosti (Tishechkin, 1998; Bluemel in sod., 2014) (slika 2). Pri vseh vrstah začetnemu dela napeva, ki je zelo variabilen in vrstno nespecifičen, sledi vrstno-specifičen del, ki je sestavljen iz značilnih vrstno-specifičnih elementov (Bluemel in sod. 2014; Derlink in sod. 2014).



Slika 2: Pozivni napevi samcev vrst *A. aestuarina*, *A. bicincta*, *A. diminuta* in *A. makarovi* (prirejeno po Bluemel in sod., 2014). Spodaj oscilogram, zgoraj spektrogram.

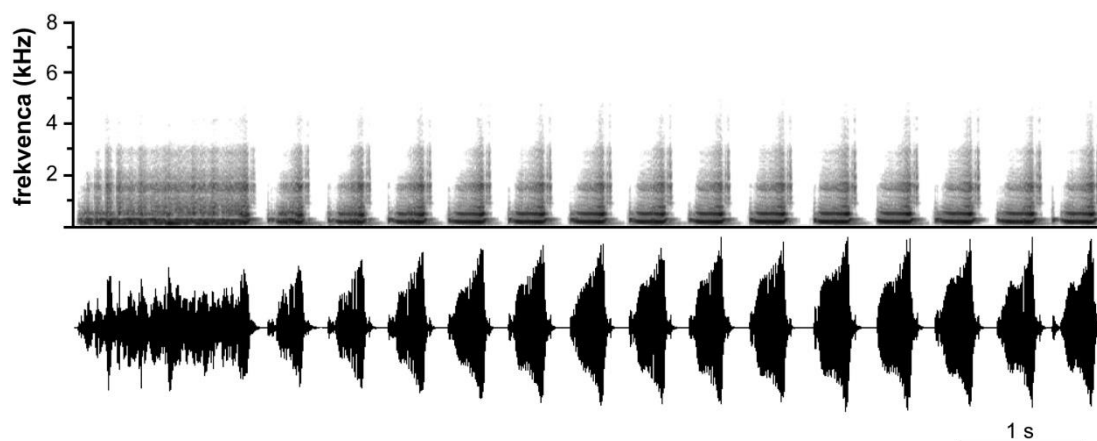
Figure 2: Advertisement calls of males of *A. aestuarina*, *A. bicincta*, *A. diminuta* in *A. makarovi* (modified by Bluemel et al., 2014). Below oscillogram, above spectrogram.

Vibracijski signali (odzivni napevi) samic iz rodu *Aphrodes* so sicer bili na kratko omenjeni (Tishechkin, 2000), vendar večinoma še niso bili natančno opisani.

Vibracijske signale obeh spolov in strukturo dueta so podrobno opisali le pri vrsti *A. makarovi* (de Groot in sod., 2012). Pri tej vrsti so raziskovali tudi vlogo samičinega odgovora pri prepoznavanju in lokalizaciji samice (de Groot in sod., 2011). Izmenjava samčevega pozivnega napeva in odzivnega napeva samice je kompleksna interakcija in oba partnerja sta prilagajala svoj napev napevu partnerja. Dolžina odzivnega napeva samice je bila odvisna od dolžine samčevega pozivnega na katerega je odgovarjala, medtem ko je bila dolžina pozivnega napeva povezana z dolžino odgovora samice na predhodni pozivni napev (de Groot in sod., 2012). Tak odnos nakazuje vlogo spolne selekcije v evoluciji pozivnega napeva. Spremembe v vrstno-specifičnih časovnih parametrih odzivnega napeva samice so imele negativen vpliv tako na prepoznavanje samice kot tudi na lokalizacijo vira (de Groot in sod., 2011). V tem kontekstu je pomembno, da samci niso prepoznali odzivnega napeva s krajšim ponavljalnim časom pulzov in ga, posledično tudi niso našli. Poleg tega so našli vir daljših odgovorov hitreje kot vir krajših.

### 1.3 TIP *APHRODES* 'DRAGONJA'

V dolini reke Dragonje v JZ Sloveniji so sodelavci Oddelka za entomologijo NIB v l. 2004 našli samce iz rodu *Aphrodes*, ki so oddajali pozivni napev, ki se razlikuje od vibracijskih signalov štirih omenjenih vrst (slika 3). Čeprav je osnovni vzorec napeva pri teh škržatkih podoben kot pri vrsti *A. bicincta*, ga sestavljajo drugačni zvočni elementi. Škržatke s tem tipom pozivnega napeva so po prvem nahajališču poimenovali tip *A. 'Dragonja'*. Preliminarna analiza zaporedij COI fragmenta mitohondrijske DNA je škržatke tega tipa uvrstila v vrsto *A. bicincta*.



Slika 3: Pozivni napev samca tipa *A. 'Dragonja'*. Spodaj oscilogram, zgoraj spektrogram.

Figure 3: Advertisement call of *A. 'Dragonja'* type male. Below oscillogram, above spektrogram.



#### 1.4 UPORABA MOLEKULSKIH MARKERJEV V GENETSKIH ANALIZAH

V DNA taksonomiji se za razlikovanje med vrstami uporabljajo alocimi, mitohondrijska DNA ali jedrna DNA, RFLP (polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov), RAPD (naključno namnožena DNA), AFLP (polimorfizem dolžin namnoženih fragmentov). Najbolj pogoste regije v sistematiki žuželk so mitohondrijska DNA in jedrna ribosomalna DNA (Hoy, 2003). Mitohondrijski gen podenote I citokrom c oksidaze (COI) je pogosto uporabljen v študijah evolucijskih odnosov med ozko sorodnimi taksoni žuželk (Caterino in sod., 2000). Za identifikacijo in odkrivanje novih živalskih vrst je bila v projektu Barcode Initiative predlagana 648 bp dolga regija COI (Hebert in sod., 2003).

Z genotipizacijo po drugi strani preučujemo genetsko strukturo populacij in odgovarjamo na različna vprašanja npr. o velikosti populacij, migracijskih tokovih, pojavih ozkega grla ali sorodstvenih odnosih (Selkoe in Toonen, 2006). Odvisno od vprašanja izberemo molekulske markerje z višjo ali nižjo stopnjo mutacij. Uporaba več lokusov ima zato višjo informativno vrednost, saj imajo zaradi rekombinacije, selekcije in genskega drsa različne regije genoma različne genealoške zgodovine (Selkoe in Toonen, 2006). Najbolj razširjeno vsestransko molekularno orodje v ta namen so mikrosateliti ali SSR –ji (ang. Short Sequence Repeats) (Selkoe in Toonen, 2006).

Mikrosateliti so kratke ponovitve nukleotidnih motivov dolžine 1 – 6 baznih parov (bp), ki se pojavljajo v genomih mnogih živali (Zane in sod., 2002). So kodominantni in predvidoma nevtralni molekularni markerji, ki sledijo Mendlovim zakonom dedovanja in so zaradi značilne visoke stopnje mutacij pogosto polimorfni (Selkoe in Toonen, 2006; Zane in sod., 2002). Povprečno število ponovitev mikrosatelitnega lokusa je med 5 in 40, najpogosteje uporabljeni motivi pa so dinukleotidi, trinukleotidi in tetranukleotidi (Selkoe in Toonen, 2006).

Še pred kratkim je veljalo, da je izolacija mikrosatelitov *de novo* zahteven in dolgotrajen postopek. Za izolacijo mikrosatelitov so večinoma uporabljali tradicionalne metode pregledovanja knjižnic ali obogatitvene metode (Zane in sod., 2002). Z razvojem nove generacije sekvenciranja, ki omogoča hitro in cenovno ugodno pridobivanje velikih količin podatkov pa so se odprle možnosti za iskanje mikrosatelitov z bioinformatičnimi metodami. Mikrosateliti so tako postali dostopni tudi za ne-modelne organizme, saj so se stroški in čas iskanja zmanjšali (Guichoux in sod., 2011; Schoebel in sod., 2013; Abdelkrim in sod., 2009; Meglecz in sod. 2010; Santana in sod., 2009). Pri tem je platforma 454 (Roche) zaradi optimalne dolžine sekvenc ostala do danes najbolj priljubljena in od prve publikacije v letu 2009 (Abdelkrim in sod., 2009) je bilo narejenih že mnogo študij na raznovrstnih organizmih.

## 1.5 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Namen doktorskega dela je raziskati procese, ki so osnova reproduktivne izolacije pri škrlatkih iz rodu *Aphrodes*. Glede na to, da zgoraj omenjene raziskave vloge vibracijskih signalov in strukture dueta kažejo, da se vloge posameznih partnerjev v sistemih, ki temeljijo na duetu, lahko bistveno razlikujejo, so detaljne študije komunikacijskih sistemov še drugih vrst nujno potrebne. Škrlatki iz rodu *Aphrodes* predstavljajo idealen sistem za raziskovanje razhajanja na osnovi vibracijskih signalov ter s tem nastanka vrst. V tem rodu se pozivni napevi samcev med vrstami bistveno razlikujejo ne-le na osnovi kvantitativnih razlik v določenih časovnih in frekvenčnih parametrih, temveč tudi v sami temeljni zgradbi (oz. kvalitativno), medtem ko so odzivni napevi samic variacije istega osnovnega vzorca in se med sabo ločijo le kvantitativno. Delo naj bi prispevalo nova spoznanja o mehanizmih divergence spolnih signalov, ki vodijo do nastanka predparitvene reproduktivne izolacije. Obsega vedenjski in molekularni sklop, ki se med seboj dopolnjujeta. Hkrati smo vanj vključili tudi morfološke podatke.

Najprej smo raziskovali pozivne napeve samcev in odzivne napeve samic vrst *A. aestuarina*, *A. bicincta*, *A. diminuta*, *A. makarovi* ter tipa *A. 'Dragonja'*. Del teh rezultatov je objavljen v članku Bluemel in sod. (2014), v katerem smo povezali raziskave vibracijskih signalov, COI fragmenta mitohondrijske DNA in morfoloških znakov za zanesljivo določanje prvih štirih že prepoznanih vrst. Tak integrativni pristop je nujen za reševanje tako taksonomskih problemov kot tudi za proučevanje evolucijskih procesov, kot je speciacija.

Zatem smo raziskovali pomen pozivnih napevov samcev v procesu prepoznavanja spolnih partnerjev. V raziskavah zvočne komunikacije so pogosto pokazali, da samice lahko razlikujejo tudi med signali, ki so si zelo podobni (npr. Grace in Shaw, 2012), vendar hkrati ni nujno, da samice zavračajo samce, katerih napevi se izrazito razlikujejo (Claridge in Morgan, 1993; Gee, 2005; Ryan in sod., 2003; Wyman in sod., 2011). V poskusih s predvajanjem posnetih signalov (ang. playback) smo določili preference samic za napeve iste in drugih vrst ter tudi odzivnost samic na vrstno-specifične elemente v teh napevih. Predpostavljali smo, da so ti elementi odločilni za prepoznavanje partnerja ter da jakost preference (oz. njena odsotnost) odraža nivo podobnosti teh elementov med vrstami oz. tipi. Del te raziskave je objavljen v članku Derlink s sod. (2014) v katerem smo se osredotočili le na vlogo pozivnih in odzivnih napevov ter dueta pri prepoznavanju med vrstama *A. aestuarina* in *A. bicincta*, katerih pozivna napeva sta sestavljena iz podobnih elementov.

Končno smo ugotavljali razširjenost tipa *A. 'Dragonja'* ter njegov izvor in vlogo dueta pri prepoznavanju z vrsto *A. bicincta* in za rod *Aphrodes* razvili mikrosatelitne

označevalce, s katerimi bo mogoče v prihodnje raziskovati genski pretok med populacijami.

V sklopu doktorskega dela smo raziskovali sledeče hipoteze:

1. Kljub temu, da so pri nastanku vrst v rodu *Aphrodes* udeleženi različni faktorji, imajo vibracijski signali pomembno vlogo pri nastanku in vzdrževanju reproduktivne izolacije med vrstami.
2. Vrstno-specifični zvočni elementi prisotni v pozivnih vibracijskih signalih samcev so najpomembnejši znak za prepoznavanje spolnih partnerjev.
3. Razlike v vibracijskih signalih med vrstama/populacijama v rodu *Aphrodes* (*A. bicincta* in *A. 'Dragonja'*) odražajo zgodovino teh dveh vrst/populacij oz. poselitev iz dveh različnih ledenodobnih zatočišč (refugijev).
4. Škržatki, ki oddajajo vibracijske signale tipa *A. 'Dragonja'* predstavljajo novo vrsto, ki se je razvila v balkanskem ledenodobnem refugiju.
5. Podobnosti in razlike med vibracijskimi signali ter vrstno-specifičnimi elementi ne odražajo hkrati tudi položaja, ki ga zavzemajo vrste v filogenetskem drevesu rodu *Aphrodes*.

## 2 MATERIALI IN METODE

### 2.1 VZORČENJE ŠKRŽATKOV IN VZDRŽEVANJE V LABORATORIJU

Odrasle živali in ličinke škržatkov smo s pomočjo kečerja nabirali od sredine maja do oktobra v letih 2009 do 2012 na 81 lokacijah v Sloveniji, dveh lokacijah v Italiji (preglednica 1) ter eni lokaciji v Bolgariji. Da bi ulovili deviške samice, smo lokacije obiskali v času, ko so se na njih pojavili prvi odrasli osebki. Zabeležili smo tudi nekatere ekološke značilnosti vzorčnih mest (nadmorska višina, rastlinska združba). Škržatke smo že na terenu ločili po spolu in jih nato do vedenjskih poskusov vzdrževali v laboratoriju kot je opisano spodaj.

Žive škržatke vrste *A. aestuarina* smo po pošti skupaj z gostiteljsko rastlino (*Atriplex portulacoides*) prejeli iz Velike Britanije. Osebki te vrste so izviral iz izliva reke Adur blizu mesta Shoreham (Sussex, Velika Britanija) in so bili nabrani s pomočjo sesalnika s cilindrom premera 11,5 cm na motorni pogon (McCulloch, BVM 250; Electrolux).

V primerjalno morfološko študijo in molekularne raziskave so bili vključeni tudi osebki nabrani v Sloveniji in Veliki Britaniji v letih 2006 – 2009 v sklopu Royal Society ESEP projekta sodelovanja med Veliko Britanijo in Slovenijo (priloga A).

Do uporabe v vedenjskih poskusih smo škržatke gojili v plastičnih škatlah (38 x 26 x 17 cm) s pokrovom, ki je omogočal prezračevanje, pri 23 – 28 °C in 50 – 70 % vlagi ter na 16/8 urnem ciklu svetlobe in teme. Škržatke smo hranili z lucerno (*Medicago sativa*), črno deteljo (*Trifolium pratense*), veliko koprivo (*Urtica dioica*) ali tolščakasto lobodo (*A. portulacoides* za vrsto *A. aestuarina*). Odrezane rastline smo postavili v čaše z vodo in smo jih po potrebi menjavali enkrat do dvakrat tedensko. Do poskusov smo živali hranili ločene po spolu in lokacijah. Po izvedenih testih določanja vrst z registracijo vibracijskih signalov (poglavje 2.2) smo škržatke dodatno ločili še glede na tip napeva (oz. glede na vrsto). Po potrebi smo osebke vzdrževali tudi posamično v plastičnih kozarcih (14 x 6 cm).

Preglednica 1: Vzorčna mesta v Sloveniji in Italiji z oznako vrst nabranih na teh lokacijah.

B – *A. bicincta*, D – *A. diminuta*, Dr – *A. 'Dragonja'*, M – *A. makarovi*

Table 1: Sampling sites in Slovenia and Italy with species found at these locations.

B – *A. bicincta*, D – *A. diminuta*, Dr – *A. 'Dragonja'*, M – *A. makarovi*

| Lokacija                         | Vrste |   |    |   | Koordinatni sistem D48/GK |            |
|----------------------------------|-------|---|----|---|---------------------------|------------|
|                                  | B     | D | Dr | M | x                         | y          |
| Adrijanci                        |       |   |    | x | 594.473,12                | 186.895,95 |
| Ankaran                          |       |   |    | x | 400.803,02                | 50.525,13  |
| Babno Polje                      |       |   | x  |   | 465192,98                 | 56364,02   |
| Belca                            |       | x | x  |   | 416245,83                 | 148292,19  |
| Beševce                          |       |   | x  | x | 429820,98                 | 67757,91   |
| Dolenje pri Jelšanah             |       |   | x  |   | 442778,85                 | 40617,83   |
| Dolga vas (Kočevje)              |       |   | x  |   | 490259,01                 | 53329,93   |
| Dolinka                          |       | x | x  |   | 420522,11                 | 146822,96  |
| Dolnje Ležeče                    | x     |   |    | x | 421628,03                 | 59913,05   |
| Dragonja 1                       |       |   | x  | x | 395999,83                 | 34983,17   |
| Dragonja 2                       |       |   | x  | x | 397.720,75                | 35.284,65  |
| Dragonja 4                       |       |   | x  | x | 398798,67                 | 35341,27   |
| Gabrje (Podgorje, pod Gorjanci)  | x     |   |    | x | 521926,04                 | 70720,11   |
| Goriče 1                         | x     |   |    | x | 423373,08                 | 59281,84   |
| Goriče 2                         | x     |   |    | x | 422965,01                 | 59625,88   |
| Goriče pri Famljah               | x     |   |    | x | 423607,93                 | 59165,94   |
| Gospodična                       |       | x |    | x | 523710,91                 | 69455,94   |
| grad Snežnik                     |       |   | x  |   | 459353,88                 | 59599,95   |
| Grobišče                         |       |   | x  |   | 437.347,88                | 68.254,02  |
| Hotična                          | x     |   |    |   | 423.815,05                | 47.743,90  |
| Hrastovlje                       |       |   | x  | x | 413483,42                 | 42833,45   |
| Hrušica pri Podgradu             | x     |   |    | x | 432120,01                 | 43092,12   |
| Knežak                           |       |   | x  |   | 442129,88                 | 53366      |
| Kočna                            |       | x |    | x | 429498,96                 | 141384,04  |
| Kortine                          |       |   | x  | x | 411253,01                 | 44837,33   |
| Krajna vas                       | x     |   |    | x | 407302,91                 | 69814,99   |
| Križ                             | x     |   |    |   | 412046,85                 | 67017,96   |
| Ledavsko jezero                  |       |   |    | x | 580500,08                 | 180215,15  |
| Ljubljana PST                    |       |   | x  | x | 458739,36                 | 101268,73  |
| Logarjeva lipa (Logarska dolina) |       |   |    | x | 472755,97                 | 141388,92  |
| Lohke (Banjšice)                 |       |   | x  |   | 398653,83                 | 102004,13  |
| Lokavec                          | x     |   | x  | x | 414037,52                 | 84136,26   |

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 1. Vzorčna mesta v Sloveniji in Italiji. Sampling sites in Slovenia and Italy.

| Lokacija                               | Vrste |   |    |   | Koordinatni sistem D48/GK |           |
|--|-------|---|----|---|---------------------------|-----------|
|  | B     | D | Dr | M | x                         | y         |
| Lokev                                  | x     |   | x  | x | 416426,01                 | 58023,86  |
| Lokve (Trnovski gozd)                  |       |   | x  | x | 406840,91                 | 97197,88  |
| Mačkovci                               |       |   |    | x | 589098,11                 | 183416,13 |
| Mala Bukovica                          |       |   | x  |   | 441187,92                 | 43129,84  |
| Male Vinice                            |       |   | x  |   | 475301,95                 | 67472,83  |
| Malovše                                | x     |   |    | x | 406441,89                 | 84846,93  |
| Mašun                                  |       |   |    | x | 450831,86                 | 54338,04  |
| Na Šiji (Banjšice)                     |       |   | x  |   | 400616,82                 | 102023,01 |
| Neblo                                  | x     |   |    |   | 384419,88                 | 96468,95  |
| Nova Sušica                            |       |   | x  | x | 434199,5                  | 57192,77  |
| Nova vas (Bloke)                       |       |   | x  | x | 461344,94                 | 69983,87  |
| Osp 1                                  |       |   | x  | x | 411161,99                 | 47834,8   |
| Osp 2                                  | x     |   | x  | x | 410414,13                 | 48279,6   |
| Ostrožno Brdo                          |       |   | x  |   | 432860,86                 | 53157,7   |
| Ozeljan                                | x     |   |    | x | 401533,52                 | 89336,5   |
| Petelinje                              |       |   | x  |   | 437774,83                 | 60954     |
| Planinsko polje                        |       |   | x  |   | 442805,97                 | 76419,14  |
| Plavški rovt (Mlačna)                  |       | x | x  | x | 426185,89                 | 145652,93 |
| Pod Poncami                            |       | x |    |   | 402604,99                 | 149885,1  |
| Podbela                                |       |   |    | x | 382246,05                 | 124546,31 |
| Podbreg (Podnanos)                     |       |   | x  | x | 420826,96                 | 72780,95  |
| Podkraj                                |       |   | x  |   | 426972,96                 | 80620,01  |
| Podnanos                               | x     |   | x  | x | 420158,7                  | 73416,62  |
| Podstene pri Kostelu                   |       |   |    | x | 491369,22                 | 42194,52  |
| Potoče                                 | x     |   | x  | x | 458846,06                 | 128539,85 |
| Poznanovci                             |       |   |    | x | 586019,98                 | 179755,96 |
| Predmeja (Gora, Trnovski gozd)         |       |   | x  |   | 414809,94                 | 89141,86  |
| Pregarje                               |       |   | x  |   | 432250,27                 | 48883,41  |
| Prelože pri Lokvi                      |       |   |    | x | 417422,93                 | 57644,99  |
| Prem                                   |       |   | x  | x | 436238,02                 | 50816,93  |
| Punggl (Cortina sulla strada del vino) |       |   |    | x | 208165,62                 | 131233,95 |
| Radenci pri Črnomlju                   |       |   |    | x | 507610,25                 | 37937,59  |
| Rakitnik                               |       |   | x  |   | 437794,93                 | 68352,02  |
| Ročinj                                 |       |   | x  | x | 397171,87                 | 107816,12 |
| Sabonje                                |       |   |    | x | 435522                    | 44202,09  |
| Selce                                  |       |   | x  | x | 437446,85                 | 62719,86  |
| Selo pri Štjaku                        | x     |   |    | x | 414744,84                 | 73126,89  |

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 1. Vzorčna mesta v Sloveniji in Italiji. Sampling sites in Slovenia and Italy.

| Lokacija                 | Vrste |   |    |   | Koordinatni sistem D48/GK |           |
|--------------------------|-------|---|----|---|---------------------------|-----------|
|                          | B     | D | Dr | M | x                         | y         |
| Srednja vas (Poljane)    |       |   |    | x | 435363,94                 | 107771,1  |
| Stara Gora - Nova Gorica |       |   |    | x | 397459,26                 | 88667,34  |
| Šempas                   | x     |   |    | x | 401181,93                 | 87884     |
| Šmihel v Košanski dolini |       |   | x  | x | 435962,53                 | 56839,09  |
| Tolmin                   |       |   | x  | x | 400820,91                 | 116304,99 |
| Tomaj                    |       |   |    | x | 410868,94                 | 68456,94  |
| Trnovo (Trnovski gozd)   |       |   | x  | x | 402697,89                 | 92934,9   |
| Villazzano (Trento)      |       |   |    | x | 202078,59                 | 108119,18 |
| Vreme                    |       |   | x  | x | 425417,01                 | 56998,83  |
| Vrepolje (Vremščica)     |       |   | x  | x | 430158,85                 | 59530,13  |
| Zemono                   | x     |   | x  | x | 418568,59                 | 79011,71  |
| Zgornje Jezersko         | x     |   |    | x | 462168,92                 | 139151,92 |
| Žaga pri Kolpi           |       |   |    | x | 493200,14                 | 41191,73  |
| Žirje                    | x     |   |    | x | 415950,82                 | 62862,93  |

## 2.2 VEDENJSKI POSKUSI

### 2.2.1 Določevanje vrst na osnovi registracije vibracijskih signalov

Zaradi morfološke podobnosti med vrstami je žive osebkne možno razlikovati le na osnovi njihovih vibracijskih signalov. Vibracijske signale smo registrirali z v ta namen prirejeno postavitvijo (de Groot in sod., 2012; Bluemel in sod., 2014) (slika 4). Škržatke smo prenesli na rastlino (črna detelja *T. pratense* ali navadni glavinec *Centaurea jacea*), ki je bila postavljena v fioli z vodo in stabilizirana v lončku napolnjenem z vermikulitom. Rastlina je bila pokrita s plastičnim lončkom, ki je preprečeval, da bi škržatek ušel. Laserski vibrometer (krmilnik OFV-2200 z OFV-353 senzorsko glavo; krmilnik OFV-5000 z OFV-505/503 senzorsko glavo; PDV 100, Polytec, Nemčija) je bil usmerjen v košček odbojne folije prilepljene na steblo rastline. Snemanje in shranjevanje je potekalo preko računalniške zvočne kartice Sound Blaster Audigy 2 ZS (Creative Labs, Milpitas, ZDA) s pomočjo računalniških programov Raven 1.4 (Cornell Laboratory of Ornithology, Ithaca, ZDA) in Cool Edit Pro 2.0 (Syntrillium Software, Phoenix, ZDA) in hitrostjo vzorčenja 48.000 vzorcev/s.



Slika 4: Eksperimentalna postavitve za registracijo vibracijskih signalov in predvajanje predhodno posnetih stimulacijskih signalov  
Figure 4: Experimental set-up for registration of vibrational signals and producing prerecorded stimulation signals

Samci so v skladu z »let/skok-klic-hoja« strategijo (Hunt in Nault, 1991; de Luca in Coccoft, 2011) ob prenosu na rastlino v nekaj minutah pričeli spontano oddajati pozivne napeve (de Groot in sod., 2012; Bluemel in sod., 2014). Če po 15 minutah niso zapeli, smo samca na rastlini zamenjali. Da bi skrajšali čas teh poskusov in hkrati povečali verjetnost oddajanja pozivnih vibracijskih napevov, smo vrstno pripadnost samcev določali tudi s predvajanjem predhodno posnetih duetov (*playback* poskusi) (glej spodaj). Vrstno pripadnost samcev na osnovi tipa vibracijskih signalov smo za vrste *A. bicincta*, *A. diminuta* in *A. makarovi* določili v skladu s Tishechkinom (1998, 2000). Pozivni napev vrste *A. aestuarina* predhodno še ni bil opisan in samce smo uvrstili v to vrsto na osnovi (a) originalnega opisa vrste (Edwards, 1908), (b) osebkov nabranih na lokacijah sintipskih primerkov (Wells, Norfolk, VB), (c) specifične ekološke niše (estuarij, ki ga dnevno poplavlja morska voda), (d) vibracijskih signalov, ki se ločijo od drugih vrst oz. tipov ter (e) jasno ločene mitohondrijske linije (poglavje 3.6.1). Pripadnost tipu *A. 'Dragonja'* smo določili na osnovi pozivnega napeva, ki se prav tako jasno razlikuje od drugih.

Ker se samice ne oglašajo spontano, smo pri njih oddajanje vibracijskih signalov vzbudili s predvajanjem posnetih pozivnih napevov samcev. Za stimulacijo samic smo naključno uporabili enega od programov za določanje preferenc samic (poglavje 2.2.3). Vrstno pripadnost samic smo določali tako na osnovi časovnih parametrov vibracijskih



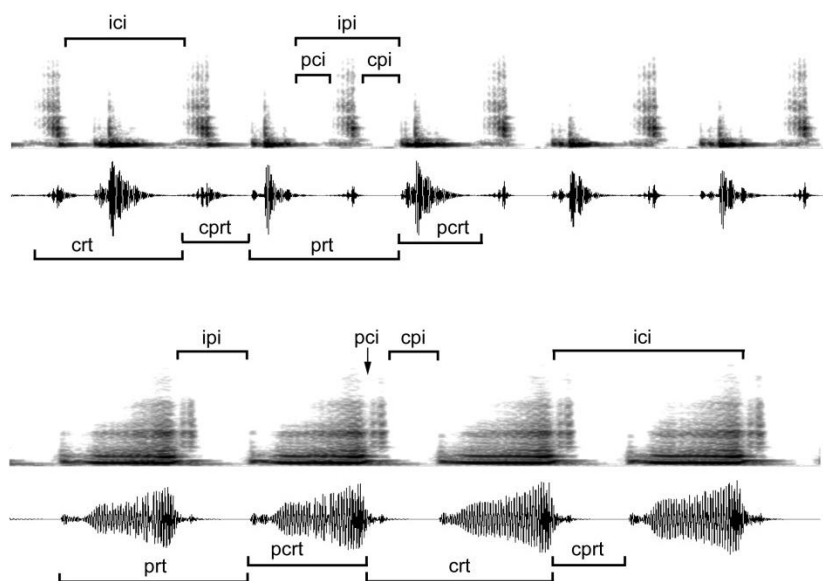
odgovorov kot tudi njihovih preferenc (poglavje 3.3.1). Pripadnost tipu *A. 'Dragonja'* smo določili na osnovi preferenc.

V poskusih s predvajanjem posnetih signalov smo vibracije v rastlinah zbužali s konico kovinske palčke (dolžina 5 cm, premer 4 mm), ki je bila zapičena v steblo (slika 4). Palčka je bila trdno privita v glavo miniaturnega vzbujevalnika (Minishaker Type 4810, Büel & Kjaer, Naerum, Danska). Vzbujevalnik smo upravljali z računalnikom preko zvočne kartice Sound Blaster Audigy 2 ZS s programom Cool Edit Pro 2.0 (Syntrillium Software, Phoenix, ZDA). Amplitudo dražljajev smo prilagodili amplitudi naravno oddanega pozivnega napeva samcev registrirani v točki snemanja. Vibracijske signale škržatkov smo skupaj s stimulacijskimi signali registrirali in shranili kot je opisano zgoraj.

## 2.2.2 Analiza vrstno-specifičnih vibracijskih signalov

Posnete in v računalniku shranjene vibracijske signale smo analizirali s programoma Raven 1.4 (Cornel Laboratory of Ornithology, Ithaca, ZDA) in Sound Forge (Sonic Foundry, Madison, ZDA). V detajlno analizo pozivnih napevov smo vključili 10 naključno izbranih samcev vsake vrste oz. tipa (po 5 osebkov iz UK in 5 iz Slovenije, razen za *A. aestuarina* in *A. 'Dragonja'*) in sicer po 5 napevov na samca. Pozivne napeve smo razdelili na posamezne odseke (slike 10 - 14) in za osnovni opis pozivnega napeva samcev smo merili sledeče parametre: celotno dolžino pozivnega napeva, dolžino in dominantno frekvenco posameznega dela napeva ter ponavljalni čas pulzov ali čirikov. Kot pulz smo definirali signal oz. element z enotno ovojnico, homogene sestave in omejene dolžine (Broughton, 1963). Kot čirik smo definirali element, ki ga sestavlja skupina (gruča) pulzov in ga človeško uho zazna kot enoten zvok (Hunt in sod., 1992). Pri vrsti *A. makarovi* smo ponavljalni čas merili za sosledje 10 pulzov v osrednjem delu zadnjega dela napeva. Pri vrsti *A. bicincta* in tipu *A. 'Dragonja'* smo ponavljalni čas merili za sosledje 10 čirikov na začetku vrstno-specifičnega dela. Ker so pozivni napevi samcev sestavljeni iz vrstno-specifičnih elementov (slike 10 - 14) smo, kjer je bilo to smiselno, merili tudi dolžino čirikov, 'sirene' in pulzov ter njihovo dominantno frekvenco. V primeru 'sirene' smo dominantno frekvenco merili v zadnjem delu, ki ima tudi najvišjo amplitudo.

Za natančno primerjavo časovnih parametrov pozivnih napevov vrste *A. bicincta* in tipa *A. 'Dragonja'* smo za prvih deset ponavljajočih se dvojic v pozivnem napevu merili tudi sledeče parametre (slika 5): ponavljalni čas čirik-pulz (cp<sub>rt</sub>), ponavljalni čas pulz-čirik (pc<sub>rt</sub>), ponavljalni čas čirikov (c<sub>rt</sub>), ponavljalni čas pulzov (p<sub>rt</sub>), interval med čirikom in pulzom (c<sub>pi</sub>), interval med pulzom in čirikom (p<sub>ci</sub>), interval med dvema čirikoma (i<sub>ci</sub>) ter interval med dvema pulzoma (i<sub>pi</sub>).



Slika 5: Primerjava časovnih parametrov ponavljajočih se dvojic v pozivnih napevih samcev *A. bicincta* (zgoraj) in *A. 'Dragonja'* (spodaj)

Figure 5: Comparison of different parameters of duration for the dyads in the advertisement call of *A. bicincta* (above) in *A. 'Dragonja'* (below)

Vibracijski signali samic vseh vrst so sestavljeni iz pulzov (slike 16 - 19). Merili smo dolžino odgovora samice, ponavljalni čas pulzov in dominantno frekvenco. Ker pričnejo samice vrst *A. diminuta* in *A. makarovi* odgovarjati med pozivnim napevom samca, smo pri teh vrstah ponavljalni čas pulzov merili za sosledje 10 pulzov takoj po koncu samčevega signala. Ker se pri vrsti *A. aestuarina* ponavljani čas pulzov tekom signala spreminja, smo ga merili samo za prvih 10 pulzov na začetku odgovora.

### 2.2.3 Določanje preference samic za pozivne napeve samcev lastne in drugih vrst

Testirali smo 15 samic vrst *A. aestuarina*, *A. bicincta*, *A. makarovi* in tipa *A. 'Dragonja'*, ter 7 samic vrste *A. diminuta*. Pred vedenjskimi poskusi testiranja preferenc nam vrstna pripadnost samic ni bila znana razen pri osebkih *A. aestuarina*, ki je izvirala iz lokacije, kjer se nahaja le ta vrsta (Bluemel in sod., 2014). Samice smo testirali na rastlinah navadnega glavinca v zgoraj opisani postavitvi.

Vsako samico smo testirali s petimi stimulacijskimi programi, ki so bili samicam predvajani v naključnem vrstnem redu z vmesnimi 3 minutnimi premori (tišina). Vsak program je bil sestavljen iz po enega samčevega pozivnega napeva vsake vrste (oz. tipa), ki so se v programu petkrat naključno ponovili (slike 10 - 14). Stimulacijsko sekvenco je tako sestavljajo 25 signalov med seboj ločenih s 30 sekundnimi premori za preprečitev morebitne habituacije (preglednica 2). V vsakem stimulacijskem programu smo uporabili naključno izbrane napeve različnih samcev iz zvočne knjižnice Oddelka

za entomologijo. Razen za vrsto *A. aestuarina* in tip *A. 'Dragonja'* so bili v programe vključeni samci iz Slovenije in Velike Britanije. V pozivnih napevih vrste *A. bicincta* in tipa *A. 'Dragonja'* smo obdržali le prvih 10 ponavljajočih se dvojic. Vsi pozivni napevi vključeni v stimulacijski programe so bili posneti z laserskim vibrometrom PDV 100 ne več kot 3 cm od pojočega samca.

Preglednica 2: Stimulacijski programi (s1-s5) za ugotavljanje preference samic za pozivne napeve samcev lastne in drugih vrst. A - *A. aestuarina*, B - *A. bicincta*, D - *A. diminuta*, Dr - *A. 'Dragonja'*, M - *A. makarovi*

Table 2: Stimulation programs (s1-s5) used for testing female preferences for conspecific and heterospecific male advertisement calls. A - *A. aestuarina*, B - *A. bicincta*, D - *A. diminuta*, Dr - *A. 'Dragonja'*, M - *A. makarovi*

|    | s1 | s2 | s3 | s4 | s5 |
|----|----|----|----|----|----|
| Dr | A  | B  | M  | D  |    |
| D  | B  | A  | Dr | M  |    |
| M  | D  | Dr | A  | B  |    |
| B  | Dr | M  | D  | A  |    |
| A  | M  | D  | B  | Dr |    |
| M  | Dr | A  | D  | B  |    |
| Dr | D  | B  | M  | A  |    |
| A  | M  | D  | B  | Dr |    |
| D  | A  | Dr | A  | M  |    |
| B  | B  | M  | Dr | D  |    |
| D  | M  | Dr | B  | A  |    |
| M  | Dr | D  | A  | B  |    |
| B  | B  | M  | Dr | D  |    |
| A  | D  | B  | M  | Dr |    |
| Dr | A  | A  | D  | M  |    |
| B  | D  | M  | A  | Dr |    |
| A  | M  | Dr | B  | D  |    |
| Dr | A  | A  | D  | B  |    |
| M  | B  | D  | Dr | M  |    |
| D  | Dr | B  | M  | A  |    |
| A  | B  | D  | Dr | M  |    |
| B  | A  | M  | D  | Dr |    |
| Dr | Dr | B  | M  | A  |    |
| D  | M  | A  | B  | D  |    |
| M  | D  | Dr | A  | B  |    |

Vsaki samici smo preferenco določili tako, da smo posnetke poslušali in v tabeli, ki je ponazarjala vse dele signalov samcev, označili vsak odgovor samice. Posamičnih pulzov samic nismo šteli za odgovor, saj so jih samice oddajale tudi med tišino oziroma neodvisno od signalov samcev. Kot odgovor na pozivni napev samca smo upoštevali le signale, ki sta jih sestavljala vsaj dva pulza in ki so se pojavili do 1 sekunde za signalom samca (de Groot in sod., 2012). Za vsak samčev poziv smo zabeležili

prisotnost/odsotnost odgovora. Za potrditev vrstne pripadnosti smo za vsako samico tudi izmerili dolžino enega naključnega odgovora za vsako stimulacijsko sekvenco (skupno 5 odgovorov). Pri samicah vrst *A. aestuarina* in *A. bicincta* smo zabeležili tudi odgovor na vsako posamezno od desetih dvojic čirik-pulz v pozivnem napevu vrste *A. bicincta*. Enako smo odgovor na vsako posamezno dvojico čirikov v napevu tipa '*A. Dragonja*' beležili tudi pri samicah tega tipa.

#### **2.2.4 Določanje odzivnosti samic na vrstno-specifične elemente v pozivnih napevih samcev**

Dan po določanju preferenc za pozivne napeve samcev lastne in drugih vrst smo opravili tudi teste odzivnosti samic na vrstno-specifične elemente v napevih. Testi so potekali na rastlinah navadnega glavinca v zgoraj opisani postavitvi.

Vsako samico smo testirali s petimi stimulacijskimi programi sestavljenimi le iz vrstno-specifičnih elementov pozivnih napevov samcev. Iz prej opisanih stimulacijskih programov smo naključno izbrali en pozivni napev vsake vrste in ga razstavili na elemente (slike 10 - 14). Pri vseh vrstah oz. tipu element  $e_0$  predstavlja začetni del pozivnega napeva, ki je znotraj vrste zelo variabilen, hkrati pa med vrstami izkazuje le malo razlik. Ostali izbrani elementi odražajo vrstno-specifične razlike v zgradbi in strukturi napeva med vrstami. Tako je npr. pri *A. aestuarina* element Ae1 predstavljal le en čirik, pri *A. bicincta* in tipu *A. 'Dragonja'* serija desetih dvojic čirik-pulz (Be1) oz. pulz-čirik (Dre1), pri *A. diminuta* 'sirena' (De1), pri *A. makarovi* pa skupina čirikov z visoko amplitudo (Me2). Elementa Be1 in Dre1 smo še dodatno razdelili na elemente, ki vsebujejo le eno dvojico (Be1cp oz. Dre1pc) ali vsak posamezen element dvojice (Be1c, Be1p; Dre1p, Dre1c).

V vseh petih programih smo uporabili elemente istih napevov. Vsako stimulacijsko zaporedje je vsebovalo en element ali kombinacijo elementov vsake vrste (preglednica 3). Ker pozivni napev vrste *A. aestuarina* vsebuje le dva elementa, smo isti element uporabili v več zaporedjih. V vsakem stimulacijskem programu so se elementi ponovili petkrat v naključnem vrstnem redu z 10-sekundnim intervalom, razen pri samicah *A. makarovi* pri katerih smo zaradi dolžine odgovorov predvajanje v času odgovora zaustavili. Stimulacijske programe smo vedno predvajali v vrstnem redu 1–5 z vmesnimi 3 minutnimi premori. Po končanih testih na elemente smo samicah predvajali še kontrolni program sestavljen iz pozivnih napevov, iz katerih smo pridobili vrstno-specifične elemente. V kontrolnem programu se je vsak napev ponovil petkrat v istem vrstnem redu kot pri elementih.

Tako kot v testih preferenc smo tudi v testih odzivnosti kot odgovor šteli le vibracijski signal samice, ki je bil sestavljen iz vsaj dveh pulzov ter oddan največ 1 sekundo za

elementom. Izjema so bili le odgovori *A. makarovi*, kjer smo upoštevali tudi signale z zamikom do 6 s, ker imajo samice te vrste daljšo latenco odgovora (de Groot in sod., 2012).

Preglednica 3: Stimulacijska zaporedja (e1-e5) za določanje odzivnosti samic na vrstno-specifične elemente pozivnih napevov samcev. A - *A. aestuarina*, B - *A. bicincta*, D - *A. diminuta*, Dr - *A. 'Dragonja'*, M - *A. makarovi*

Table 3: Stimulation sequences (e1-e5) used to test female responsiveness to species-specific elements of the male advertisement call. A - *A. aestuarina*, B - *A. bicincta*, D - *A. diminuta*, Dr - *A. 'Dragonja'*, M - *A. makarovi*

| e1   | e2    | e3       | e4     | e5     | kontrola |
|------|-------|----------|--------|--------|----------|
| De0  | De1e2 | De1      | De2    | De0e1  | D        |
| Be0  | Be1   | Be1cp    | Be1c   | Be1p   | B        |
| Me0  | Me2e3 | Me2      | Me3    | Me1    | M        |
| Dre0 | Dre1  | Dre1p1c2 | Dre1p1 | Dre1c2 | Dr       |
| Ae0  | Ae1   | Ae1      | Ae1    | Ae0    | A        |

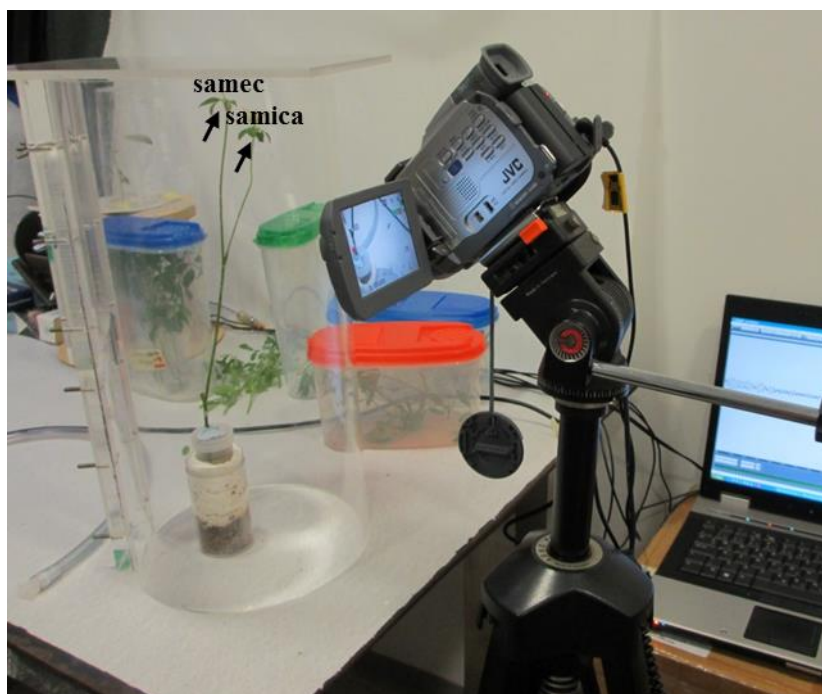
### 2.2.5 Znotrajvrstna in medvrstna parjenja

Prepoznavanje spolnih partnerjev smo pri vrstah *A. aestuarina*, *A. bicincta* in tipu *A. 'Dragonja'* raziskovali tudi s poskusi znotrajvrstnih in medvrstnih parjenj brez izbire (ang. no-choice experiments). Samice, ki smo jih uporabili v teh poskusih, niso bile uporabljene v testih preferenc in odzivnosti. Vrstno pripadnost samcev in samic smo najmanj en dan pred poskusi parjenja določili, kot je opisano v poglavju 2.2.1. Osebki so bili v poskusih parjenja uporabljeni le enkrat.

Vsi poskusi parjenja so potekali na črni detelji. Rastlina je bila visoka 30 cm. Na vrh smo postavili samca, na edino stransko vejo pa deviško samico (slika 6). Ob pričetku poskusa sta bila samec in samica med seboj oddaljena vsaj 20 cm. Potem, ko je samec oddal prvi pozivni napev, smo poskus nadaljevali 20 minut ali pa smo ga končali pred tem v primeru, da sta se samec in samica sparila ali pa je eden od partnerjev zapustil rastlino. Vibracijske signale smo registrirali in snemali kot je opisano zgoraj. Ko je samec zapel smo hkrati pričeli tudi snemanje z videokamero (Canon DM XM2 z dodatno zoom lečo 4,2-84 mm). Na video posnetku smo posneli tudi zvok (oz. vibracijske signale).

V znotrajvrstnih parjenjih smo uporabili 10 parov *A. aestuarina*, 9 parov *A. bicincta*, 6 parov *A. diminuta*, 11 parov *A. makarovi* in 12 parov tipa *A. 'Dragonja'*. Glede na podobnosti v zgradbi pozivnih napevov, rezultate preferenc samic za pozivne napeve samcev ter rezultate molekularnih analiz smo v medvrstna parjenja vključili recipročna parjenja med *A. aestuarina* in *A. bicincta* ter med *A. bicincta* in *A. 'Dragonja'*. Križali smo 15 samic *A. aestuarina* s samci *A. bicincta* (AB kombinacija), 12 samic *A. bicincta*

s samci *A. aestuarina* (BA kombinacija), 15 samic *A. 'Dragonja'* s samci *A. bicincta* (DrB kombinacija) ter 15 samic *A. bicincta* s samci *A. 'Dragonja'* (BDr kombinacija).



Slika 6: Eksperimentalna postavitve za poskuse s parjenjem  
Figure 6: Experimental set-up for mating trials

Beležili smo sledeče vedenjske parametre: število signalov samca oddanih pred prvim odgovorom samice (pri *A. bicincta* in *A. 'Dragonja'* smo upoštevali število čirikov oz. pulzov), čas od začetka petja samca do prvega odgovora samice (=latenca odgovora samice), število signalov samice potrebnih za sproženje iskanja samca, čas od prvega odgovora samice do začetka iskanja (=latenca iskanja), čas od začetka iskanja do lokalizacije samice (=čas iskanja), število čirikov oddanih med iskanjem, število odgovorov samice med iskanjem samca, čas med lokalizacijo in pričetkom parjenja (=dolžina dvorjenja), dolžino kopulacije ter celokupen čas parjenja (čas od začetka petja samca do konca kopulacije).

Medvrstna parjenja smo vključili v analize, če so samci pred prvim zabeleženim odgovorom samice oddali vsaj povprečno število signalov, kot jih je bilo oddanih v znotrajvrstnih parjenjih. Če samica samcu druge vrste ni odgovarjala, smo po končanem poskusu njeno odzivnost preverili s predvajanjem pozivnih napevov samca lastne vrste ali pa smo samico parili še z živim samcem njene lastne vrste. V analize smo vključili le teste, kjer je bila samica odzivna oz. je kopulirala s samcem svoje vrste.



## 2.2.6 Statistične analize

Rezultati testiranja preferenc samic, testiranje odzivnosti na zvočne elemente in rezultati parametrov parjenja večinoma niso bili normalni porazdeljeni (Shapiro-Wilkov test normalnosti,  $P < 0,05$ ), zato smo rezultate primerjali z neparametričnimi testi. V testih preferenc samic je bilo največje možno število odgovorov samice na napev ene vrste samca 25, zato smo odzivnost samic prikazali kot delež. Deleže smo primerjali z Wilcoxonovim testom rangov. Ta test smo uporabili tudi za primerjavo deležev odgovorov samic na prvih deset dvojic elementov pozivnega napeva samcev *A. bicincta* oziroma *A. 'Dragonja'*. V testih preferenc na zvočne elemente je bilo največ možnih odgovorov samice na en zvočni element 5, razen v primerih Ae0 in Ae1, kjer je bilo možnih 10 oziroma 15 odgovorov. Odzivnost smo prikazali kot deleže in jih s testom proporcij paroma primerjali. Različne faze v zaporedju medvrstnih parjenj smo paroma primerjali s testom proporcij. Enostrani Fisherjev test smo uporabili za primerjavo uspešnosti med dvema medvrstnima parjenjema. Vedenjske parametre pridobljene v znotrajvrstnih in medvrstnih parjenjih in primerjave časovnih in spektralnih lastnosti napevov oziroma zvočnih elementov smo primerjali z Wilcoxonovim testom. P-vrednosti smo zaradi večkratnih primerjav parov skupin vsakokrat popravili z Bonferronijevo korekcijo in za značilne označili razlike, kjer je bil  $P < 0,05$ . Vse statistične analize smo naredili s statističnim programskim paketom R (različica 2.10.1; R Development Core Team, 2010).

## 2.3 MOLEKULARNI MARKERJI

### 2.3.1 Izolacija DNA

Po končanih vedenjskih poskusih smo osebke posamično shranili v 96 % etanolu pri 4 - 7 °C. DNA smo izolirali iz nog, ki smo jih do ekstrakcije DNA hranili v ATL pufru (Qiagen). Telo smo ohranili za nadaljnje morfološke analize (poglavje 2.4). DNA smo izolirani s kompletom "DNeasy Blood and Tissue kit" po priporočilih proizvajalca (Qiagen) ter jo shranili v zmrzovalniku pri -20 °C. Koncentracijo DNA izbranih vzorcev smo izmerili s spektrofotometrom Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

### 2.3.2 Mitohondrijska DNA

Za primerjavo filogenetskih odnosov med tipom *A. 'Dragonja'* in ostalimi prepoznanimi vrstami smo uporabili fragmente gena za podenoto I citokrom c oksidaze (COI), ki je zapisan na mitohondrijski DNA. Za pomnoževanje z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) smo uporabili tri univerzalne oligonukleotide začetnike: za pomnoževanje 710 bp dolgega fragmenta začetnika LCO1490 in HCO2198 (Folmer, 1994) ter za pomnoževanje 1524 bp dolgega fragmenta začetnika LCO1490 in TL2-N-3014 (Simon

in sod., 2006). Krajše fragmente smo pomnoževali po naslednjem protokolu: 3 min na 94 °C, sledilo je 35 ciklov s 30 s na 94 °C, 90 s na 53 °C ter 90 s na 72 °C, ter zaključnim podaljševanjem 10 min na 72 °C. PCR reakcija za daljše fragmente je potekala po naslednjem protokolu: 3 min na 94 °C, sledilo je 5 ciklov s 30 s na 94 °C, 30 s na 45 °C ter 2 min na 72 °C, 30 dodatnih ciklov po enakem protokolu in temperaturo nateganja 48 °C, ter zaključno pomnoževanje 10 min na 72 °C. Reakcije so potekale v 50 µl reakcijah, ki so vsebovale 1,25 µl vsakega začetnega oligonukleotida (10 µM), 1 µl dNTP (10 mM), 1 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2 µl genomske DNA (1 – 10 ng/ µl), 5 µl PCR pufra Qiagen (10x) in 1,25 enote TopTaq DNA polimeraze (Qiagen). Reakcije so vključevale negativno kontrolo. Prisotnost pomnožka smo preverjali z gelsko elektroforezo (1,4 % agarozni gel).

Sekveniranje po Sangerjevi metodi so opravili v podjetju Macrogen z DNA sekvenatorjem 3730XL. Vsakemu fragmentu smo dvakrat določili sekvenco (uporabili smo oba začetna oligonukleotida) in sekvence nato ročno pregledali ter združili v programu MEGA 5 (Tamura in sod., 2011). Sekvence smo poravnali s programom CLUSTALW (Thompson in sod., 1997).

Za ugotavljanje filogenetskih odnosov smo pripravili poravnavo 600 bp dolgih fragmentov preučevanih genov. Analizirali smo jih s programom MEGA 5 z metodo združevanja sosedov (ang. neighbour-joining), uporabili smo dvoparametrični model zamenjav po Kimuri (Kimura, 1980) ter robustnost topologije filogenetskega drevesa preverjali z metodo *bootstrap* s 1000 ponovitvami. Ocene odstotkov razlik med vrstami in znotraj vrst smo izračunali z dvoparametričnim modelom zamenjav po Kimuri.

Poleg osebkov iz Slovenije in Italije (prilogi A in B) smo v analizo vključili tudi osebkove iz Velike Britanije, sekvence njihovih genov pa smo pridobili iz javne podatkovne baze GeneBank (številke dostopa: FR727167–FR727179, HE587025–HE587045). Ti osebki so že bili vključeni v filogenetsko analizo odnosov v rodu *Aphrodes* (Bluemel in sod., 2014). V analizo pa smo poleg štirih dobro opisanih vrst dodali še tip A. '*Dragonja*'. Za koreninjenje filogenetskega drevesa smo uporabili ozko sorodne vrste *Anoscopus limicola* (Edwards, 1908) (številke dostopa: FR729924 in HE587046) in *Planaphrodes trifasciata* (Geoffr., 1785) (številke dostopa: KF378763–KF378765) (*Hemiptera*, *Cicadellidae*, *Aphrodinae*).

### 2.3.3 Mikrosateliti

Iz dveh celih osebkov škržatkov rodu *Aphrodes* (samici RkF434 in LPF437) smo s kompletom "DNeasy Blood and Tissue kit" (Qiagen) po optimiziranem protokolu proizvajalca izolirali celokupno DNA (izolirana DNA je bila v koncentraciji 100 ng/µl). DNA so pirosekvencirali v podjetju Macrogen z aparatom 2100 BioAnalyzer po



platformi 454 GS-FLX Titanium (Roche). Za oba osebka smo porabili 1/8 reakcijske plošče. S pirosekvenciranjem smo pridobili 52224 in 59413 sekvenc s povprečno dolžino 322 in 313 bp.

Genomsko DNA smo nato preiskali s programom QDD (Meglécz in sod., 2010), ki je bil narejen za obdelavo surovih sekvenc in iskanje mikrosatelitov iz velikih baz podatkov. S pomočjo programa smo z izbranimi parametri v prvi stopnji odstranili prekratke sekvence (krajše od 80 bp) in izbrali tiste, ki so vsebovale di-, tri-, tetra-, penta- in hekso- nukleotidne motive z vsaj 4 ponovitvami (8376 in 7554 sekvenc). Na drugi stopnji smo odkrili podvojitve in ustvarili soseke ter izločili sekvence z minisateliti, ki bi lahko ovirali pomnoževanje (1147 in 1212 sekvenc). Na tretji stopnji smo izbirali mikrosatelite glede na minimalno število ponovitev motivov (4), maksimalno število ponovitev za nanosatelite v obrobni regiji, minimalno dolžino obrobni regij (18) in minimalno dolžino PCR produkta (90) (555 in 533 sekvenc). S pomočjo programa PRIMER 3 smo nato poiskali oligonukleotidne začetnike za potencialne mikrosatelitne regije. Nazadnje smo preko podatkovne baze GenBank poiskali (BLAST) podobne sekvence izbranim, da bi tako odkrili morebitne kontaminacije. Pri tem smo našli sekvenco fitoplazme tipa rumenice (ang. Aster yellows phytoplasma), katerega potencialni prenašalci naj bi bili tudi škržatki rodu *Aphrodes* (Lee in sod., 1998). Z dodatnimi parametri za izbor oligonukleotidnih začetnikov smo izbor zožali na 22 kandidatnih mikrosatelitov in njim odgovarjajočih parov začetnih oligonukleotidov. Pri tem smo si pomagali s programoma BatchPrimer3 (You in sod., 2008) in OligoCalc (Kibbe, 2007).

Za fluorescentno označevanje oligonukleotidnih začetnikov za nadaljnjo fragmentno analizo smo uporabili ekonomično metodo s "fluorescentnim repom" (Schuelke, 2000). Pri tej metodi poleg para za lokus specifičnih oligonukleotidnih začetnikov, od katerih ima en na 5' koncu pripeto še 18 bp dolgo univerzalno sekvenco M13(-21) (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') dodamo še fluorescentno označen M13(-21) na 5' koncu z barvili 6-FAM (modra), HEX (zelena) ali NED (rumena).

Za pomnoževanje smo priredili PCR protokol, ki so ga uporabili Pipan in sod. (2013). Pri tem smo optimizirali naslednje parametre: temperaturo naleganja, število ciklov in koncentracije soli. Standardnemu trostopenjskemu PCR smo dodali stopnjo za optimalno naleganje fluorescentnega repa. Po preskušanju različnih protokolov za PCR smo od 22 kandidatov uspešno pomnožili 12 mikrosatelitov (preglednica 4). Pogoji za PCR reakcije so v preglednici 5. Pogoji začetne denaturacije (4 min na 94 °C), denaturacije na drugi (30 s na 94 °C) in tretji stopnji (30 s na 94 °C) ter končne elongacije (4 min na 94 °C) se med lokusi niso spreminjali.

Za pomnoževanje izbranih mikrosatelitnih lokusov smo pripravili 12,5 µl PCR mešanice: 2,5 µl genomske DNA (1 - 10 ng/µl), 0,3125 enote TopTaq polimeraze (Qiagen), 1,25 µl pufra Qiagen (10x), 0,25 µl dNTP (0,2 mM), 0,125 µl začetnega oligonukleotida (0,1 µM), 0,3125 µl označenega začetnega oligonukleotida (0,25 µM), 0,2287 µl fluorescentnega označevalca (0,183 µM), 1,5 – 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>.

Uspešnost pomnoževanja smo pred fragmentno analizo preverili z 1,4 % agarozno gelsko elektroforezo (primer na sliki 7).

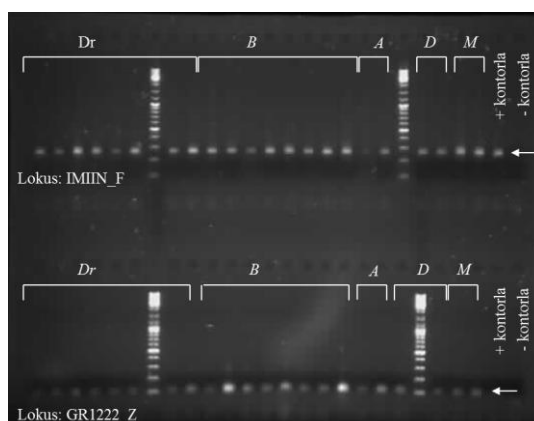
Preglednica 4: Uspešno pomnoženi mikrosatelitni lokusi, njihov pričakovani motiv glede na pirosekvenciranje (Roche 454 Titanium) in oligonukleotidni začetniki

Table 4: Selection of the successfully amplified microsatellite loci and their expected motif according to pyrosequencing (Roche 454 Titanium) and their primers

| Lokusa   | Pričakovan motiv   | Začetni oligonukleotidi   |
|----------|--------------------|---|
| IIME8_E  | AGTG <sub>5</sub>  | 5'- M13(-21) - GAACAATTTTGGCTGCCATT - 3'<br>5'- TCGAACGGATGACTGAATGA - 3'     |
| IMIIN_F  | TTCCG <sub>4</sub> | 5'- M13(-21) - TTACCGGAAAGAGCCGACTA - 3'<br>5'- CTTTAAGGTACGGCCACACG - 3'     |
| H4CVH_I  | AT <sub>10</sub>   | 5'- M13(-21) - CATTAGCAGACAGAGCGTTCC - 3'<br>5'- CCTACCTGCCTACCTAAACACA - 3'  |
| 2404A_K  | ACAG <sub>4</sub>  | 5'- M13(-21) - CGCGTATGACCGTAATTGTG - 3'<br>5'- TTCCCGAGAACCAATCAGAG - 3'     |
| H5SU6_L  | ACAA <sub>5</sub>  | 5'- M13(-21) - TTCAGCCGTTTAGGAGGAGA - 3'<br>5'- CAACCCGCATCTCTGTAAAA - 3'     |
| IDLNS_M  | AT <sub>12</sub>   | 5'- M13(-21) - CAGAAGGATATCGGTTTGTTC - 3'<br>5'- ACCCCGCCTTCAAAAAGTTAT - 3'   |
| INNBD_N  | TA <sub>10</sub>   | 5'- M13(-21) - TGCCAAGACAAATAACACCAA - 3'<br>5'- ATAGGGCAGGAATGACGAGA - 3'    |
| H4CII_R  | TA <sub>10</sub>   | 5'- M13(-21) - CCAACTGCACGGAAATTACA - 3'<br>5'- GCAAATACTTTAGTTTTCCACAGC - 3' |
| GR1222_Z | AC <sub>15</sub>   | 5'- M13(-21) - ATGTGCACAGACCTCCTGCTA - 3'<br>5'- AGAAGTGAAGGAGAGCAAGCG - 3'   |
| H0B37_B  | AATC <sub>4</sub>  | 5'- M13(-21) - ATAAAGTAGCGGCCCTTGGT - 3'<br>5'- TTCCTTGTGCCAAATGACAA - 3'     |
| 0763A_D  | TATT <sub>4</sub>  | 5'- M13(-21) - CAATTCCATCGCATTACAC - 3'<br>5'- TTGGAACGGATAGTACAGGAGT - 3'    |
| H948R_U  | CT <sub>9</sub>    | 5'- M13(-21) - GTATGCAAGGTCGGCCACTA - 3'<br>5'- CTTTGGTCTGGTTGTTCGGTC - 3     |

Preglednica 5: PCR protokoli za uspešno pomnožene mikrosatelitne lokuse  
 Table 5: PCR protocols for the successfully amplified microsatellite loci

| Lokus    | 2. stopnja |                   |     |            |     | 3. stopnja |                   |     |            |     |
|----------|------------|-------------------|-----|------------|-----|------------|-------------------|-----|------------|-----|
|          | Št. ciklov | Vezava začetnikov |     | Elongacija |     | Št. ciklov | Vezava začetnikov |     | Elongacija |     |
|          |            | [°C]              | [s] | [°C]       | [s] |            | [°C]              | [s] | [°C]       | [s] |
| IIME8_E  | 15         | 60 TD (-0,7/c)    | 30  | 72         | 30  | 15         | 53                | 30  | 72         | 30  |
| IMIIN_F  | 15         | 60 TD (-0,7/c)    | 30  | 72         | 30  | 15         | 53                | 30  | 72         | 30  |
| H4CVH_I  | 20         | 56                | 30  | 72         | 30  | 15         | 53                | 30  | 72         | 30  |
| 2404A_K  | 20         | 56                | 30  | 72         | 30  | 15         | 53                | 30  | 72         | 30  |
| H5SU6_L  | 20         | 60,5              | 30  | 72         | 60  | 15         | 53                | 30  | 72         | 30  |
| IDLNS_M  | 20         | 60,5              | 30  | 72         | 60  | 15         | 53                | 30  | 72         | 30  |
| INNBD_N  | 20         | 56                | 30  | 72         | 30  | 15         | 53                | 30  | 72         | 30  |
| H4CII_R  | 20         | 54                | 30  | 72         | 60  | 15         | 53                | 30  | 72         | 30  |
| GR1222_Z | 20         | 63 TD (-1/c)      | 30  | 72         | 30  | 15         | 53                | 30  | 72         | 30  |
| H0B37_B  | 15         | 60 TD (-0,35/c)   | 30  | 72         | 60  | 20         | 53                | 30  | 72         | 60  |
| 0763A_D  | 15         | 60 TD (-0,7/c)    | 30  | 72         | 30  | 15         | 53                | 30  | 72         | 30  |
| H948R_U  | 20         | 63                | 30  | 72         | 30  | 10         | 53                | 30  | 72         | 30  |



Slika 7: Slika gela iz elektroforeze s pomnožki dveh izbranih mikrosatelitnih lokusov. Puščici označujeta lise. A - *A. aestuarina*, B - *A. bicincta*, D - *A. diminuta*, Dr - *A. 'Dragonja'*, M - *A. makarovi*  
 Figure 7: Picture of electrophoresis gel with fragments of two selected microsatellite loci. Arrows indicate the bands. A - *A. aestuarina*, B - *A. bicincta*, D - *A. diminuta*, Dr - *A. 'Dragonja'*, M - *A. makarovi*

Uspešno namnožene PCR produkte so s kapilarno elektroforezo (ABI 3730 XL Applied Biosystems) analizirali v podjetju Macrogen. Vsakemu vzorcu je bil za fragmentno analizo dodan dolžinski standard 400HD (Applied Biosystems). V eno fragmentno analizo smo lahko uporabili tri lokuse s tremi različnimi fluorescentnimi značkami (ang. post-PCR multiplexing). Elektroferograme smo ročno pregledali s programoma GeneMapper ali Peak Scanner Software 2 (Applied Biosystems). Izbrani mikrosateliti so bili tokrat prvič okarakterizirani in profil oziroma dejanske alelna dolžine nam zato prej niso bile znane. Alele smo odčitavali na podlagi njihovih pričakovanih dolžin in predvidenega motiva. Da bi zmanjšali možnost napak, smo pri odčitavanju upoštevali

osnovna pravila ter alele odčitavali vedno na enak način (Selkoe in Toonen, 2006). Ob pojavu več vrhov smo vedno odčitali dva najvišja vrhova, ki sta morala biti v pričakovanem razmaku večkratnika dolžine pričakovanega motiva. Zaradi dodanega fluorescentnega repa so bili vsi pomnožki daljši od pričakovanih alelnih dolžin za 18 bp. Genetsko variabilnost smo vrednotili na osnovi različnih parametrov s pomočjo programa Identity 1.0 (Wagner in Sefc, 1999). Za vsak lokus smo izračunali število alelov (N), frekvenco ničtih alelov ( $N_0$ ), pričakovano in dejansko heterozigotnost ( $H_e$  in  $H_o$ ) ter verjetost enakosti genotipov (PI), ki je pomemben parameter za določitev minimalnega števila genetskih označevalcev za uspešno razločevanje čim večjega števila genotipov. Informacijsko vrednost polimorfizma (PIC), ki ovrednoti informativnost lokusa smo izračunali s pomočjo programa Microsatellite Toolkit (Park, 2001).

Oligonukleotidne začetnike za mikrosatelitne regije smo najprej testirali na manjšem vzorcu osebkov. Dvanajst mikrosatelitov smo preskusili na vzorcu 22 osebkov štirih slovenskih vrst oz. tipov ter ene angleške vrste (*A. 'Dragonja'*, *A. bicincta*, *A. aestuarina*, *A. diminuta* in *A. makarovi*, 2-8 osebkov na vrsto oz. tip).

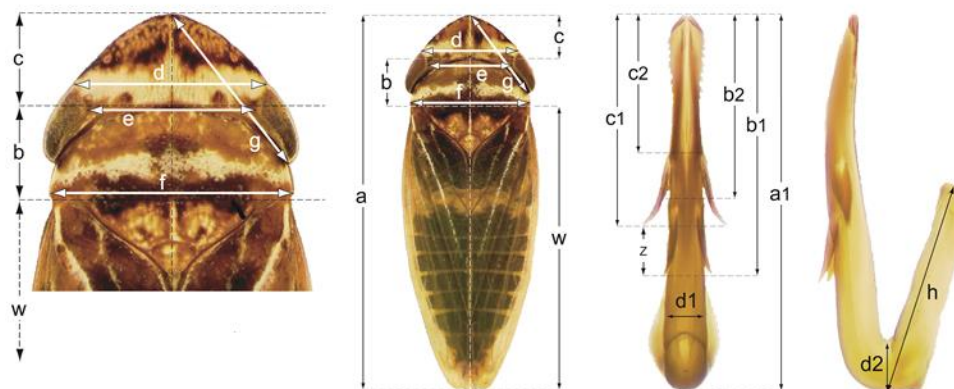
#### 2.4 MORFOMETRIČNE MERITVE IN ANALIZA

Morfološke analize smo opravili na osebkih, ki so že bili uporabljeni v vedenjskih poskusih ali/in v genetskih analizah (prilogi A in B). Na osnovi teh rezultatov smo tudi predhodno poznali vrstno pripadnost teh osebkov. Vključili smo osebkke vseh vrst obeh spolov iz Velike Britanije in Slovenije. Samice vrste *A. diminuta* so bile nabrane le v Sloveniji, osebki *A. aestuarina* le v Veliki Britaniji. Uporabili smo 21 samcev in 15 samic vrste *A. aestuarina*, 34 samcev in 27 samic *A. bicincta*, 15 samcev in 7 samic *A. diminuta*, 41 samcev in 44 samic *A. makarovi* ter 20 samcev in 18 samic *A. 'Dragonja'*.

Morfometrične meritve smo opravili na fotografijah, ki smo jih posneli v National Museum of Wales s pomočjo programa AUTOMONTAGE PRO v5.0 (Synoptics) z digitalno kamero JVC KY F70 3CCD pritrjeno na steromikroskop (Leica M28). Za osvetlitev smo uporabili hladno svetlobo (Schott KL 1500). Telo škržatkov brez nog smo fotografirali s hrbtne strani v 100 % etanolu. Pri samcih smo zatem odstranili zadnji abdominalni segment in izolirali aedeagus s kuhanjem v 10 % KOH. Aedeagus smo fotografirali s frontalne in lateralne strani. Meritve so bile nato opravljene s programom ImageJ v 1.40e (Rasband, 2006) na digitalnih fotografijah v jpg formatu shranjenih v računalniku. Vsaka fotografija je vsebovala lastno velikostno skalo. Postopek je detajlno opisan v Bluemel in sod. (2014).

Na telesu samcev in samic ter na aedeagusu samcev smo izmerili več parametrov (slika 8) in iz njih izračunali različna razmerja (preglednica 6). Morfološke podatke smo

analizirali z linearno diskriminantno analizo (LDA). Po preliminarnem pregledu smo v analize vključili le tiste znake, kjer je bilo prekrivanje med vrstami najmanjše (priloge B-J). V naslednjem koraku smo iz analize izločili še spremenljivke z visokim korelacijskih koeficienom ( $r \geq 0.80$ ). Za analizo morfoloških podatkov smo uporabili programe MINITAB v 15 (Minitab Inc, USA), Kyplot v5.0 (KyensLab Inc, Tokyo) ter R (R Development Core Team, 2010).



Slika 8: Morfometrični parametri izmerjeni na telesu in aedeagusu (po Bluemel in sod., 2014)  
Figure 8: Morphometric characters measured on the body and aedeagus (from Bluemel et al., 2014)

Preglednica 6: Opis morfometričnih znakov izmerjenih na telesu in aedeagusu (slika 8) ter razmerij, ki smo jih vključili v linearno diskriminantno analizo za razlikovanje med vrstami rodu *Aphrodes*. Poševni tisk označuje izmerjene parametre, z zvezdico so označeni uporabljeni znaki, v oklepajih pa je navedeno, če je bil posamezni znak na telesu uporabljen za samice (F), samce (M) ali za oba spola (prirejeno po Bluemel in sod., 2014).

Table 6: Description of morphometric characters measured on the body and aedeagus of *Aphrodes* leafhoppers (Figure 8) and calculated ratios included in the final linear discriminant analyses to distinguish species of the genus *Aphrodes*. Italics indicate measured variables and asterisks indicate parameters included in the final analyses. M, F indicate whether the body parameter was used for males and/or females (modified from Bluemel et al., 2014)

| <b>Spremenljivka</b> | <b>Opis / interpretacija morfološkega znaka</b>                      |
|----------------------|--|
| <b>Telo</b>          |  |
| <i>a</i>             | dolžina telesa (od vrha glave to konice kril)                        |
| <i>b</i>             | dolžina pronotuma  |
| <i>c</i>             | dolžina glave  |
| <i>d</i>             | širina glave   |
| <i>e</i>             | širina glave med očmi  |
| <i>g</i> *           | diagonala glave - dolžina med vrhom glave in distalnim robom oči (M) |
| <i>f</i>             | širina pronotuma   |
| <i>w</i> *           | dolžina kril (M)   |
| <i>axf</i> *         | površina telesa (M, F)   |
| <i>a/f</i> *         | razmerje med dolžino in širino telesa (M, F)                         |
| <i>f/b</i> *         | razmerje med širino in dolžino pronotuma (F)                         |
| <i>f/c</i> *         | razmerje med širino pronotuma in dolžino glave (F)                   |
| <i>f/d</i> *         | razmerje med širinama pronotuma in glave (M, F)                      |
| <i>a/c</i> *         | razmerje dolžinama telesa in glave (M)                               |
| <i>g/c</i> *         | razmerje med diagonalo in dolžino glave (F)                          |
| <i>a/(c+b)</i> *     | delež telesa, ki ga predstavljata glava in pronotum (M)              |
| <i>a/w</i> *         | razmerje med dolžinama telesa in kril (F)                            |

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 6. Opis morfometričnih znakov izmerjenih na telesu in aedeagusu (slika 8) ter razmerij, ki smo jih vključili v linearno diskriminantno analizo za razlikovanje med vrstami rodu *Aphrodes*. Description of morphometric characters measured on the body and aedeagus of *Aphrodes* leafhoppers (Figure 8) and calculated ratios included in the final linear discriminant analyses to distinguish species of the genus *Aphrodes*.

| <b>Spremenljivka</b>        | <b>Opis / interpretacija morfološkega znaka</b>   |
|-----------------------------|---|
| <b>Aedeagus</b>             |   |
| <i>a1</i>                   | dolžina debla   |
| <i>b1</i>                   | dolžina med vrhom debla do konice spodnjega para trnov  |
| <i>b2</i>                   | dolžina med vrhom debla do začetka spodnjega para trnov   |
| <i>c1</i>                   | dolžina med vrhom debla do konice zgornjega para trnov  |
| <i>c2</i>                   | dolžina med vrhom debla do začetka zgornjega para trnov   |
| <i>z</i> *                  | razdalja med vrhoma zgornjega in spodnjega para trnov   |
| <i>d1</i>                   | širina baze debla   |
| <i>d2</i>                   | višina baze debla   |
| <i>h</i>                    | dolžina kavlja  |
| $a1 \times d1$ *            | površina debla  |
| $a1/c2$ *                   | relativna lega zgornjega para trnov na deblu  |
| $c2/z$ *                    | razmerje med pozicijo zgornjega para trnov in razdaljo med konicami zgornjega in spodnjega para trnov |
| $c1/b2$ *                   | relativna pozicija zgornjega in spodnjega para trnov  |
| $a/a1$ *                    | razmerje med dolžino telesa in dolžino aedeagusa  |
| $a \times f/a1 \times d1$ * | razmerje površin telesa in debla aedeagusa  |

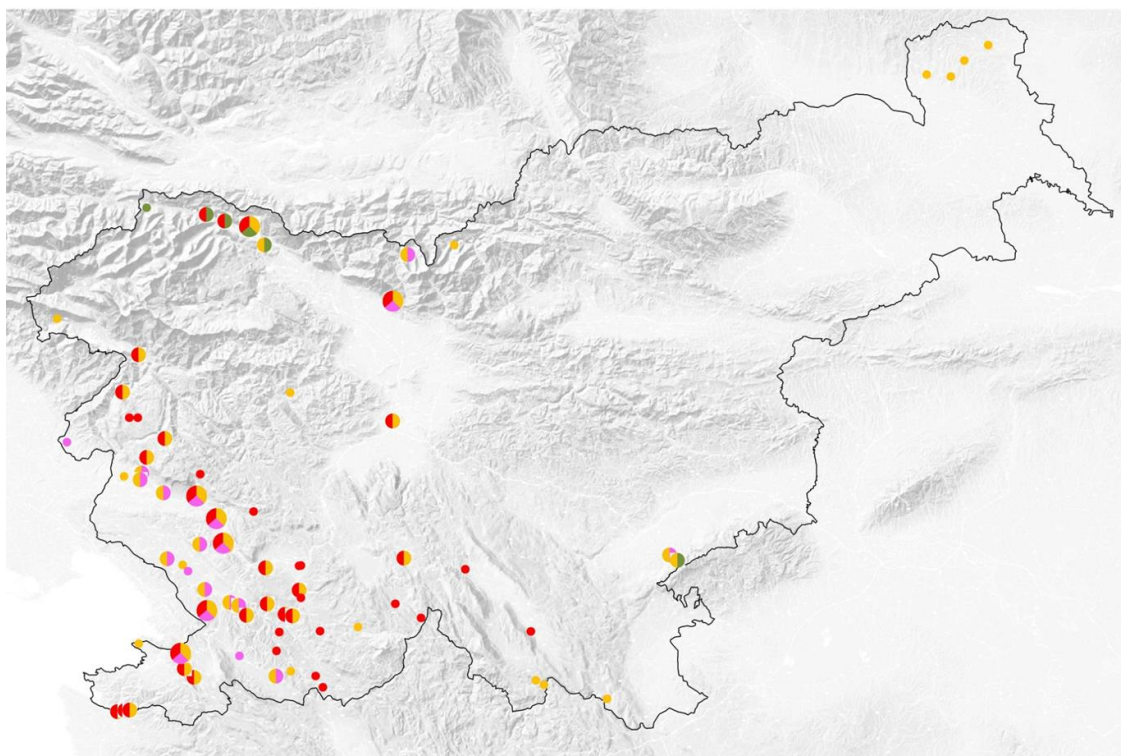
### 3 REZULTATI

#### 3.1 VZORČENJE ŠKRŽATKOV IZ RODU *APHRODES*

V štirih terenskih sezonah smo registrirali vibracijske signale 1843 osebkov z 81 lokacij po Sloveniji (preglednica 1), 63 osebkov vrste *A. aestuarina* iz Velike Britanije ter 20 osebkov iz Italije ter 1 osebkova iz Bolgarije. Glede na tip pozivnega napeva samca oz. preferenco in tip odzivnega napeva samice smo osebkove uvrstili v sledeče tipe oz. vrste: 793 primerkov tipa *A. 'Dragonja'* (550 samcev in 243 samic), 224 tipa *A. bicincta* (157 samcev in 67 samic), 691 tipa *A. makarovi* (483 samcev in 208 samic), 72 tipa *A. diminuta* (62 samcev in 10 samic), 63 tipa *A. aestuarina* (39 samcev in 24 samic). Vsi osebki iz Italije in Bolgarije so pripadali vrsti *A. makarovi*. Pozivni napevi samcev razen v redkih izjemah (poglavje 3.2.3) niso odstopali od tipičnega vzorca.

Škržatki iz rodu *Aphrodes* so se pojavljali na mešanih travnikih, ob obronkih gozdov in na robovih polj lucerne (*M. sativa*). Škržatke smo najpogosteje našli med deteljo (*Trifolium sp.*) in veliko koprivo (*U. dioica*). Odrasli osebki so se najprej pojavili v sredini maja na Primorskem, najkasneje smo našli samice ob začetku oktobra na Gorenjskem. Na polovici vzorčnih mest smo registrirali več kot en tip napeva, od tega smo na 7 lokacijah našli tri tipe napevov (slika 9, preglednica 1). Vrsta *A. bicincta* in tip *A. 'Dragonja'* sta se skupaj pojavljali na šestih lokacijah. Edini vrsti, ki jih nismo našli skupaj na isti lokaciji sta bili *A. bicincta* in *A. diminuta*.





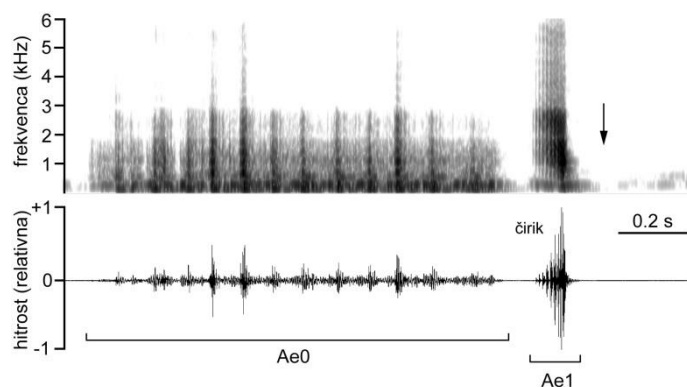
Slika 9: Prisotnost različnih tipov napevov rodu *Aphrodes* v Sloveniji. Škržatkov na Šatjerskem nismo vzorčili, vendar to ne pomeni, da tu niso prisotni. ○ 1 tip signala na lokaciji, ⊕ 2 tipa signala na lokaciji, ⊗ 3 tipi signalov na lokaciji, ● *A. 'Dragonja'* ● *A. bicincta* ● *A. makarovi* ● *A. diminuta*.  
Figure 9: The presence of different types of advertisement songs of the genus *Aphrodes* in Slovenia. ○ 1 type of signal per location, ⊕ 2 types of signal per location, ⊗ 3 types of signal per location, ● *A. 'Dragonja'* ● *A. bicincta* ● *A. makarovi* ● *A. diminuta*.

## 3.2 VIBRACIJSKI SIGNALI ŠKRŽATKOV IZ RODU *APHRODES*

### 3.2.1 Pozivni napevi samcev

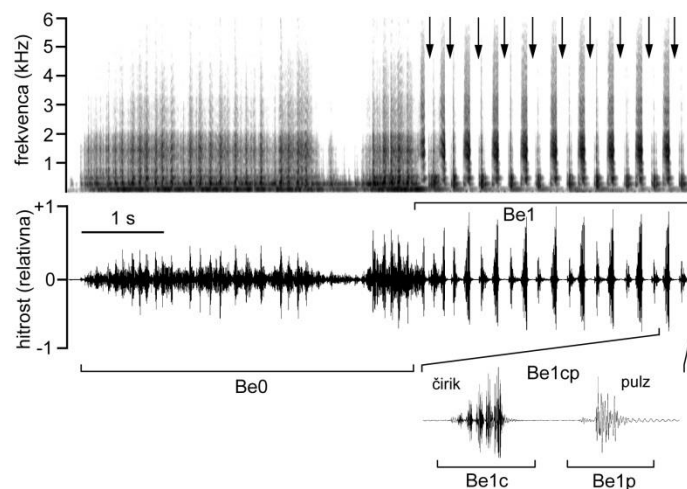
Pozivni napevi samcev škržatkov iz rodu *Aphrodes* imajo tipično, vrstno-specifično strukturo in se med vrstami močno razlikujejo. Pri vseh vrstah nespecifičnemu začetnemu delu napeva sledi vrstno-specifičen del, ki je sestavljen iz značilnih elementov.

Samci *A. aestuarina* oddajajo zelo kratek pozivni napev (slika 10, preglednica 7). Vrstno-specifičen del napeva tvori zgolj en čirik.



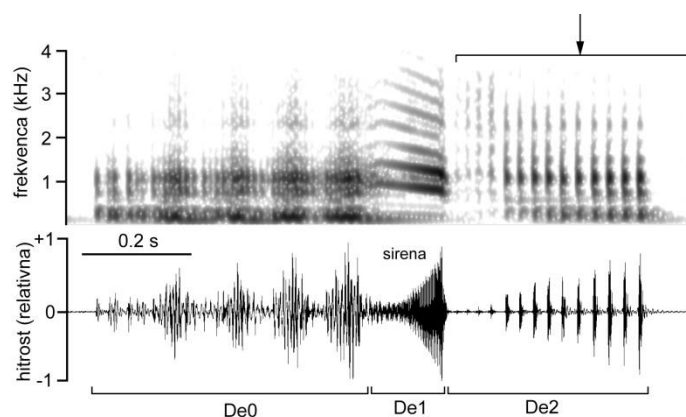
Slika 10: Celotni pozivni napev samca vrste *A. aestuarina* in posamezna zvočna elementa (prirejeno po Derlink in sod., 2014). Puščica nakazuje mesto odgovora samice. Spodaj oscilogram, zgoraj spektrogram  
Figure 10: Complete advertisement call of a male *A. aestuarina* and individual sound elements (modified by Derlink et al., 2014). Arrow indicates the position of the female reply. Below oscilogram, above spectrogram

Pri *A. bicincta* je vrstno-specifičen del napeva sestavljen iz ponavljajočih se dvojic v katerih pulz sledi čiriku (slika 11). Dolžina vrstno-specifičnega dela je zelo variabilna in najkrajši oz. najdaljši izmerjeni dolžini sta bili 5 s oz. 4 min (preglednica 7). V nekaterih primerih pozivni napev ni vključeval začetnega dela.



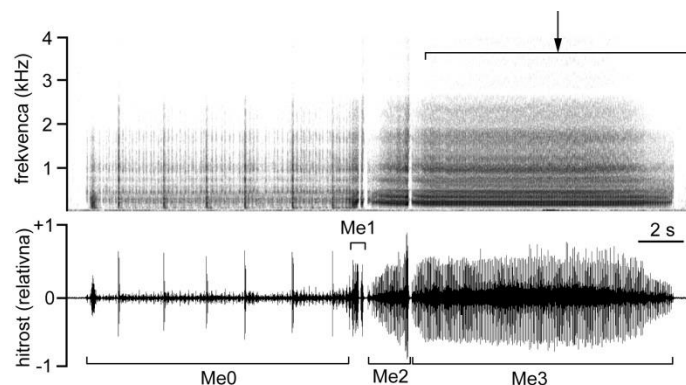
Slika 11: Pozivni napev samca vrste *A. bicincta* in posamezni zvočni elementi (prirejeno po Derlink in sod., 2014). Prikazani je samo prvih deset ponavljajočih se dvojic. Puščice nakazujejo mesto odgovora samice. Spodaj oscilogram, zgoraj spektrogram  
Figure 11: Advertisement call of a male *A. bicincta* and individual sound elements (modified by Derlink et al., 2014). Only the first ten repetitive dyads are shown. Arrows indicate the position of the female reply. Below oscilogram, above spectrogram

Pri *A. diminuta* je pozivni napev relativno kratek (slika 12, preglednica 7) in vsebuje 2 vrstno-specifična elementa, frekvenčno modulirano 'sireno', ki ji sledijo pulzi z naraščajočo amplitudo.



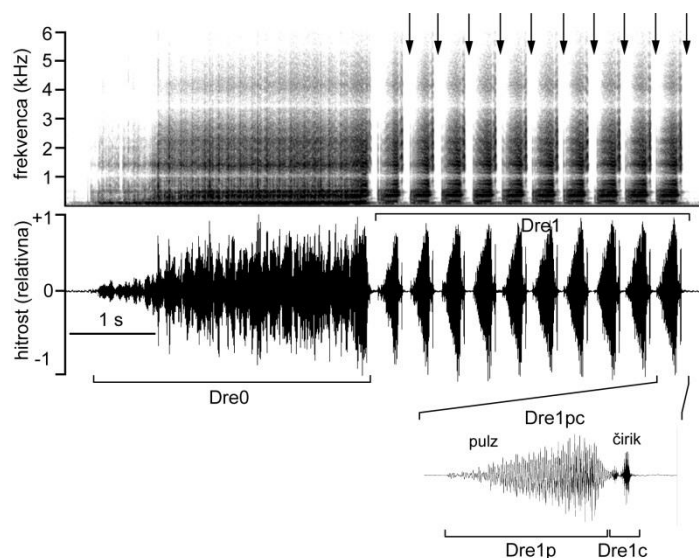
Slika 12: Celotni pozivni napev samca vrste *A. diminuta* in posamezni zvočni elementi (prirejeno po Derlink in sod., 2014). Puščica nakazuje mesto odgovora samice. Spodaj oscilogram, zgoraj spektrogram  
Figure 12: Complete advertisement call of a male *A. diminuta* and individual sound elements (modified by Derlink et al., 2014). Arrow indicates the position of the female reply. Below oscilogram, above spectrogram

Samci vrste *A. makarovi* oddajajo kompleksen pozivni napev s stereotipično zgradbo (slika 13, preglednica 7). Sestavljajo ga ponavljajoči se pulzi in čiriki (de Groot in sod., 2012). Pozivni napev je dolg, vendar je njegova variabilnost relativno majhna in najkrajši in najdaljši izmerjeni dolžini sta bili 11 oz. 24 s (preglednica 7). Del napeva »Me2« vsebuje do 5 ločenih enot, čeprav je v nekaterih pozivih ta del napeva manjkal.



Slika 13: Celotni pozivni napev samca vrste *A. makarovi* in posamezni zvočni elementi (prirejeno po Derlink in sod., 2014). Puščica nakazuje mesto odgovora samice. Spodaj oscilogram, zgoraj spektrogram  
Figure 13: Complete advertisement call of a male *A. makarovi* and individual sound elements (modified by Derlink et al., 2014). Arrow indicates the position of the female reply. Below oscilogram, above spectrogram

Pri tipu *A. 'Dragonja'* je vrstno-specifičen del napeva najbolj podoben vrsti *A. bicincta*, saj je ravno tako sestavljen iz ponavljajočih se dvojic, vendar tokrat čirik sledi pulzu (slika 14). Tako kot pri *A. bicincta* pozivni napev v nekaterih primerih ni vključeval začetnega dela.



Slika 14: Pozivni napev samca tipa *A. 'Dragonja'* in posamezni zvočni elementi. Prikazanih je samo prvih deset ponavljajočih se dvojic. Puščice nakazujejo mesto odgovora samice. Spodaj oscilogram, zgoraj spektrogram

Figure 14: Advertisement call of a male *A. 'Dragonja'* and individual sound elements. Only the first ten repetitive dyads are shown. Arrows indicate the position of the female reply. Below oscillogram, above spectrogram

Čeprav v pozivnih napevih samcev vseh vrst najdemo elemente, ki jih lahko označimo kot pulze in čirike, se ti elementi med vrstami značilno razlikujejo.

Čiriki, ki so sestavni deli elementov Ae1, Be1c in Dre1c imajo pri vseh teh vrstah široko-pasovne frekvenčne karakteristike z dominantnimi frekvencami med 1300 in 1400 Hz (preglednica 7), vendar se dolžine teh elementov med vsemi tremi vrstami statistično značilno razlikujejo (slika 15). Čiriki vrste *A. aestuarina* so najdaljši, tipa *A. 'Dragonja'* najkrajši.

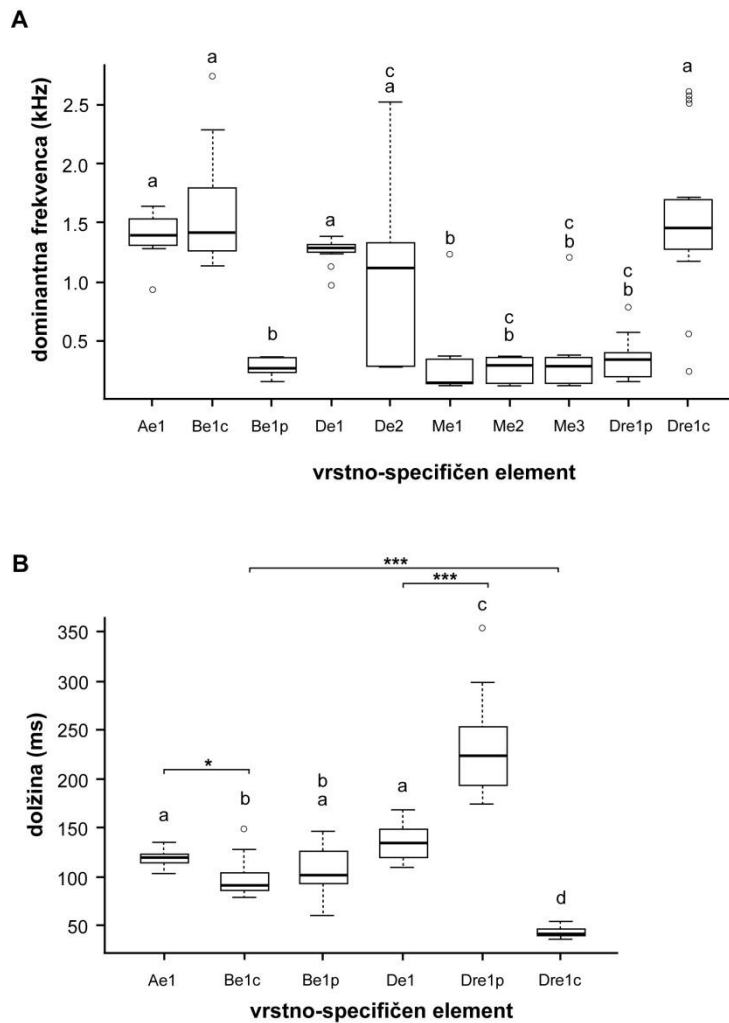
Pulzi, ki so sestavni deli elementov Be1p, De2, Me1, Me2, Me3 in Dre1p imajo vsi široko-pasovne frekvenčne karakteristike, vendar se frekvenčna struktura in dominantne frekvence elementov med vrstami razlikujejo (preglednica 7, slika 15). Medtem ko so pulzi pri *A. bicincta* in *A. 'Dragonja'* samostojni deli (elementi) napeva, se pri *A. diminuta* in *A. makarovi* več pulzov združujejo v en element. Dolžina pulza, ki sestavlja Dre1 je statistično značilno daljša od pulza, ki je sestavni del Be1p (slika 15). Dolžine elementov, ki so sestavljeni iz zaporedja pulzov, so neprimerno daljše (preglednica 7). Dominantne frekvence elementov, ki vsebujejo pulze, se razen pri vrsti *A. diminuta* praviloma nahajajo pod 500 Hz. Pri slednji je dominantna frekvenca pulzov višja kot pri drugih vrstah, vendar je hkrati tudi zelo variabilna in se statistično ne razlikuje tako od dominantnih frekvenc čirikov, kot tudi ne od dominantnih frekvenc elementov Me2, Me3 in Dre1p (slika 15). Pulz, ki je sestavni del elementa Dre1 je rahlo frekvenčno moduliran in z vsaj dvema jasnima harmoničnima komponentama.

'Sirena', ki je sestavni del elementa De1, se razlikuje od pulzov in čirikov. Je frekvenčno moduliran element, ki ima jasno harmonično strukturo z osnovno frekvenco med 700 in 900 Hz ter dominantno frekvenco nad 1300 Hz (sliki 12 in 15).

Preglednica 7: Časovni parametri in dominantna frekvenca vrstno-specifičnih zvočnih elementov samcev (prirejeno po Bluemel in sod., 2014). Za drugi del napeva *A. bicincta* in *A. 'Dragonja'* so prikazani tudi časovni parametri in dominantna frekvenca za čirik in pulz ter ponavljalni čas čirikov. Podrobnosti posameznih delov napevov so na slikah 10 – 14.

Table 7: Temporal parameters and dominant frequency of species-specific male sound elements (modified from Bluemel et al., 2014). For *A. bicincta* and *A. 'Dragonja'* temporal and spectral parameters of a chirp and a pulse within the second section are also shown and repetition time of chirps in this section is given. For details about call sections see Figures 10 – 14.

| Vrsta/Tip            | Del pozivnega napeva | Dolžina (s)     | Dominanta frekvenca (Hz) | Ponavljalni čas pulzov/čirikov (ms) |
|----------------------|----------------------|-----------------|--------------------------|-------------------------------------|
|                      |                      | povprečje ± SD  | mediana (min - max)      | povprečje ± SD                      |
| <i>A. aestuarina</i> | Celoten poziv        | 1.35 ± 0.33     |                          |                                     |
|                      | Ae0                  | 1.16 ± 0.33     | 176 (100 - 1061)         |                                     |
|                      | Ae1                  | 0.095 ± 0.022   | 1260 (608 - 1965)        |                                     |
| <i>A. bicincta</i>   | Celoten poziv        | 33.79 ± 28.41   |                          |                                     |
|                      | Be0                  | 3.199 ± 0.619   | 231 (111 - 458)          |                                     |
|                      | Be1                  | 30.586 ± 28.31  |                          |                                     |
|                      | Be1-čirik            | 0.085 ± 0.027   | 1328 (1037 - 2149)       | 312 ± 34                            |
|                      | Be1-pulz             | 0.105 ± 0.036   | 273 (194 - 351)          |                                     |
| <i>A. diminuta</i>   | Celoten poziv        | 1.66 ± 0.53     |                          |                                     |
|                      | De0                  | 1.17 ± 0.49     | 266 (75 - 1541)          |                                     |
|                      | De1                  | 0.148 ± 0.10    | 1350 (208 - 2819)        |                                     |
|                      | De2                  | 0.339 ± 0.81    | 1331 (264 - 2819)        | 22 ± 2.6                            |
| <i>A. makarovi</i>   | Celoten poziv        | 16.90 ± 3.10    |                          |                                     |
|                      | Me0                  | 5.0 ± 1.22      | 117 (97 - 1459)          |                                     |
|                      | Me1                  | 0.65 ± 0.095    | 178 (70 - 1104)          |                                     |
|                      | Me2                  | 2.48 ± 0.787    | 178 (73 - 1255)          |                                     |
|                      | Me3                  | 8.19 ± 3.09     | 164 (94 - 1255)          | 49 ± 2.5                            |
| <i>A. 'Dragonja'</i> | Celoten poziv        | 30.894 ± 19.764 |                          |                                     |
|                      | Dre0                 | 5.426 ± 1.79    | 222 (59 - 1406)          |                                     |
|                      | Dre1                 | 18.424 ± 14.781 |                          |                                     |
|                      | Dre1-čirik           | 0.038 ± 0.003   | 1617 (492 - 3445)        |                                     |
|                      | Dre1-pulz            | 0.206 ± 0.033   | 210 (164 - 1594)         | 347 ± 58                            |



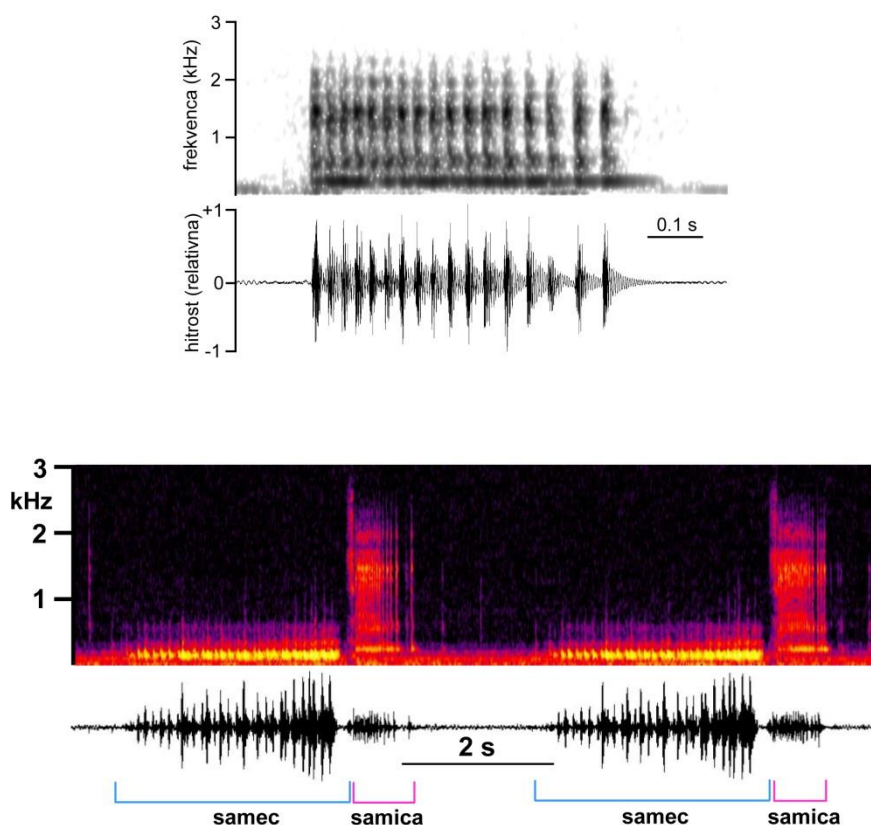
Slika 15: Primerjava parametrov vrstno-specifičnih elementov v pozivnih napevih samcev štirih vrst rodu *Aphrodes* in tipa *A. 'Dragonja'* (prirejeno po Derlink in sod., 2014). Črke označujejo statistično značilne razlike (parna primerjava, Wilcoxon test rangov za večkratno primerjavo z Bonferonijev korekcijo); \* $P < 0.5$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ . *A. aestuarina* (N = 9, n = 65, 4-5 signalov na samca), *A. bicincta* (N = 20, n = 200, 10 signalov na samca), *A. diminuta* (N = 20, n = 99, 4-5 signalov na samca), *A. makarovi* (N = 10, n = 70, 7 signalov na samca), *A. 'Dragonja'* (N = 20, n = 200, 10 signalov na samca). Samci so bili naključno izbrani iz knjižnice posnetkov. Pri *A. diminuta* je bila dominantna frekvenca izmerjena na delu z najvišjo amplitude na koncu 'sirene'.

Figure 15: Comparison of species-specific parameters of sound elements in male advertisement songs of four *Aphrodes* species and *A. 'Dragonja'* type (modified from Derlink et al., 2014). Different letters indicate statistically significant difference (pairwise comparison, Wilcoxon rank sum test for multiple comparisons with Bonferroni correction); \* $P < 0.5$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ . *A. aestuarina* (N = 9, n = 65, 4-5 signals per male), *A. bicincta* (N = 20, n = 200, 10 signals per male), *A. diminuta* (N = 20, n = 99, 4-5 signals per male), *A. makarovi* (N = 10, n = 70, 7 signals per male), *A. 'Dragonja'* (N = 20, n = 200, 10 signals per male). The males were randomly chosen from the library of recordings. In *A. diminuta* frequency was measured at the highest-amplitude part at the end of the 'siren'.

### 3.2.2 Odzivni napevi samic in duet

Odzivni napevi samic vseh vrst so sestavljeni iz niza enakomerno ponavljajočih se pulzov (slike 16 - 20). Razlike med vrstami najdemo predvsem v dolžini odziva in ponavljalnem času pulzov (preglednica 8, slika 21).

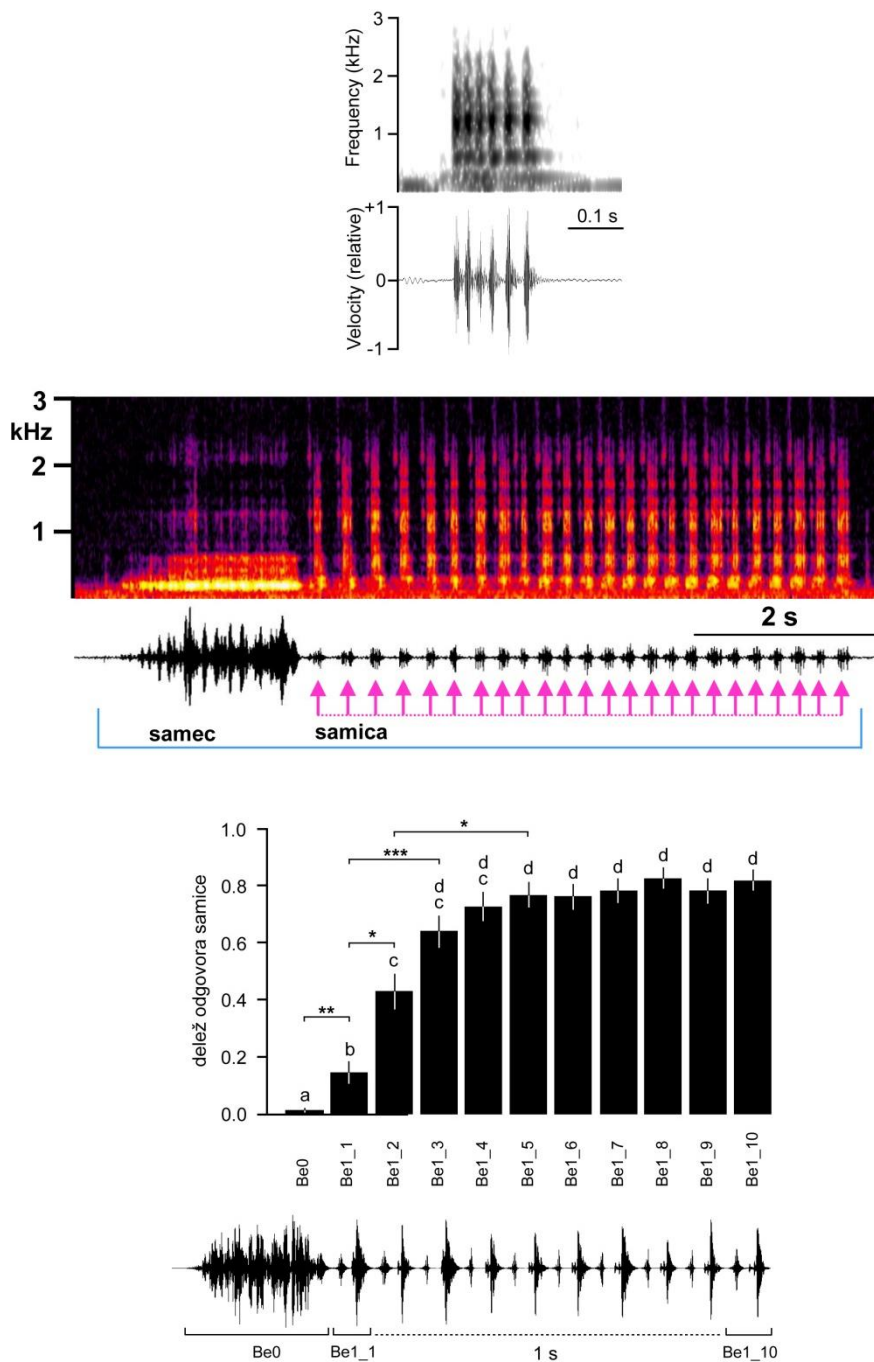
Odziv samic vrste *A. aestuarina* se loči od odgovora *A. bicincta* le po tem, da je daljši (slika 21). V duetu samičin odgovor sledi samčevemu čiriku.



Slika 16: Odgovor samice vrste *A. aestuarina*. Posamičen odgovor samice (zgoraj), in odgovor samice na pozivni napev samca vrste *A. aestuarina* (spodaj)  
Figure 16: Female reply of *A. aestuarina*. Individual reply of a female (above) and female reply to a male advertisement call of *A. aestuarina* (below)

Pri *A. bicincta* je odzivni napev kratek in v duetu se samica oglašuje v intervalu med ponavljajočimi se čiriki. Odzivi samic se prekrivajo s pulzi v pozivnem napevu samca. Samice so slabše odgovarjale v prvih dveh dvojicah kot na ostalih osem v seriji (slika 17).



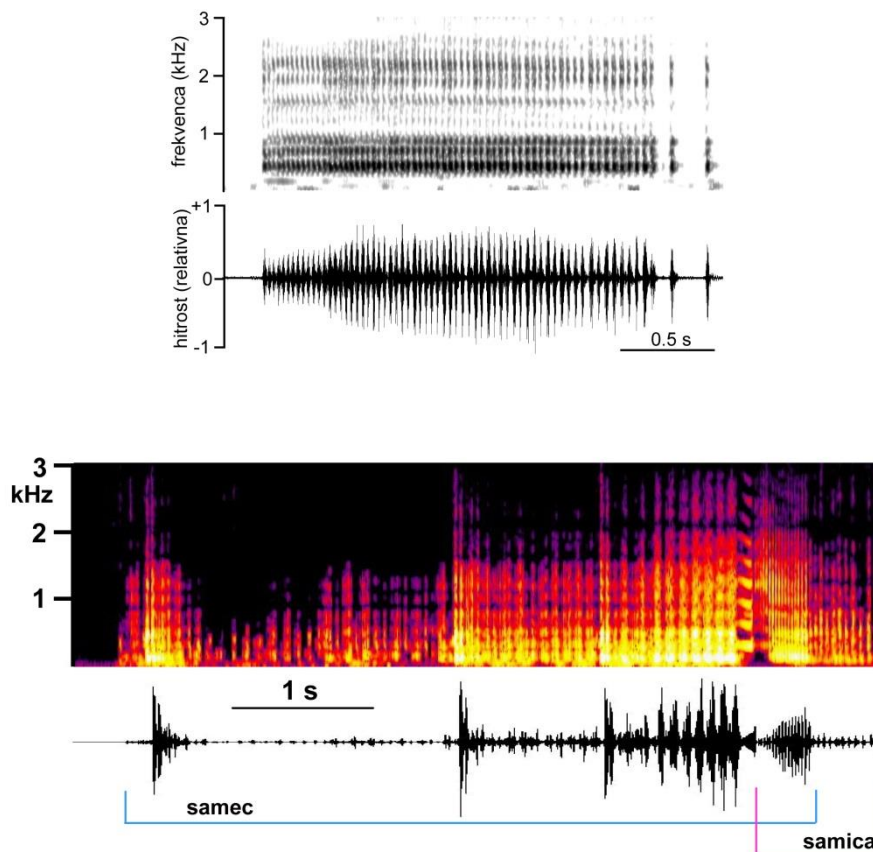


Slika 17: Odgovor samice vrste *A. bicincta*. Posamičen odgovor samice (zgoraj), odgovor samice na pozivni napev samca vrste *A. bicincta* (v sredini). Delež odgovorov samic *A. bicincta* na prvih deset dvojic elementov pozivnega napeva samcev iste vrste (spodaj) (prirejeno po Derlink in sod., 2014). Prikazana so povprečja in standardne napake. Črke označujejo statistično značilne razlike (parna primerjava, Wilcoxon test rangov za večkratno primerjavo z Bonferonnijevo korekcijo); \* $P < 0.5$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ . *A. bicincta*  $N = 15$

Figure 17: Female reply of *A. bicincta*. Individual reply of a female (above), female reply to a male advertisement call of *A. bicincta* (in the middle). Proportion of female reply of *A. bicincta* to the first ten dyads of male advertisement call of the same species (below) (modified from Derlink et al., 2014). Means and standard errors are shown. Different letters indicate statistically significant difference (pairwise comparison, Wilcoxon rank sum test for multiple comparisons with Bonferroni correction); \* $P < 0.5$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ . *A. bicincta*  $N = 15$



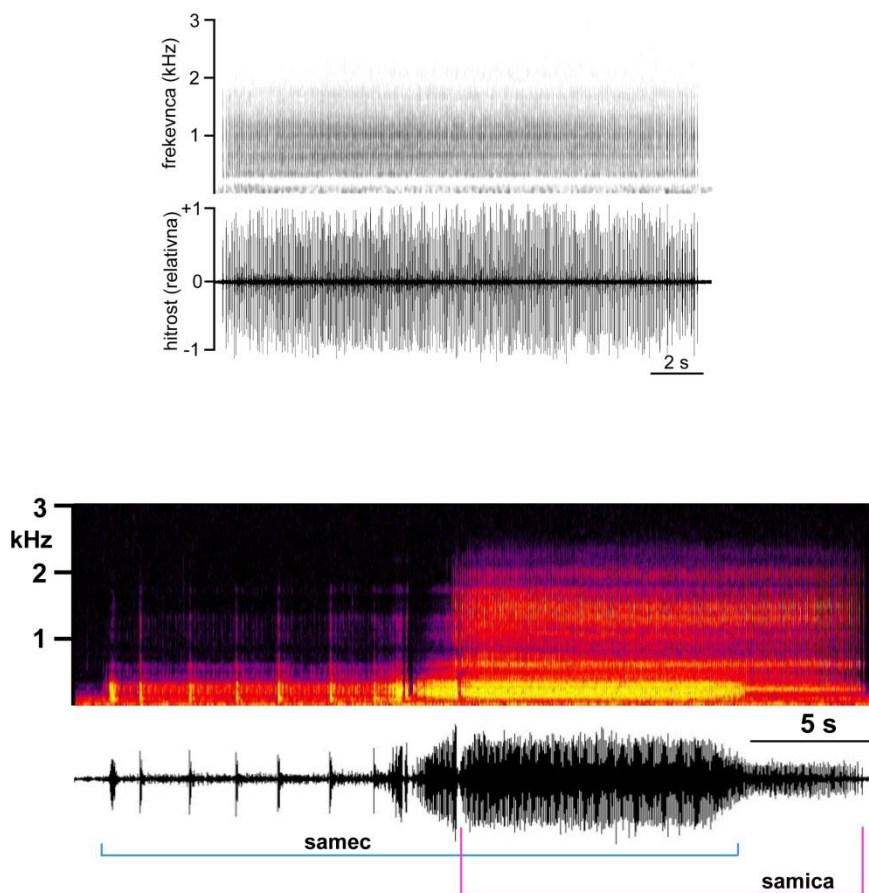
Odziv samic *A. diminuta* je daljši kot pri *A. aestuarina* in *A. bicincta* in ima tudi daljši ponavljalni čas pulzov (sliki 18 in 21, preglednica 8). V duetu samica prične odgovarjati za 'sireno' v pozivnem napevu in del njenega odgovora prekrijejo samčevi pulzi.



Slika 18: Odgovor samice vrste *A. diminuta*. Posamičen odgovor samice (zgoraj), odgovor samice na pozivni napev samca vrste *A. diminuta* (spodaj)

Figure 18: Female reply of *A. diminuta*. Individual reply of a female (above), female reply to a male advertisement call of *A. diminuta* (below)

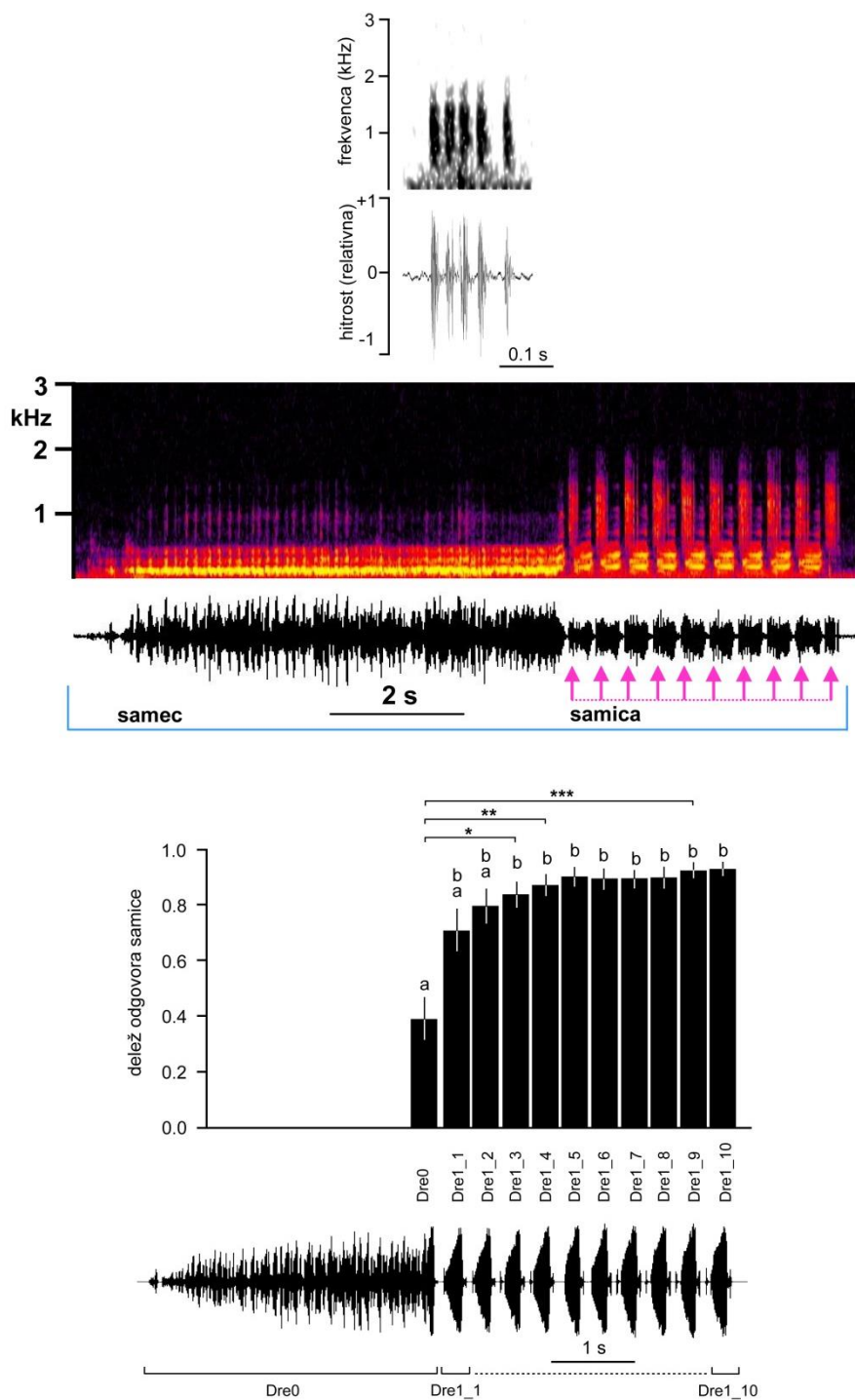
Odzivni napev samic *A. makarovi* je od vseh vrst najdaljši in ima tudi najdaljši ponavljalni čas pulzov (sliki 19 in 21, preglednica 8). Najdaljši izmerjeni odgovor samic je trajal 61 s. Samice pričnejo odgovarjati med samčevim pozivnim napevom in odgovor se po zaključku pozivnega napeva nadaljuje (de Groot in sod., 2012).



Slika 19: Odgovor samice vrste *A. makarovi*. Posamičen odgovor samice (zgoraj), odgovor samice na pozivni napev samca vrste *A. makarovi* (spodaj)  
Figure 19: Female reply of *A. makarovi*. Individual reply of a female (above), female reply to a male advertisement call of *A. makarovi* (below)

Odziv samic tipa *A. 'Dragonja'* se v nobenem izmerjenem parametru ne razlikuje od odzivnega napeva samic vrste *A. bicincta* (sliki 20 in 21, preglednica 8).

Tudi struktura dueta je enaka kot pri vrsti *A. bicincta*, saj se samica oglašja za čiriki in v intervalu med ponavljajočimi se pulzi (slika 20). Odziv samice lahko delno prekrije naslednji pulz v sosledju samčevega pozivnega napeva. Samice so na vseh deset dvojic v seriji odgovarjale enako dobro.



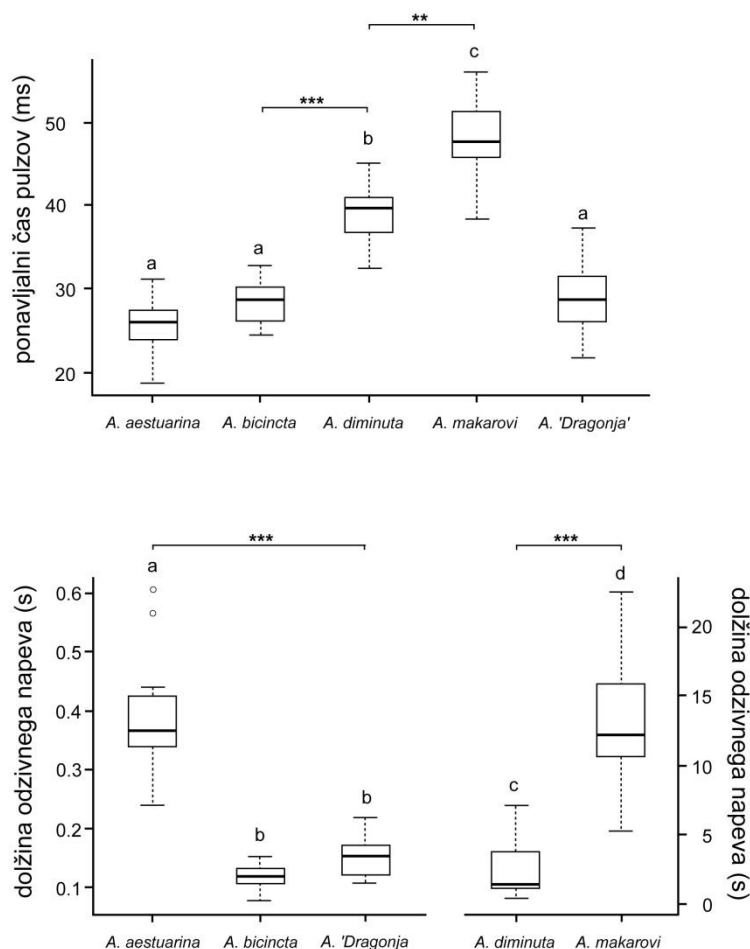
Slika 20: Odgovor samice vrste *A. 'Dragonja'*. Posamičen odgovor samice (zgoraj), odgovor samice na pozivni napev samca vrste *A. 'Dragonja'* (v sredini). Delež odgovorov samic *A. 'Dragonja'* na prvih deset dvojic pozivnega napeva samcev iste vrste (spodaj). Prikazana so povprečja in standardne napake. Črke označujejo statistično značilne razlike (parna primerjava, Wilcoxon test rangov za večkratno primerjavo z Bonferonnijevo korekcijo); \* $P < 0.5$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ . *A. 'Dragonja'*  $N = 15$

Figure 20: Female reply of *A. 'Dragonja'*. Individual reply of a female (above), female reply to a male advertisement call of *A. 'Dragonja'* (in the middle). Proportion of female reply of *A. 'Dragonja'* to the first ten dyads of male advertisement call of the same species (below). Means and standard errors are shown. Different letters indicate statistically significant difference (pairwise comparison, Wilcoxon rank sum test for multiple comparisons with Bonferroni correction); \*P < 0.5; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001. *A. 'Dragonja'* N = 15

Preglednica 8: Časovni parametri in dominantna frekvenca vrstno-specifičnih odgovorov samic (prirejeno po Bleumel in sod., 2014). Samice so bile naključno izbrane iz zvočne knjižnice in vključujejo osebkje iz Slovenije in Velike Britanije.

Table 8: Temporal parameters and dominant frequency of species-specific female reply (modified from Bleumel et al., 2014). The females were randomly chosen from the library of recordings and include specimens from Slovenia and UK.

| Vrsta                | N  | n   | Dolžina odziva (s) | Ponavljalni čas pulzov (ms) | Dominantna frekvenca (Hz) |
|----------------------|----|-----|--------------------|-----------------------------|---------------------------|
|                      |    |     | povprečje ± SD     | povprečje ± SD              | mediana (min - max)       |
| <i>A. aestuarina</i> | 14 | 96  | 0.414 ± 0.136      | 24.3 ± 3.8                  | 560 (354 - 1378)          |
| <i>A. bicincta</i>   | 26 | 126 | 0.140 ± 0.035      | 24.9 ± 3.2                  | 563 (101 - 1284)          |
| <i>A. diminuta</i>   | 7  | 70  | 2.51 ± 2.28        | 34.3 ± 3.2                  | 804 (559 - 967)           |
| <i>A. makarovi</i>   | 15 | 92  | 16.47 ± 5.1        | 52.1 ± 5.7                  | 547 (118 - 1166)          |
| <i>A. 'Dragonja'</i> | 26 | 128 | 0.136 ± 3.1        | 30.6 ± 3.7                  | 685 (325 - 1188)          |



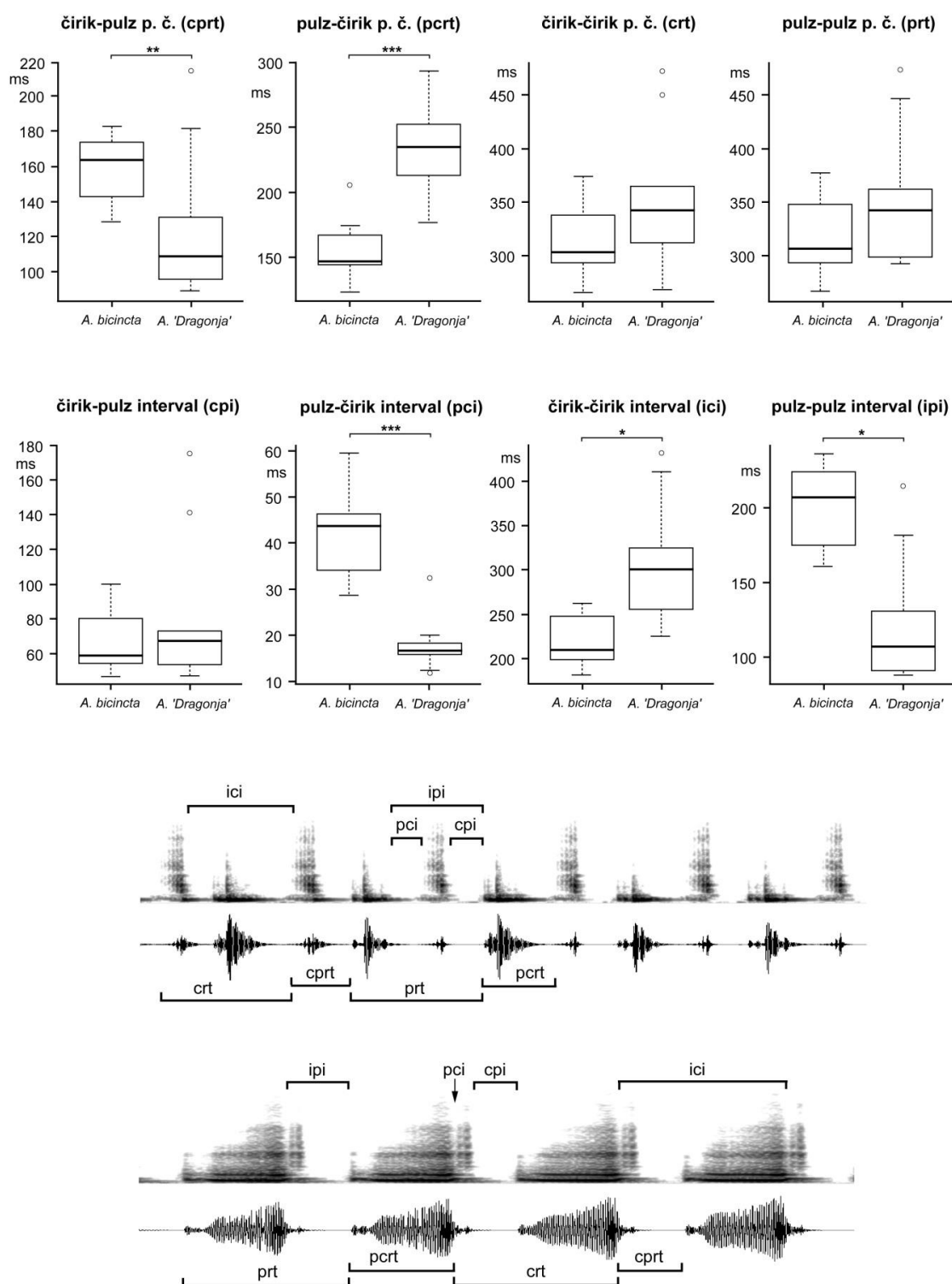
Slika 21: Razlike v ponavljalnih časih in dolžini odzivnega napeva samic štirih vrst rodu *Aphrodes* in tipa *A. 'Dragonja'* (prirejeno po Derlink in sod., 2014). Črke označujejo statistično značilne razlike (parna primerjava, Wilcoxon test rangov za večkratno primerjavo z Bonferonijev korekcijo); \* $P < 0.5$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ . V analizo so vključeni odgovori samic, ki so bile testirane v testih za preference. Naključno je bil izbran po en odgovor iz vsakega od stimulacijskih programov. *A. aestuarina* (N = 15, n = 75), *A. bicincta* (N = 15, n = 75), *A. diminuta* (N = 7, n = 35), *A. makarovi* (N = 15, n = 75), *A. 'Dragonja'* (N = 15, n = 75).

Figure 21: Differences in pulse repetition time and duration of species-specific female replies of four *Aphrodes* species and *A. 'Dragonja'* type (modified from Derlink et al., 2014). Different letters indicate statistically significant difference (pairwise comparison, Wilcoxon rank sum test for multiple comparisons with Bonferroni correction); \* $P < 0.5$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ . Replies from females included in the preference tests were analysed. One randomly chosen reply from each stimulation sequence was included. *A. aestuarina* (N = 15, n = 75), *A. bicincta* (N = 15, n = 75), *A. diminuta* (N = 7, n = 35), *A. makarovi* (N = 15, n = 75), *A. 'Dragonja'* (N = 15, n = 75).

### 3.2.3 Dvojice v pozivnih napevih samcev *A. bicincta* in tipa *A. 'Dragonja'*

Osnovna struktura pozivnega napeva samcev tipa *A. 'Dragonja'* je enaka kot pri vrsti *A. bicincta* – nespecifičnemu začetnemu delu sledi vrstno-specifičen del, ki je sestavljen iz ponavljajočih se dvojic (slika 14). Dvojico tipa *A. 'Dragonja'* prav tako sestavljata čirik in pulz, vendar se zgradba dvojice tipa *A. 'Dragonja'* od dvojice *A. bicincta* bistveno konsistentno razlikuje v naslednjem: (a) vrstnem redu elementov v katerem čirik sledi

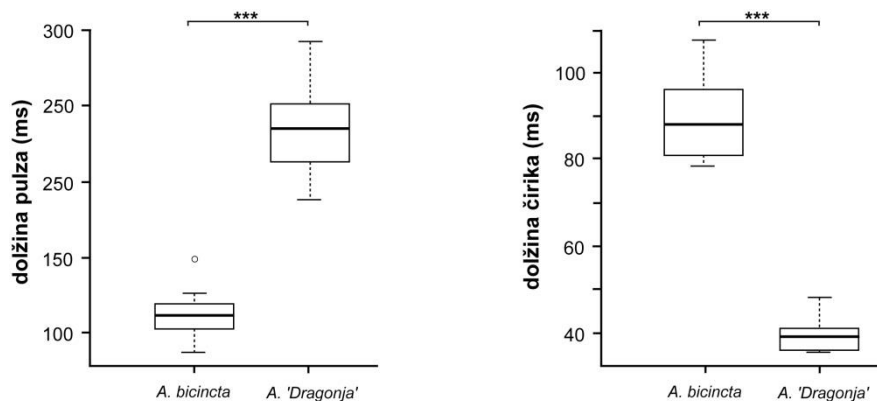
pulzu (sliki 11 in 14), (b), daljši dolžini pulza, (c) krajši dolžini čirika, (d) daljšem ponavljalnem času pulz-čirik, (e) krajšem intervalu med pulzom in čirikom in (f) daljšem intervalu med čiriki (sliki 22 in 23). Ponavljalni čas pulzov je variabilen in se tudi pri istem samcu v dveh zaporedno oddanih napevih lahko razlikuje za več kot 100 ms. Krajše izmerjene vrednosti za posamezne napeve so bile v območju pozivnih napevov *A. bicincta*, daljše vrednosti pa nad 400 ms. Ker so časovni parametri napeva med seboj povezani, so v napevih z daljšim ponavljalnim časom pulzov daljši tudi ostali parametri razen pulz-čirik ponavljanege časa in intervala med njima. Kot je razvidno na sliki 22 sta ob krajših ponavljalnih časih pulzov v pozivnem napevu *A. 'Dragonja'* v primerjavi z *A. bicincta* statistično značilno krajša interval med pulzi ter ponavljani čas čirik-pulz. V napevih s statistično značilno daljšim ponavljalnim časom pulzov se slednja parametra ne razlikujeta od napeva *A. bicincta*, medtem ko se značilno podaljša interval čirik-pulz.



Slika 22: Primerjava časovnih parametrov (okvirji z ročaji, zgoraj) ponavljajočih se dvojic pulzov in čirikov v pozivnih napevih samcev *A. bicincta* (zgornji signal) in *A. 'Dragonja'* (spodnji signal). Wilcoxon test rangov, \* $P < 0.5$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ . *A. bicincta* (N = 15, n = 150, *A. 'Dragonja'* (N = 10, n = 100)

Figure 22: Comparison of different temporal parameters (boxplots, above) in pulse and chirp dyads in the advertisement calls of *A. bicincta* (signal above) and *A. 'Dragonja'* (signal below). Wilcoxon rank test, \* $P < 0.5$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ . *A. bicincta* (N = 15, n = 150, *A. 'Dragonja'* (N = 10, n = 100).

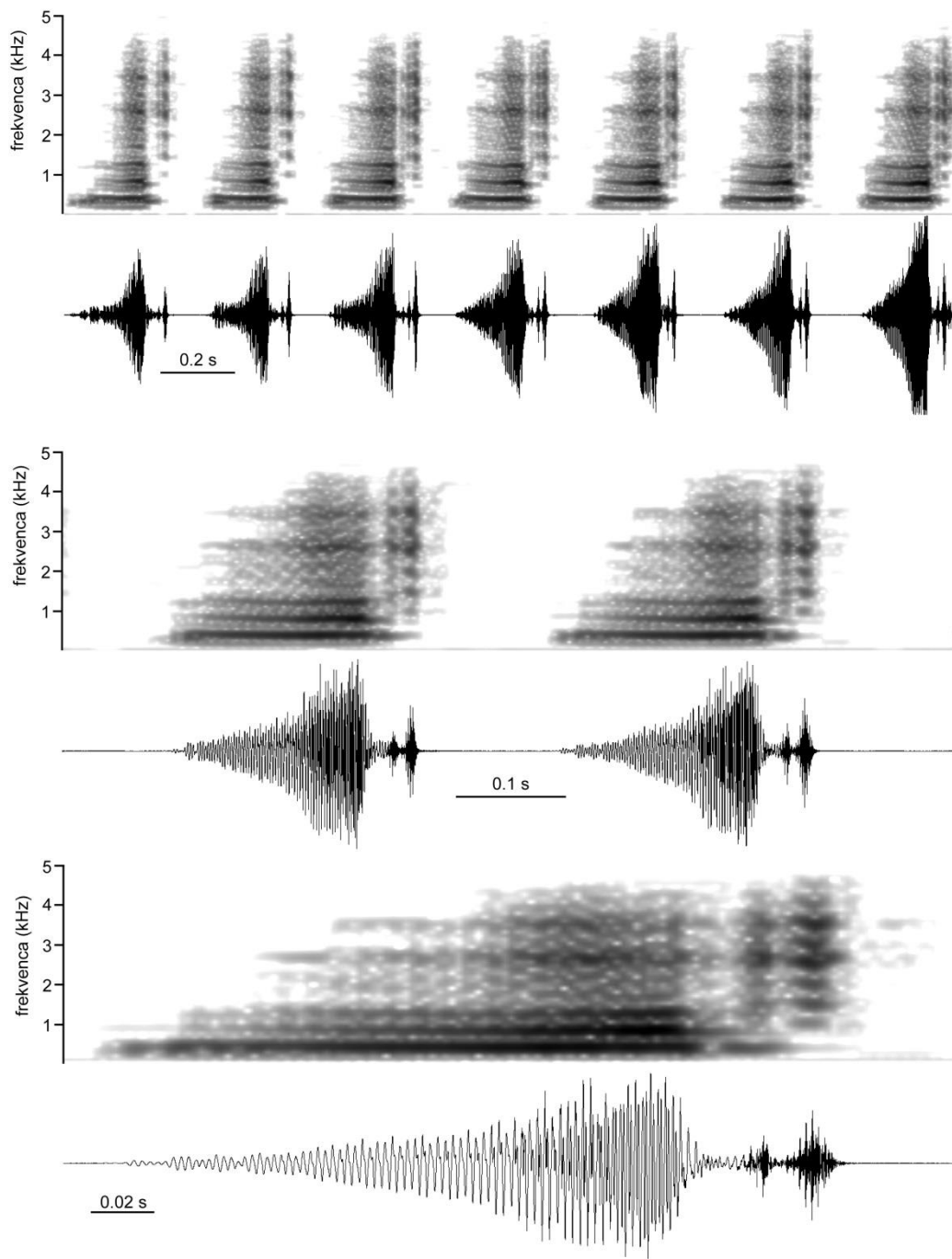
Pulz v pozivnem napevu tipa *A. 'Dragonja'* je značilno daljši kot v napevu vrste *A. bicincta*, medtem ko je čirik značilno krajši (slika 23). Tipična dvojica pulz-čirik je sestavljena iz pulza z nizko osnovno frekvenco in naraščajočo amplitudo, ki mu sledi čirik praviloma sestavljen iz dveh gruč visokofrekvenčnih pulzov (slika 24). Interval med pulzom in čirikom je zelo kratek in pogosto čirik sledi pulzu brez opaznega intervala. V frekvenčnem pasu med 150 in 1000 Hz v pulzu pogosto opazimo vsaj dve jasni harmonični komponenti. Tekom pulza se v njem pričnejo pojavljati tudi višje frekvenčne komponente, katerih amplituda je najvišja ob zaključku pulza. Dominantna frekvenca pulza se v večini primerov nahaja pod 500 Hz in vedno pod 1000 Hz (slika 24). V zadnjem delu pulza so jasno izražene tudi frekvenčne komponente med 1300 in 2500 Hz. Dominantna frekvenca čirika se v večini primerov nahaja med 1300 in 2500 Hz (slika 24). V dvojicah pri katerih med pulzom in čirikom ni intervala, je dominantna frekvenca v času čirika enaka dominantni frekvenci pulza.



Slika 23: Primerjava časovnih parametrov pulza in čirika dvojic *A. bicincta* in *A. 'Dragonja'*. Prikazani so okvirji z ročaji. Wilcoxon test rangov, \* $P < 0.5$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ . *A. bicincta* (N = 15, n = 150, *A. 'Dragonja'* (N = 10, n = 100)

Figure 23: Comparison of duration of pulse and chirp duration in dyads in advertisement calls of *A. bicincta* and *A. 'Dragonja'*. Boxplots are shown. Wilcoxon rank test, \* $P < 0.5$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ . *A. bicincta* (N = 15, n = 150, *A. 'Dragonja'* (N = 10, n = 100)





Slika 24: Detajlna predstavitev ponavljajočih se dvojic pulza in čirika v pozivnem napevu *A. 'Dragonja'* na različnih časovnih oseh. V vseh primerih spodaj oscilogram, zgoraj spektrogram  
Figure 24: Detailed presentation of pulse-chirp dyads in advertisement call of *A. 'Dragonja'* on different time axes. In all cases, oscillogram below, spectrogram above

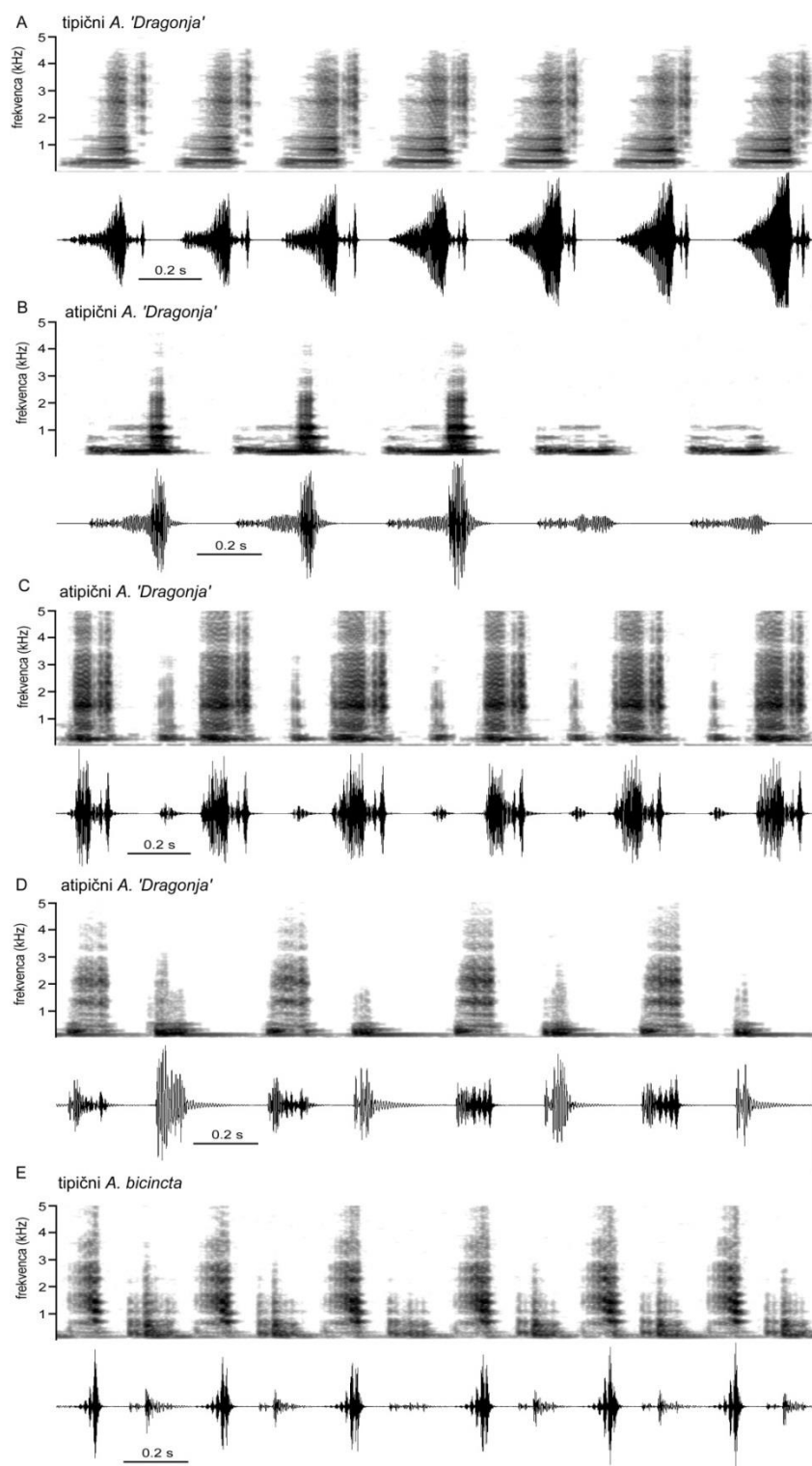
### 3.2.4 Atipični pozivni napevi tipa A. '*Dragonja*'

Pozivni napevi nekaterih samcev so odstopali od tipične strukture. Na slikah 25 - 27 so prikazani nekateri primeri, ki so imeli tipično osnovno strukturo napeva (nespecifičen del, ki mu je sledilo najmanj 10 ponavljajočih elementov), vendar se je sestava dvojice bistveno razlikovala od običajne. Prikazani primeri predstavljajo možne prehode med dvojico v napevu tipa A. '*Dragonja*' (slike 25a - 27a) in v napevu A. *bicineta* (slike 25e - 27e).

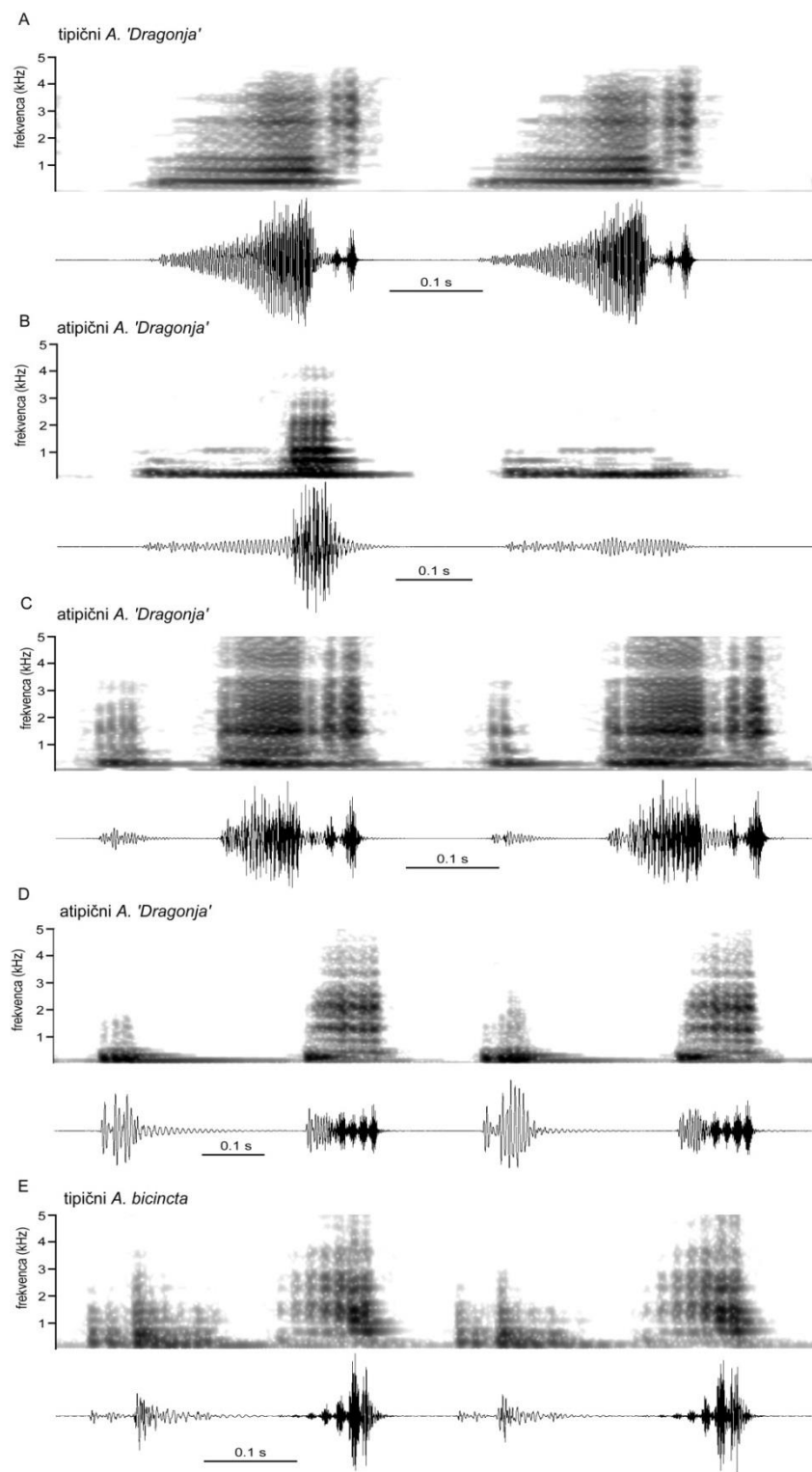
Registrirali smo napeve pri katerih so se ponavljali le nizkofrekvenčni pulzi nizkih amplitud (ni prikazano na sliki), ali pa so se taki pulzi izmenjevali s pulzi, ki so imeli v zadnjem delu dodan čirik visoke amplitude (slike 25b - 27b).

V nekaterih primerih je imel začetni del takega sicer nizkofrekvenčnega pulza višjo amplitudo v začetnem delu (slike 25c – slike 27c). Zaradi nizke vmesne amplitude med začetnim delom pulza ter končnim delom, ki vključuje visokoamplitudni čirik, kateremu sledi čirik sestavljen iz dveh ali treh gruč, je taka struktura napeva podobna izmenjevanju pulza in čirika v napevu A. *bicineta*.

V pulzu z višjo začetno amplitudo lahko tudi manjka čirik visoke amplitude v zadnjem delu (slike 25d - 27d). Tudi struktura takega napeva je podobna izmenjevanju pulza in čirika v napevu A. *bicineta*.

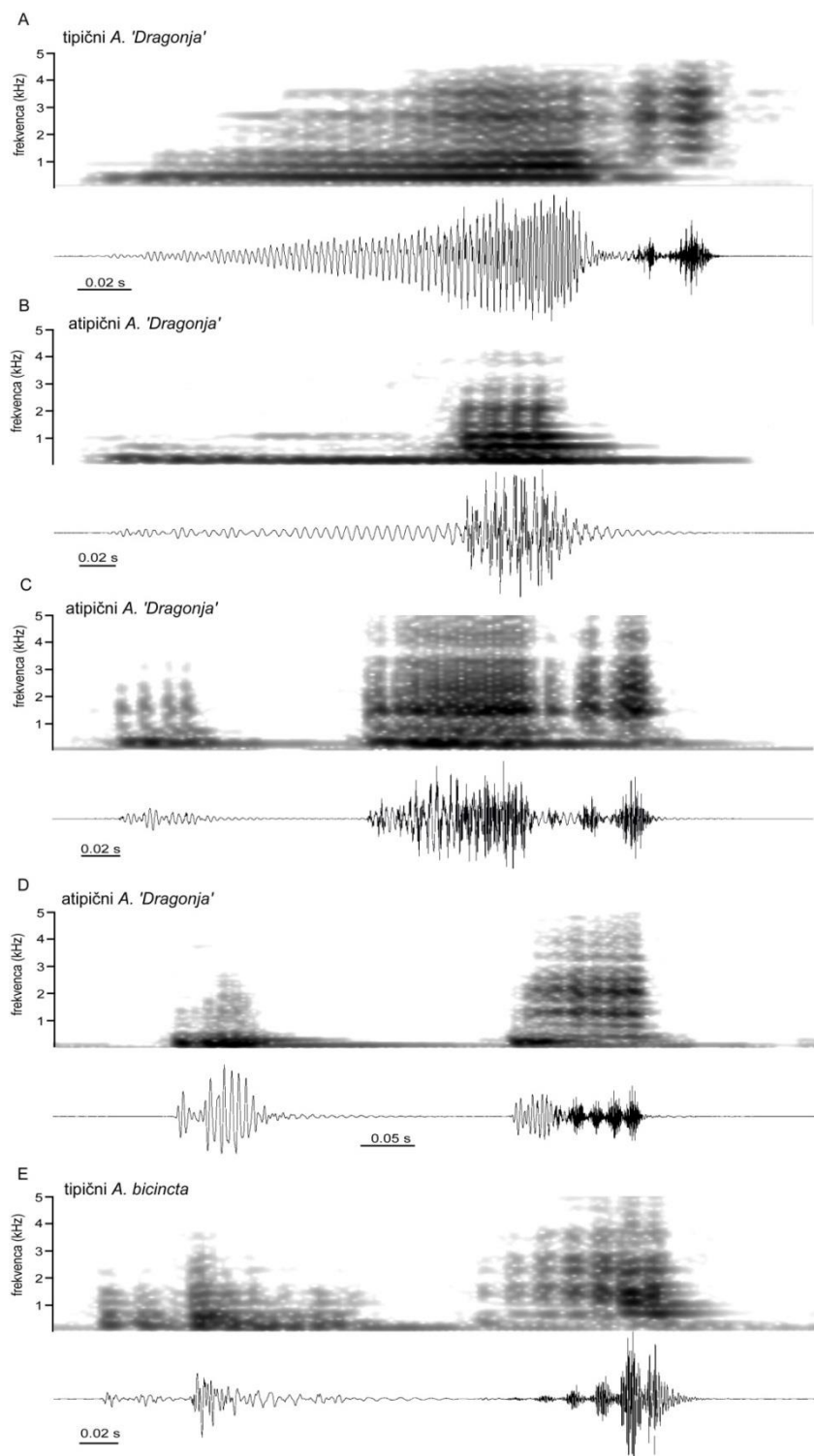


Slika 25: Primeri atipičnih pozivnih napevov tipa *A. 'Dragonja'*, ki ponazarjajo možne prehode v strukturi zvočnih elementov (b - d) med tipičnimi dvojcami *A. 'Dragonja'* (a) in *A. bicincta* (e)  
Figure 25: Examples of atypical advertisement calls of *A. 'Dragonja'* which suggest possible transitions in the structure pulse-chirp dyads (b - d) of *A. 'Dragonja'* (a) and *A. bicincta* (e)



Slika 26: Primeri atipičnih pozivnih napevov tipa *A. 'Dragonja'*, ki ponazarjajo možne prehode v strukturi zvočnih elementov (b - d) med tipičnimi dvojicami *A. 'Dragonja'* (a) in *A. bicincta* (e). V primerjavi s sliko 25 je časovna os raztegnjena.

Figure 26: Examples of atypical advertisement calls of *A. 'Dragonja'* which suggest possible transitions in the structure pulse-chirp dyads (b - d) of *A. 'Dragonja'* (a) and *A. bicincta* (e). In comparison with Fig. 25 the time scale is extended.



Slika 27: Primeri atipičnih pozivnih napevov tipa *A. 'Dragonja'*, ki ponazarjajo možne prehode v strukturi zvočnih elementov (b - d) med tipičnimi dvojicami *A. 'Dragonja'* (a) in *A. bicincta* (e). V primerjavi s slikama 25 in 26 je časovna os raztegnjena.

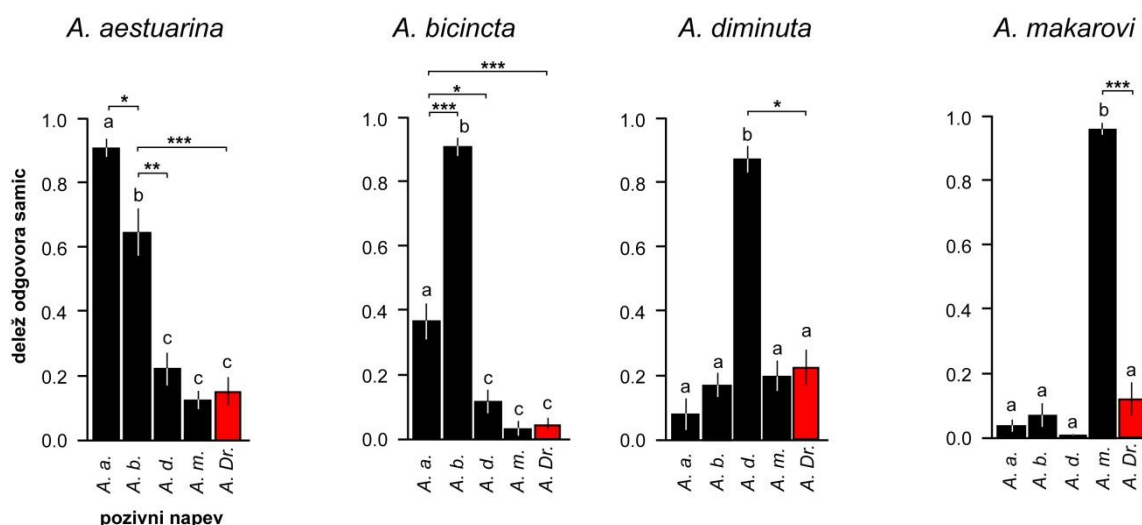
Figure 27: Examples of atypical advertisement calls of *A. 'Dragonja'* which suggest possible transitions in the structure pulse-chirp dyads (b - d) of *A. 'Dragonja'* (a) and *A. bicincta* (e). In comparison with Figs. 25 and 26 the time scale is extended.

Samce s takimi napevi smo našli na lokacijah Zemono, Podnanos, Prelože-Lokev in Dolenje. Ker so imeli napevi teh samcev tipično strukturo in so napev z enakimi dvojicami oddajali tudi več dni zaporedoma, predvidevamo, da niso nerazviti napevi mladih samcev tipa *A. 'Dragonja'*. Predpostavljamo, da so lahko rezultat nepravilnosti v strukturi zvočila ali pa hibridizacije med tipom *A. 'Dragonja'* in *A. bicincta*. Na lokacijah, na katerih smo našli atipične napeve, je bila hkrati prisotna tudi vrsta *A. bicincta* (Zemono, Podnanos) ali smo slednjo našli na lokacijah v bližini (Prelože-Lokev, Dolenje). Na lokacijah Zemono, Podnanos in Prelože-Lokev je bila prisotna tudi vrsta *A. makarovi*.

### 3.3 PREFERENCE SAMIC ZA POZIVNE NAPEVE SAMCEV LASTNE IN DRUGIH VRST

#### 3.3.1 Vrste *A. aestuarina*, *A. bicincta*, *A. diminuta* in *A. makarovi*

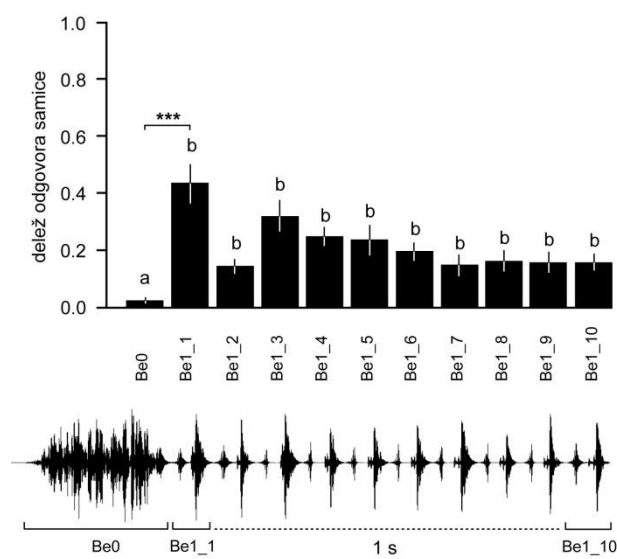
Samice vseh štirih vrst so značilno preferenčno odgovarjale na pozivne napeve samcev lastne vrste (slika 28). Samice vseh vrst so bile slabo odzivne na pozivni napev tipa *A. 'Dragonja'*.



Slika 28: Delež odgovorov samic na pozivne napeve samcev vseh vrst in tip *A. 'Dragonja'* (rdeči stolpci) (prirejeno po Derlink in sod., 2014). Prikazana so povprečja in standardne napake. Črke označujejo statistično značilne razlike (parna primerjava, Wilcoxon test rangov za večkratno primerjavo z Bonferronijev korekcijo); \* $P < 0.5$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ . *A. aestuarina* N = 15, *A. bicincta* N = 15, *A. diminuta* N = 7, *A. makarovi* N = 15, *A. 'Dragonja'* N = 15

Figure 28: Proportion of female reply to male advertisement call of all species and *A. 'Dragonja'* type (red columns) (modified from Derlink et al., 2014). Means and standard errors are shown. Different letters indicate statistically significant difference (pairwise comparison, Wilcoxon rank sum test for multiple comparisons with Bonferroni correction); \* $P < 0.5$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ . *A. aestuarina* N = 15, *A. bicincta* N = 15, *A. diminuta* N = 7, *A. makarovi* N = 15, *A. 'Dragonja'* N = 15

Samice vrst *A. aestuarina* in *A. bicincta* so bile statistično značilno boljje odzivne na pozivne napeve samcev od druga druge kot na ostale heterospecifične napeve. Pozivni napev teh dveh vrst sestavljata podobna čirika, ki se razlikujeta v dolžini, vendar je bila recipročna odzivnost samic *A. aestuarina* v primerjavi z odzivnostjo samic *A. bicincta* značilno višja (Wilcoxon test,  $P=0.012$ ). Vse samice *A. aestuarina* so odgovorile vsaj enkrat na pozivni napev *A. bicincta* in 60 % samic je odgovorilo vsaj enkrat na vsakega od petih pozivnih napevov vključenih v stimulacijska zaporedja. Vendar se je njihov odgovor na bolj kompleksen pozivni napev vrste *A. bicincta* razlikoval od samic te vrste (slika 29). Samice vrste *A. bicincta* so bile značilno manj odzivne na prvi dvojici (slika 17) in v seriji desetih dvojic so v povprečju oddale  $6.6 \pm 1.4$  odgovorov (povprečje  $\pm$  SD). Samice vrste *A. aestuarina* so boljje odgovarjale v času prve dvojice, kar ustreza strukturi njihovega konespecifičnega napeva, ki vsebuje le en čirik in so v seriji desetih dvojic v povprečju oddale  $2.3 \pm 1.2$  odgovorov, kar je značilno manj kot samice *A. bicincta* (Wilcoxon test  $P < 0.001$ ). Samice *A. aestuarina* s svojim daljšim odzivnim napevom ( $390 \pm 96$  ms = povprečje  $\pm$  SD), niso sledile hitremu ponavljalnemu času čirikov v pozivnem napevu *A. bicincta* ( $275 \pm 45$  ms). Odzivni napev samic *A. bicincta* je dovolj kratek ( $119 \pm 21$ ), da se umesti v ta kratek interval ( $219 \pm 28$ ) ms med čiriki.

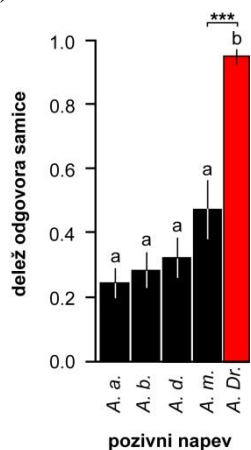


Slika 29: Delež odgovorov samic *A. aestuarina* na prvih deset dvojic pozivnega napeva samcev *A. bicincta* (Derlink in sod., 2014). Prikazana so povprečja in standardne napake. Črke označujejo statistično značilne razlike (parna primerjava, Wilcoxon test rangov za večkratno primerjavo z Bonferronijevo korekcijo); \*\*\* $P < 0.001$ . *A. aestuarina* N = 15

Figure 29: Proportion of female reply of *A. aestuarina* to the first ten dyads of male advertisement call of *A. bicincta* (Derlink et al., 2014). Means and standard errors are shown. Different letters indicate statistically significant difference (pairwise comparison, Wilcoxon rank sum test for multiple comparisons with Bonferroni correction); \*\*\* $P < 0.001$ . *A. aestuarina* N = 15

### 3.3.2 Tip A. 'Dragonja'

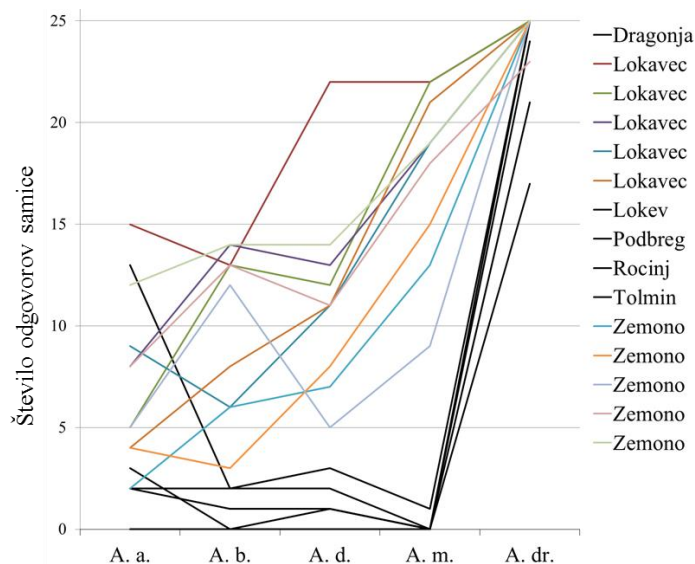
Samice, ki smo jih uvrstili v tip A. 'Dragonja' so značilno preferenčno odgovarjale na pozivne napeve tega tipa (slika 30).



Slika 30: Delež odgovorov samic A. 'Dragonja' na pozivne napeve samcev vseh vrst in tip A. 'Dragonja'. Prikazana so povprečja in standardne napake. Črke označujejo statistično značilne razlike (parna primerjava, Wilcoxon test rangov za večkratno primerjavo z Bonferronijevo korekcijo); \*\*\*P < 0.001. A. 'Dragonja' N = 15

Figure 30: Proportion of female reply of A. 'Dragonja' to male advertisement call of all species and A. 'Dragonja' type. Means and standard errors are shown. Different letters indicate statistically significant difference (pairwise comparison, Wilcoxon rank sum test for multiple comparisons with Bonferroni correction); \*\*\*P < 0.001. A. 'Dragonja' N = 15

Njihova odzivnost na pozivne napeve drugih vrst je bila relativno visoka (glede na samice preostalih vrst, slika 28) in glede na sliko 31 so se nekatere samice odzivale na pozivne napeve samcev vseh vrst.

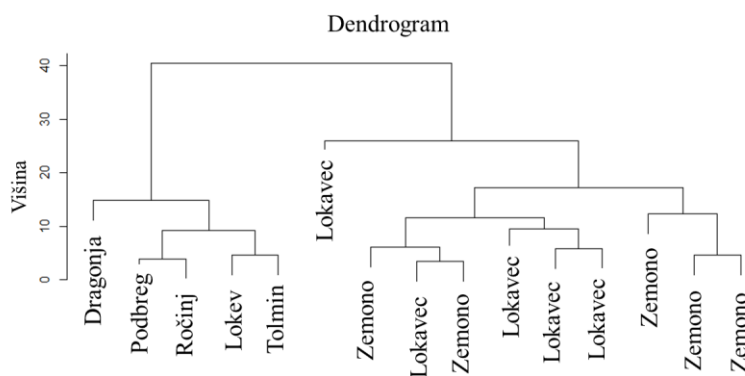


Slika 31: Natančna predstavitev odgovorov 15 samic tipa A. 'Dragonja' na pozivne napeve samcev vseh vrst in tip A. 'Dragonja'. Vsaka črta prikazuje drugo samico označeno z imenom lokacije, kjer je bila samica nabrana.



Figure 31: Detailed presentation of female replies of 15 females of *A. 'Dragonja'* type to advertisement call of all species and *A. 'Dragonja'* type. Each line represents a different female marked with location name of the site of the collection.

Dendrogram izračunan na podlagi evklidskih razdalj razdeli samice v dve skupini in glede na sliko 31 bi lahko samice razdelili v skupino, ki dobro odgovarja samo na tip *A. 'Dragonja'* in skupino, ki poleg dobrih odzivov na tip *A. 'Dragonja'* odgovarja relativno dobro tudi na pozivne napeve ostalih vrst (slika 32). Le-te so bile samice nabrane na lokacijah Zemono in Lokavec, kjer smo našli tudi vrsti *A. bicincta* in *A. makarovi*. Vse samice iz teh dveh lokacij so si bile po odzivnosti med seboj bolj podobne kot so bile podobne samicam iz preostalih petih lokacij.



Slika 32: Dendrogram evklidskih razdalj izračunanih iz odgovorov 15 samic tipa *A. 'Dragonja'* na napeve samcev vseh vrst in tip *A. 'Dragonja'*. Na drevesu so označene lokacije, kjer so bile samice nabrane.

Figure 32: Dendrogram of euclidian distances calculated from 15 females replies of *A. 'Dragonja'* type to male advertisement call of all species and *A. 'Dragonja'* type. Location of the collection site of the female is shown.

### 3.4 ODZIVNOSTI SAMIC NA VRSTNO-SPECIFIČNE ELEMENTE V POZIVNIH NAPEVIH SAMCEV

#### 3.4.1 Vrste *A. aestuarina*, *A. bicincta*, *A. diminuta* in *A. makarovi*

Samice vseh vrst so se slabo odzivale na draženje z nespecifičnimi začetnimi elementi pozivnih napevov (slika 33).

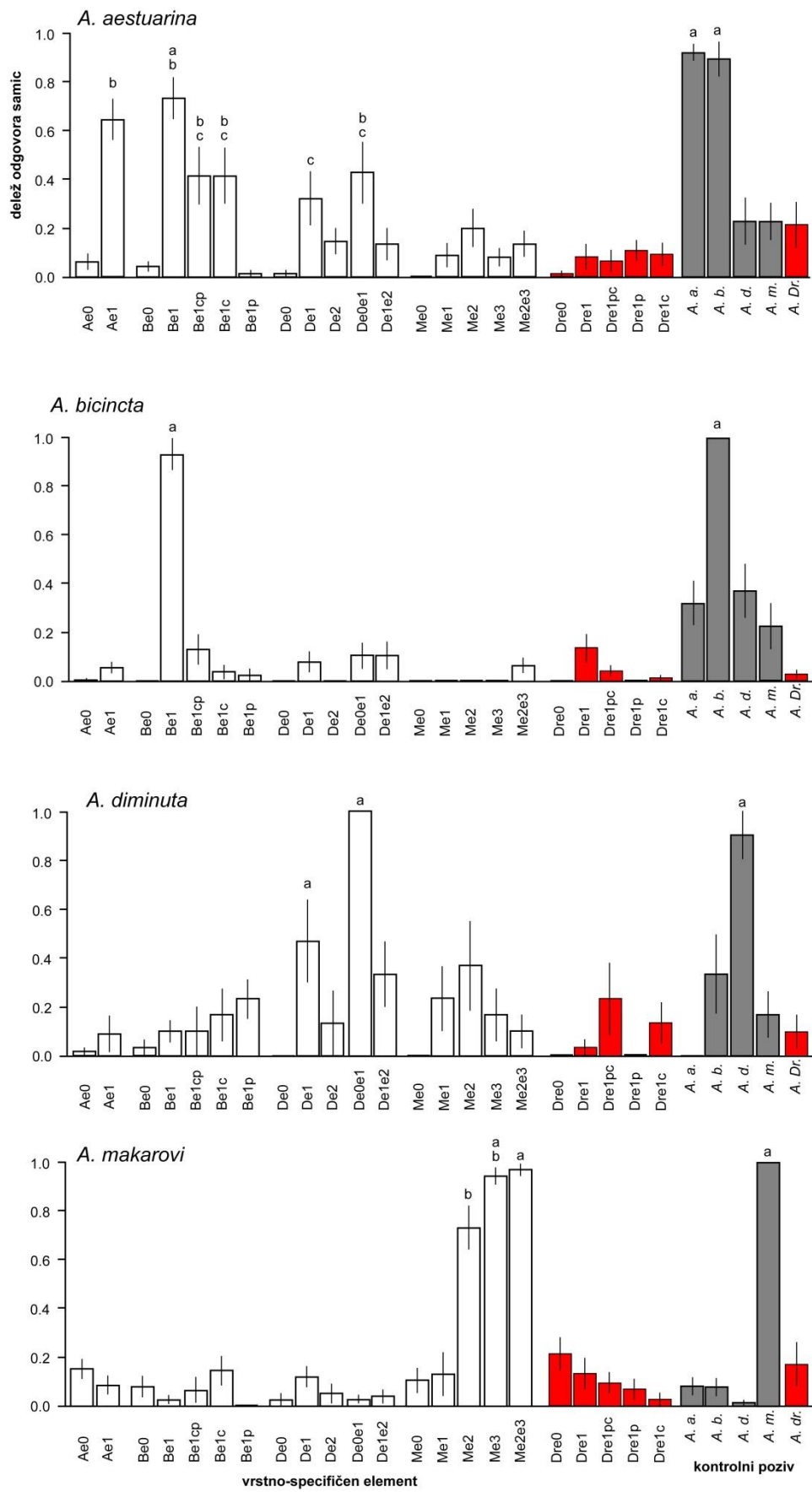
Samice vrste *A. aestuarina* so se enako dobro odzivale na element Bel, ki vključuje vseh 10 ponavljajočih se dvojic v napevu *A. bicincta*, kot na kontrolni pozivni napev lastne vrste. Čeprav je bil odziv teh samic na izoliran čirik, ki je sestavni del konspecifičnega napeva, visok, je bil značilno nižji kot na celoten, nerazstavljen kontrolni napev (parni test proporcev,  $P < 0.01$ ). Hkrati odgovor na čirik lastne vrste ni bil značilno nižji od odgovora na izoliran čirik vrste *A. bicincta*. Odziv na čirik v napevu tipa *A. 'Dragonja'* je bil značilno nižji. Medtem ko odziv na 'sireno' v pozivnem

napevu vrste *A. diminuta* ni bil značilno nižji od odziva na čirik vrste *A. bicincta*, so bile samice vrste *A. aestuarina* v splošnem najmanj odzivne na tiste elemente v napevih drugih vrst, ki jih sestavljajo pulzi.

Odziv samice vrste *A. bicincta* na konspecifičen element Be1 je bil enako dober kot na celoten kontrolni pozivni napev (slika 33). Odziv samic na vse elemente drugih vrst je bil nizek. Samice so slabo odgovarjale tudi na izoliran dvojec čirik-pulz v konspecifičnem napevu in v nasprotju s samicami *A. aestuarina* so te samice slabo odgovarjale na izoliran čirik tako svoje, kot tudi drugih vrst (vsi parni testi proporcev,  $P < 0.001$ ).

Samice vrste *A. diminuta* so dobro odgovarjale na vsa draženja, ki so vsebovala element s 'sireno' in odziv na kombinacijo začetnega elementa in 'sirene' se statistično ni razlikoval od odziva na nerazstavljen, kontrolni pozivni napev lastne vrste. Zaradi nizkega števila testiranih samic ( $n=6$ ), statistični testi niso pokazali značilnih razlik med ostalimi elementi.

Odziv samic vrste *A. makarovi* je bil visok zgolj na konspecifična elementa Me2 in Me3 (vsi parni testi proporcev za ostale konspecifične in heterospecifične elemente,  $P < 0.001$ ). Rezultati kažejo, da je zgolj element Me3 zadosten za proženje odzivnosti, ki se ne razlikuje od odziva na celoten, nerazstavljen kontrolni napev samca lastne vrste.

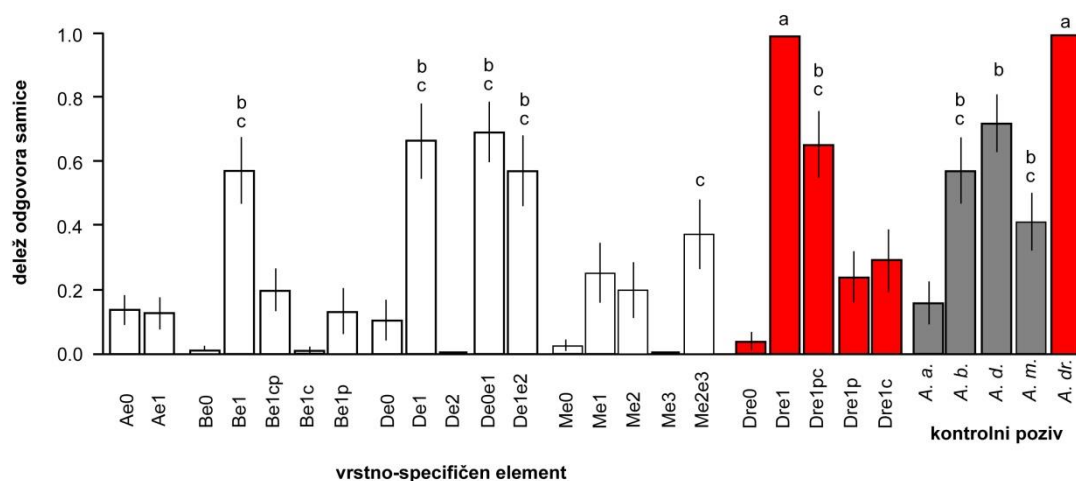


Slika 33: Delež odgovorov samic vseh vrst na zvočne elemente pozivnih napevov samcev vseh vrst in tip *A. 'Dragonja'* (prirejeno po Derlink in sod., 2014). Sivi stolpci prikazujejo deleže odgovorov samic na kontrole s celimi napevi samcev, ki so bili uporabljeni za vrsto-specifične elemente. Elementi in njihovi opisi so prikazani na slikah 10-14. Prikazana so povprečja in standardne napake. Črke označujejo statistično značilne razlike (parna primerjava, test proporcij z Bonferonni korekcijo). Zaradi jasnosti so prikazane samo primerjave deležev odgovorov, katerih povprečje je bilo višje od 0,2.

Figure 33: Proportion of female reply of all species to the sound elements in male advertisement songs of all species and *A. 'Dragonja'* type (modified from Derlink et al., 2014). Grey columns show female responsiveness to control playback stimulation with intact male calls used to obtain species-specific elements. For description of species-specific elements see figures 10-14. Means and standard errors are shown. Different letters indicate statistically significant difference (pairwise comparison, test of given proportions with Bonferonni correction). For clarity, only comparisons for elements for which mean obtained female responsiveness was higher than 0.2 are shown.

### 3.4.2 Tip *A. 'Dragonja'*

Odziv samic tipa *A. 'Dragonja'* je bil, podobno kot pri samicah vrste *A. bicincta*, na konspecifičen element, ki vključuje vseh deset ponavljajočih se dvojic, enako dober kot na celoten kontrolni pozivni napev (slika 34). V nasprotju samicami vrste *A. bicincta* so te samice dobro odgovarjale tudi na izolirano dvojico pulz-čirik v konspecifičnem napevu, medtem ko sta bila odziva na izolirana pulz in čirik značilno nižja od odziva na dvojico. Tudi odziv na izolirano heterospecifično dvojico čirik-pulz je bil značilno nižji. Samice tipa *A. 'Dragonja'* so na sosledje ponavljajočih se heterospecifičnih dvojic ter na vsa draženja, ki so vsebovala 'sireno' vrste *A. diminuta*, odgovarjale enako dobro kot na izolirano dvojico lastnega tipa. Prav tako ta odziv ni bil značilno višji od odziva na kombinacijo zadnjih dveh elementov v napevu vrste *A. makarovi*. V splošnem so se samice tipa *A. 'Dragonja'* najslabše odzivala na pozivni napev vrste *A. aestuarina*.



Slika 34: Delež odgovorov samic *A. 'Dragonja'* na zvočne elemente samcev vseh vrst in tip *A. 'Dragonja'*. Sivi stolpci prikazujejo deleže odgovorov samic na kontrole s celimi napevi samcev, ki so bili uporabljeni tudi za vrsto-specifične elemente. Elementi in njihovi opisi so prikazani na slikah 10-14. Prikazana so povprečja in standardne napake. Črke označujejo statistično značilne razlike (parna primerjava, test proporcij z Bonferonni korekcijo). Zaradi jasnosti so prikazane samo primerjave deležev odgovorov, katerih povprečje je bilo višje od 0,2.

Figure 34: Proportion of female reply of *A. 'Dragonja'* to the sound elements of all species and *A. 'Dragonja'* type. Grey columns show female responsiveness to control playback stimulation with intact male calls used to obtain species-specific elements. For description of species-specific elements see figures 10-14. Means and standard errors are shown. Different letters indicate statistically significant difference (pairwise comparison, test of given proportions with Bonferroni correction). For clarity, only comparisons for elements for which mean obtained female responsiveness was higher than 0.2 are shown.

### 3.5 ZNOTRAJVRSTNA IN MEDVRSTNA PARJENJA

#### 3.5.1 Znotrajvrstna parjenja

Parjenja vseh štirih vrst in tipa *A. 'Dragonja'* so potekala po enakem vzorcu. Po prenosu na rastlino je bila velika večina samic tiho, le nekatere so oddajale posamezne pulze nizkih amplitud. Večina samcev pa je že v nekaj minutah pričela oddajati pozivne napeve, na katere so samice večinoma nemudoma odgovorile (preglednica 9). Po vzpostavljenem duetu so samci pričeli hoditi po rastlini in iskati samico. Ko so jo našli, so zlezli nanjo (slika 35). Začelo se je dvorjenje in samci so nadaljevali z oddajanjem pozivnih napevov. Hkrati so v rednih intervalih mahali s prednjimi nogami. Samci so ostali na samici do kopulacije. Ker pri nobeni vrsti nismo registrirali posebnih vedenjskih značilnosti, smo sklepali, da bo uspeh parjenj osebkov različnih vrst posledica razlik v pozivnih napevih samca, odzivnih napevih samice ter strukturi duetov.



Slika 35: Dvorjenje v rodu *Aphrodes*. Samec sedi na samici in v rednih intervalih trza s prednjimi nogami, krili in telesom

Figure 35: Courtship behaviour in the genus *Aphrodes*. Male stands on the female and jerks with legs, wings and body in regular intervals

Preglednica 9: Različni parametri poteka znotrajvrstnih parjenj.

*A* - *A. aestuarina* (N = 9 - 10), *B* - *A. bicincta* (N = 8 - 9), *D* - *A. diminuta* (N = 6), *M* - *A. makarovi* (N = 10 - 11), *Dr* - *A. 'Dragonja'* (N = 8 - 12)

Table 9: Different parameters of intraspecies mating trials.

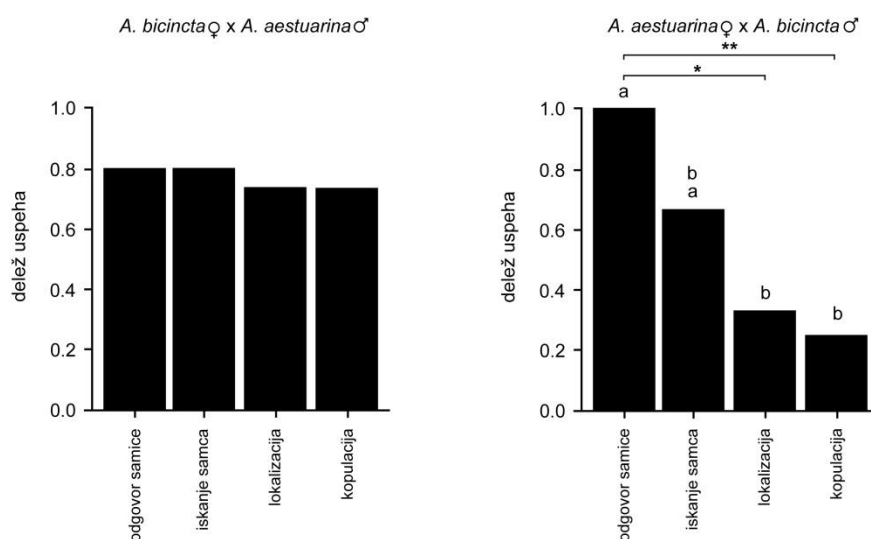
*A* - *A. aestuarina* (N = 9 - 10), *B* - *A. bicincta* (N = 8 - 9), *D* - *A. diminuta* (N = 6), *M* - *A. makarovi* (N = 10 - 11), *Dr* - *A. 'Dragonja'* (N = 8 - 12)

|           | latenca odgovora samice (s) | število signalov samca potrebnih za sproženje odgovora samice | latenca iskanja (s)   | število odgovorov samice potrebnih za sproženje iskanja samca | dolžina dvorjenja (s) | dolžina kopulacije (s) | celokupen čas (s)     |
|-----------|-----------------------------|---|-----------------------|---|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| vrsta     | $\bar{x}$ (min - max)       | $\bar{x}$ (min - max)   | $\bar{x}$ (min - max) | $\bar{x}$ (min - max)   | $\bar{x}$ (min - max) | $\bar{x}$ (min - max)  | $\bar{x}$ (min - max) |
| <i>A</i>  | 2 (1 - 11)                  | 1 (1 - 2)   | 19 (8 - 81)           | 5,5 (2 - 9)   | 132,6 (42 - 316)      | 103,5 (75 - 167)       | 305 (195 - 521)       |
| <i>B</i>  | 5,5 (1 - 71)                | 2,5 (1 - 22)  | 8 (4 - 82)            | 13 (10 - 21)  | 269,1 (164 - 396)     | 97 (77 - 156)          | 544 (462 - 2405)      |
| <i>D</i>  | 4 (1 - 13)                  | 1 (1 - 2)   | 3 (1 - 7)             | 2,5 (1 - 3)   | 134,7 (38 - 297)      | 111,5 (77 - 161)       | 287,5 (213 - 519)     |
| <i>M</i>  | 0 (na prvi signal)          | 1   | 2 (1 - 39)            | 1 (1 - 2)   | 242,7 (54 - 718)      | 156 (105 - 189)        | 556 (444 - 1117)      |
| <i>Dr</i> | 3,9 (1 - 7)                 | 1,3 (1 - 3)   | 9 (4 - 14)            | 13,5 (10 - 16)  | 244,1 (93 - 502)      | 146,3 (114 - 185)      | 507,6 (360 - 780)     |

### 3.5.2 Medvrstna parjenja

#### 3.5.2.1 Recipročno parjenje *A. aestuarina* x *A. bicincta*

Čeprav so vsi samci vrste *A. bicincta* izzvali oddajanje odzivnega napeva pri samicah *A. aestuarina* (AB križanje), je bil njihov uspeh pri lokalizaciji, in posledično tudi pri kopulaciji, značilno nižji (parna testa proporcev z Bonferronijevo korekcijo:  $P=0.0146$  oz.  $P=0.0045$ ) (slika 36). V recipročnem BA križanju so bili samci vrste *A. aestuarina* pri lokalizaciji in kopulaciji s samico druge vrste statistično značilno uspešnejši kot samci v BA križanju (Fisherjeva eksaktna testa:  $P=0.045$  oz.  $P=0.017$ ) (slika 36).



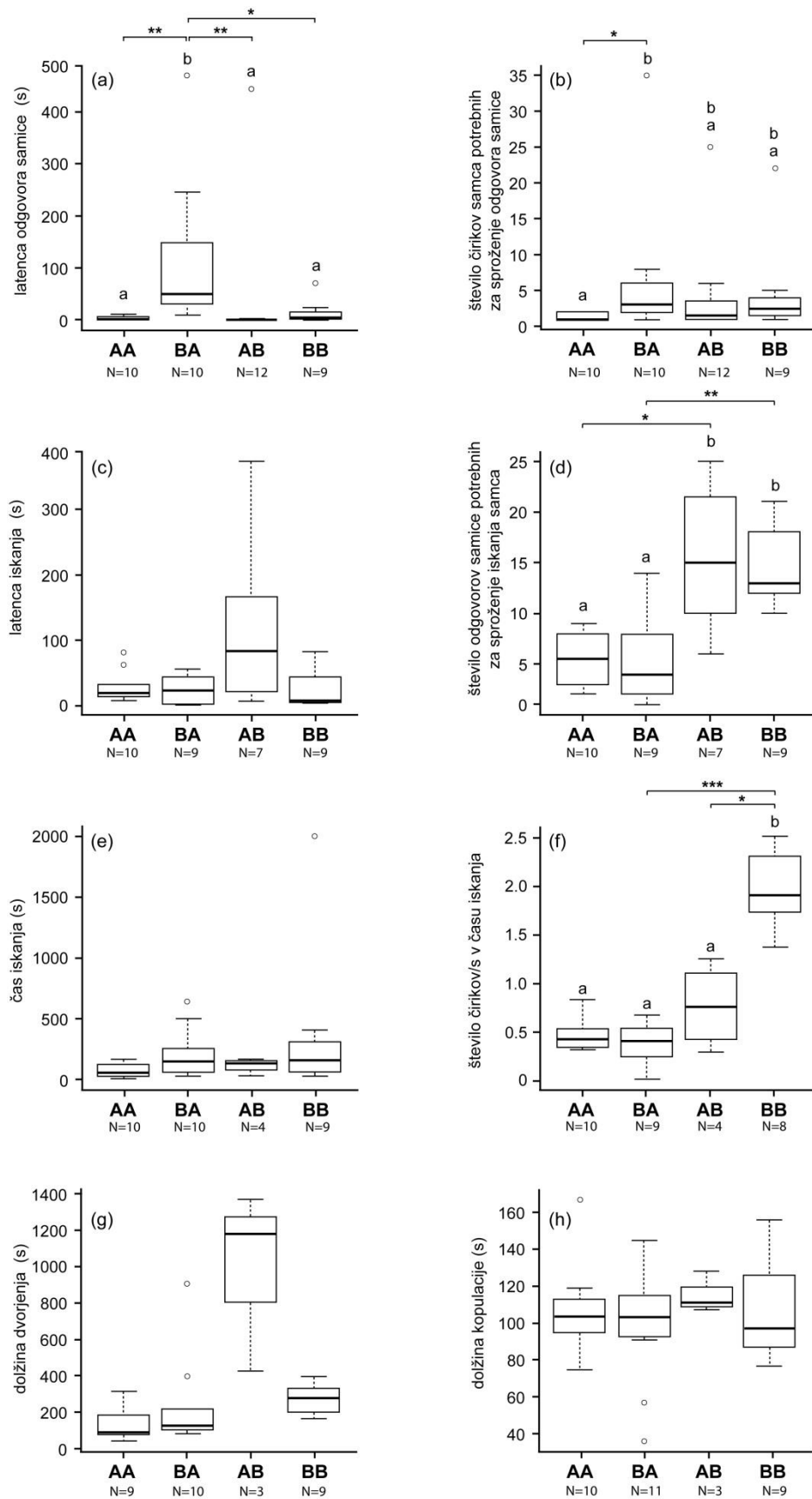
Slika 36: Uspeh medvrstnih parjenj med vrstama *A. aestuarina* in *A. bicincta* (Derlink in sod., 2014). Stolpci z različnimi črkami so statistično značilno različni (parna primerjava, test proporcev z Bonferronijevo korekcijo). \* $P < 0.5$ ; \*\* $P < 0.01$ .

Figure 36: Mating success in the heterospecific cross of *A. aestuarina* in *A. bicincta* (Derlink et al., 2014). Columns with different letters are significantly different (pairwise comparison, test of given proportions with Bonferroni correction). \* $P < 0.5$ ; \*\* $P < 0.01$ .

Natančna primerjava vedenjskih parametrov v znotrajvrstnih in medvrstnih križanjih je pokazala, da so v AB križanjih samice *A. aestuarina* odgovorile samcem *A. bicincta* enako hitro kot samcem lastne vrste (slika 37a, b). Čas, ki so ga samci *A. bicincta* potrebovali, da so pričeli z iskanjem *A. aestuarina* samic, je bil v splošnem daljši, vendar zelo variabilen, tako da statistični testi niso pokazali značilnih razlik v latenci iskanja med štirimi kombinacijami (slika 37c). Samci *A. bicincta* so potrebovali enako število odgovorov samice lastne ali tuje vrste, da so pričeli z iskanjem (slika 37d). Čeprav nismo zaznali učinka na čas iskanja (slika 37e), so ti samci oddali statistično značilno manj čirikov med iskanjem (slika 37f) in posledično prejeli tudi manj odgovorov samic (ni prikazano na sliki). V AB križanjih so samci dlje časa dvorili samici, čeprav testi niso pokazali značilnih razlik, kar je verjetno posledica nizkega

števila samcev, ki so našli samico (slika 37g). Čas kopulacije se ni razlikoval od znotrajvrstnega parjenja (slika 37h).





Slika 37: Vedenjski parametri znotrajvrstnih in medvrstnih parjenj vrst *A. aestuarina* in *A. bicincta* (Derlink in sod., 2014). AA, BB: znotrajvrstno parjenje *A. aestuarina* in *A. bicincta*. BA: medvrstno križanje, samica *A. bicincta* X samec *A. aestuarina*; AB: medvrstno križanje, samica *A. aestuarina* X samec *A. bicincta*. Okvirji z ročaji, označene z različnimi črkami, predstavljajo statistično značilne razlike (parna primerjava, Wilcoxon test rangov za večkratno primerjavo in Bonferronijevo korekcijo), \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ .

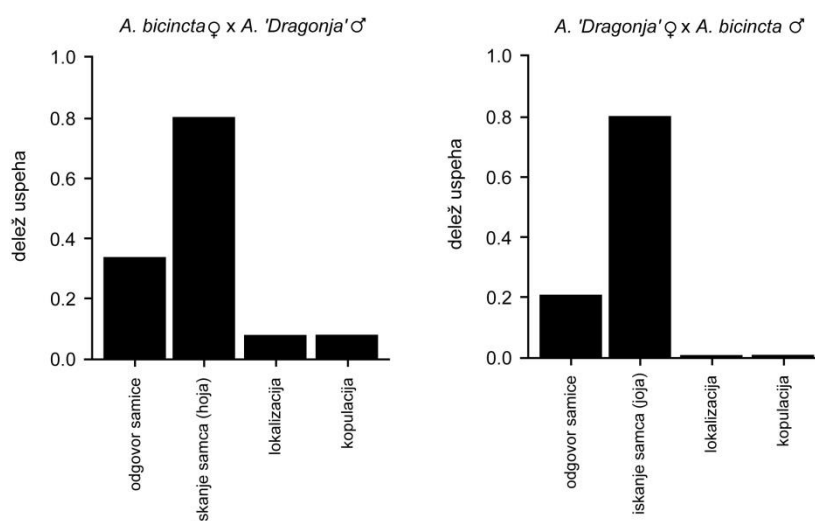
Figure 37: Behavioural parameters of conspecific and heterospecific mating experiments of *A. aestuarina* and *A. bicincta* (Derlink et al., 2014). AA, BB: conspecific mating of *A. aestuarina* and *A. bicincta*, respectively. BA: heterospecific cross *A. bicincta* female x *A. aestuarina* male; AB: cross *A. aestuarina* female x *A. bicincta* male. For each parameter, boxplot values with different letters are significantly different (pairwise comparison, Wilcoxon rang sum test for multiple comparison with Bonferroni correction), \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ .

Nasprotno pa so v BA križanjih samice vrste *A. bicincta* odgovorile samcem *A. aestuarina* značilno kasneje kot samcem lastne vrste (slika 37a) in da so prejeli odgovor samice, so *A. aestuarina* samci oddali značilno več čirikov kot v parjenjih s samicami lastne vrste (slika 37b) (parna primerjava deležev,  $P = 0,026$ ). Ostali vedenjski parametri se niso razlikovali od istovrstnih parjenj.

Rezultati parjenj kažejo, da so samice *A. aestuarina* rade odgovarjale na pozivni napev samcev *A. bicincta*. Kljub temu pa je bila verjetnost kopulacije značilno nižja zaradi porušanja kompleksne strukture vrstno-specifičnega dueta *A. bicincta*, saj samice *A. aestuarina* z dolgimi odgovori niso sledile hitremu ponavljalnemu času čirikov v pozivnem napevu samca *A. bicincta*. V teh AB križanjih so *A. bicincta* samci oddajali pozivne napeve z značilno nižjim številom čirikov (oz. dvojic) v Be1 delu napeva kot v istovrstnih parjenjih (povprečje  $\pm$  SD =  $2.9 \pm 1.7$  in  $18.4 \pm 8.8$ , Wilcoxonov test rangov,  $P < 0,05$ ), ker so bili pozivni napevi prekinjeni z dolgimi odgovori samic *A. aestuarina*.

### 3.5.2.2 Recipročno parjenje *A. bicincta* x *A. 'Dragonja'*

Uspeh obeh recipročnih križanj je bil zelo nizek, saj smo v obeh kombinacijah parjenj tega tipa zabeležili le eno kopulacijo med samico *A. bicincta* in samcem tipa *A. 'Dragonja'* (slika 38). Samice obeh vrst so slabo odgovarjale na pozivne napeve samcev druge vrste in v posameznih poskusih smo zabeležili največ pet odgovorov. Visok delež samcev, ki so v teh parjenjih hodili po rastlini, je verjetno posledica »let/skok-klic-hoja« strategije za povečanje signalizacijskega prostora (dosega signalov) in ne lokalnega iskanja samice. V edinem primeru, kjer sta samec in samica kopulirala, je samec samico našel povsem slučajno, saj mu samica ni odgovarjala.



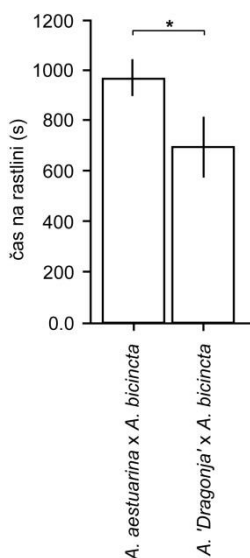
Slika 38: Uspeh medvrstnih parjenj med vrsto *A. bicincta* in tipom *A. 'Dragonja'*  
Figure 38: Mating success in the heterospecific cross of *A. bicincta* in *A. 'Dragonja'*

Da v recipročnih parjenjih med vrsto *A. bicincta* in tipom *A. 'Dragonja'* hoje po rastlini ne moremo enačiti z iskanjem samice, je razvidno iz števila samcev, ki so zapustili rastlino pred iztekom 20 minut, kolikor je trajal poskus (preglednica 10) in časa, ko so se ti samci zadrževali na rastlini (slika 39). V teh recipročnih parjenjih je več kot polovica samcev odšla z rastline pred koncem poskusa, medtem ko sta v parjenjih med *A. aestuarina* in *A. bicincta* rastlino zapustila le dva samca. Če med seboj primerjamo oba tipa medvrstnih križanj, je v parjenjih pri katerih ni prišlo do kopulacije, v obeh recipročnih križanjih med *A. bicincta* in *A. 'Dragonja'* z rastline odšlo statistično značilno več samcev (test proporcev,  $P = 0,0076$ ). Tudi čas, ko so se samci, ki v poskusu niso kopulirali, zadrževali na rastlini, je bil v slednjih križanjih značilno krajši, ne glede na to, da črna detelja ni gostiteljska rastlina vrste *A. aestuarina*.

Preglednica 10: Rezultati zadrževanja samcev in samic na rastlini v poskusih medvrstnih križanj med *A. bicincta* in *A. 'Dragonja'*, ki se niso končali s kopulacijo. DrB - cross *A. bicincta* female x *A. 'Dragonja'* male, BDr - cross *A. 'Dragonja'* female x *A. bicincta* male, BA – cross *A. aestuarina* female x *A. bicincta* male, AB – cross *A. bicincta* female x *A. aestuarina* male

Table 10: Results of male and female staying on the plant in heterospecific crosses that finished without mating. DrB - cross *A. bicincta* female x *A. Dragonja* male, BDr - cross *A. 'Dragonja'* female x *A. bicincta* male, BA – cross *A. aestuarina* female x *A. bicincta* male, AB – cross *A. bicincta* female x *A. aestuarina* male

| Križanje   | Št križanj brez kopulacije | Št prekinjenih poskusov (poskusov daljših od 20 min) | Št samcev, ki zapusti rastlino | Št samic, ki zapusti rastlino |
|------------|----------------------------|--|--------------------------------|-------------------------------|
| <b>DrB</b> | 15                         | 5  | 10                             | 0                             |
| <b>BDr</b> | 14                         | 5  | 9                              | 0                             |
| <b>BA</b>  | 4                          | 2  | 1                              | 1                             |
| <b>AB</b>  | 9                          | 7  | 1                              | 1                             |



Slika 39: Čas, ki so ga na rastlini preživeli samci, ki so sodelovali v križanjih *A. aestuarina* x *A. bicincta* ter *A. 'Dragonja'* x *A. bicincta* in se niso zaključili s kopulacijo. (Wilcox test rangov, P - vrednost = 0,0439). \* $P < 0,05$

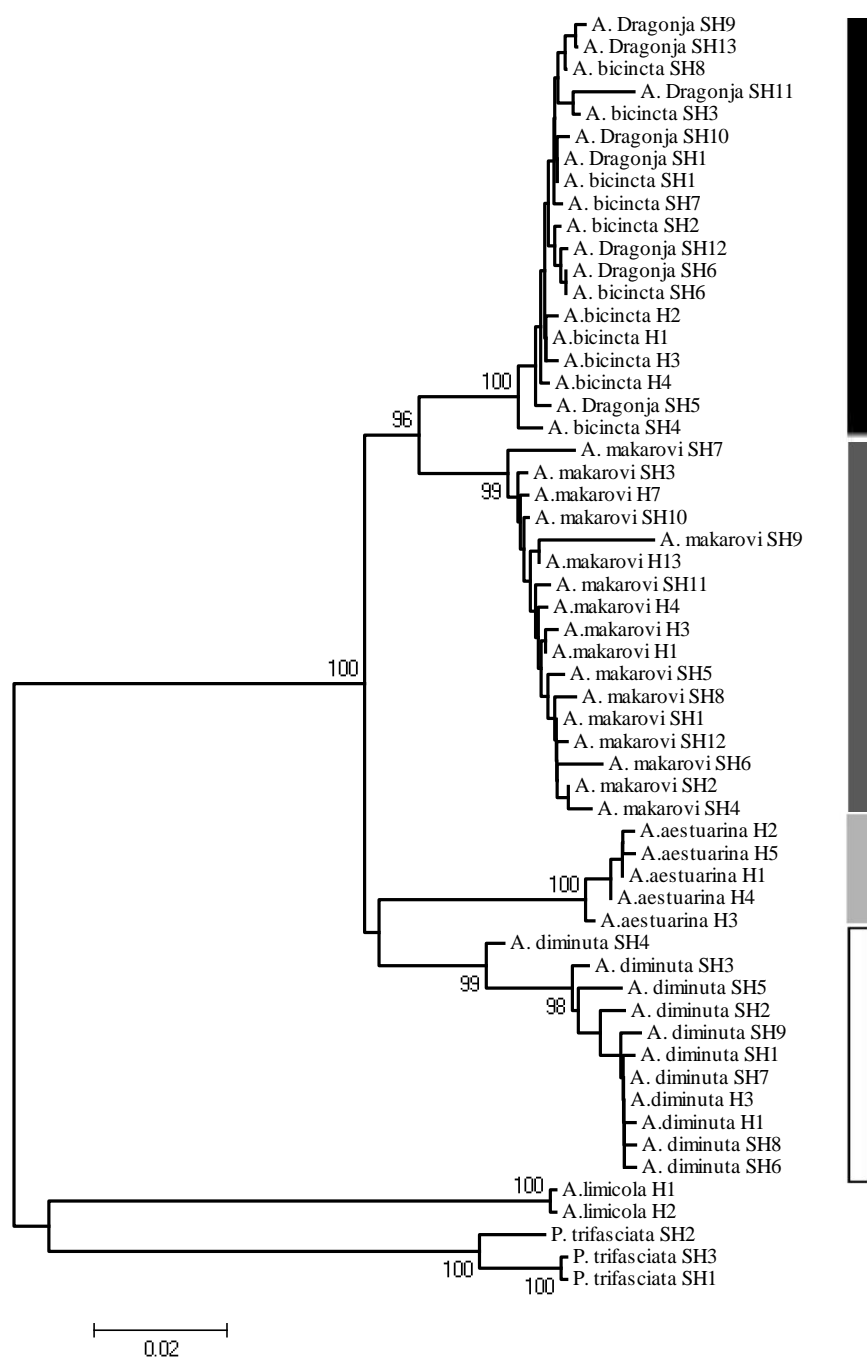
Figure 39: Time that the males from crossings *A. aestuarina* x *A. bicincta* and *A. 'Dragonja'* x *A. bicincta* spend on the plant in the trials that did not finish with copulation. (Wilcoxon rank sum test, P - value = 0,0439). \* $P < 0,05$

### 3.6 GENETSKE ANALIZE

#### 3.6.1 Fragment COI

Filogenetska analiza je pokazala štiri dobro ločene gruče, v isto skupino pa so se uvrstili osebki *A. bicincta* in *A. 'Dragonja'* (slika 40). Skupaj je bilo v analizo vključenih 52 haplotipov 88 osebkov rodu *Aphrodes*: 17 haplotipov vrste *A. makarovi*, 5 haplotipov vrste *A. aestuarina* in 11 haplotipov vrste *A. diminuta*, od zadnjih so imeli angleški in slovenski vzorci en skupen haplotip. Med osebki skupine *A. bicincta* smo našli 4 angleške haplotipe *A. bicincta*, 7 haplotipov slovenskih vzorcev *A. bicincta* in 8 haplotipov *A. 'Dragonja'*. Slovenski vzorci *A. bicincta* in *A. 'Dragonja'* so si delili 2 skupna haplotipa, ki sta predstavljalata kar 58 % vseh vključenih slovenskih vzorcev.

Znotrajvrstne razlike med sekvencami v rodu *Aphrodes* so znašale od 0,41 do 0,92 %, medvrstne razlike v rodu *Aphrodes* pa od 4,29 do 7,05 % (preglednica 11). Razlika med sekvencami med vrstami rodu *Aphrodes* in dvema vrstama poddružine Aphrodinae je bilo veliko višje in je znašalo med 15,17 in 17,54 %.



Slika 40: Filogenetsko drevo po metodi združevanja sosedov in dvoparametričnim modelom zamenjav po Kimuri (Kimura 1980) za 600 bp dolg COI fragment za 52 haplotipov osebkov rodu *Aphrodes* (prirejeno po Bluemel in sod., 2014). Prikazane so samo *bootstrap* podpore višje od 90 %. Drevo je zakoreninjeno z vrstama *Anoscopus limicola* in *Planaphrodes trifasciata* (Cicadellidae: Aphrodinae). Skala predstavlja 0,02 zamenjave na mesto. H in SH predstavljajo haplotipe nabrane v Veliki Britaniji oziroma v Sloveniji.  
 Figure 40: Neighbour joining phylogeny using Kimura 2-paramter distances (Kimura 1980) for 600 bp of COI gene for 52 haplotypes from specimens of the genus *Aphrodes* (modified from Bluemel et al., 2014). Bootstrap support values greater than 90 % are shown above the branches. The phylogram is rooted in two aphrodine species *Anoscopus limicola* and *Planaphrodes trifasciata* (Cicadellidae: Aphrodinae). The scale bar represents 0,02 substitutions per site. H, SH indicate hpylotypes found in individuals collected in Uk and Slovenia, respectively.

Preglednica 11. Povprečna razlika med sekvencami znotraj štirih vrst rodu *Aphrodes* in tipom *A. 'Dragonja'* (zgornja diagonala) ter med štirimi vrstami, tipom *A. 'Dragonja'* in še dvema vrstama iz družine Aphrodinae *Anoscopus limicola* in *Planaphrodes trifasciata* (pod diagonalo) izračunano z dvoparametričnim modelom zamenjav po Kimuri (prirejeno po Bluemel in sod., 2014).

Tabel 11: Average percentage sequence divergence within four *Aphrodes* species and *A. 'Dragonja' type* (above diagonal) and between the four species, *A. 'Dragonja' type* and two aphrodinae species *Anoscopus limicola* and *Planaphrodes trifasciata* (below diagonal) based on Kimura-2-parameter distance measure (modified from Bluemel et al., 2014).

| Razdalja med sekvencami (%) - Dvoparametrični model zamenjav po Kimuri |          |          |          |           |          |                    |                       |
|--|----------|----------|----------|-----------|----------|--------------------|-----------------------|
|  | <i>A</i> | <i>B</i> | <i>D</i> | <i>Dr</i> | <i>M</i> | <i>A. limicola</i> | <i>A. trifasciata</i> |
| <i>A</i>   | 0,41     |          |          |           |          |                    |                       |
| <i>B</i>   | 6,79     | 0,51     |          |           |          |                    |                       |
| <i>D</i>   | 7,05     | 6,49     | 0,92     |           |          |                    |                       |
| <i>Dr</i>  | 6,88     | 0,65     | 6,78     | 0,79      |          |                    |                       |
| <i>M</i>   | 6,8      | 4,29     | 7        | 4,54      | 0,86     |                    |                       |
| <i>A. limicola</i>   | 17,1     | 16,45    | 16,17    | 16,6      | 16,83    | 0,2                |                       |
| <i>A. trifasciata</i>  | 17,18    | 16,61    | 17,54    | 16,58     | 15,93    | 15,17              | 1,6                   |

### 3.6.2 Mikrosateliti

Preliminarno smo okarakterizirali mere genetske raznolikosti dvanajstim mikrosatelitnim markerjem na 22 osebkih (preglednica 12). Na vseh lokusih smo dobili skupaj 72 različnih alelov. Povprečno število alelov na lokus je 6 (3 -12 / lokus). Največ alelov je imel lokus INNBD\_\_N. Najbolj informativen je bil lokus IDLNS\_M z 11 aleli. Pričakovana heterozigotnost je med 0,130 in 0,864, s povprečno vrednostjo 0,626. Vrednosti opažene heterozigotnosti po lokusih so med 0,555 in 1, s povprečno vrednostjo 0,837, ki je pri devetih lokusih višja od pričakovane heterozigotnosti. Večina lokusov ima opaženo heterozigotnost  $H_0$  nad 0,6. Za lokusa 2404A\_K in H0B37\_B je bila ta vrednost nižja. Povprečna informacijska vrednost polimorfizma (PIC) je 0,574, z vrednostmi med 0,127 in 0,85. Najnižjo povprečno informacijsko vrednost ima marker H0B37\_B. Prve analize informativnosti genskih markerjev se je izkazala za dobro, saj je skupna verjetnost enakosti genotipov (PI) nizka,  $6,377746 \times 10^{-10}$ . Najmanj informativni lokus H0B37\_B bi v nadaljnjih analizah lahko izpustili.

Preglednica 12: Parametri variabilnosti po posameznih mikrosatelitnih lokusih. Prikazani so pričakovana dolžina motiva (dolžina glede na pirosekvenirane sekvence / dolžina skupaj z 18 bp dolgim fluorescentnim repom) in dejansko število alelov (N), razpon dolžin alelov (Ra), pričakovana heterozigotnost (He), dejanska heterozigotnost (Ho), frekvenca ničtih alelov (No), verjetnost enakosti genotipov (PI) in informacijska vrednost polimorfizma (PIC).

Table 12: The parameters of variability for the selected microsatellite loci. Expected length of motif (length according to pyrosequencing / length with 18bp fluorescent tail), number of alleles (N), range of allele lengths (Ra), expected heterozygosity (He), observed heterozygosity (Ho), frequency of null alleles (No), probability of identity (PI), polymorphic information content (PIC)

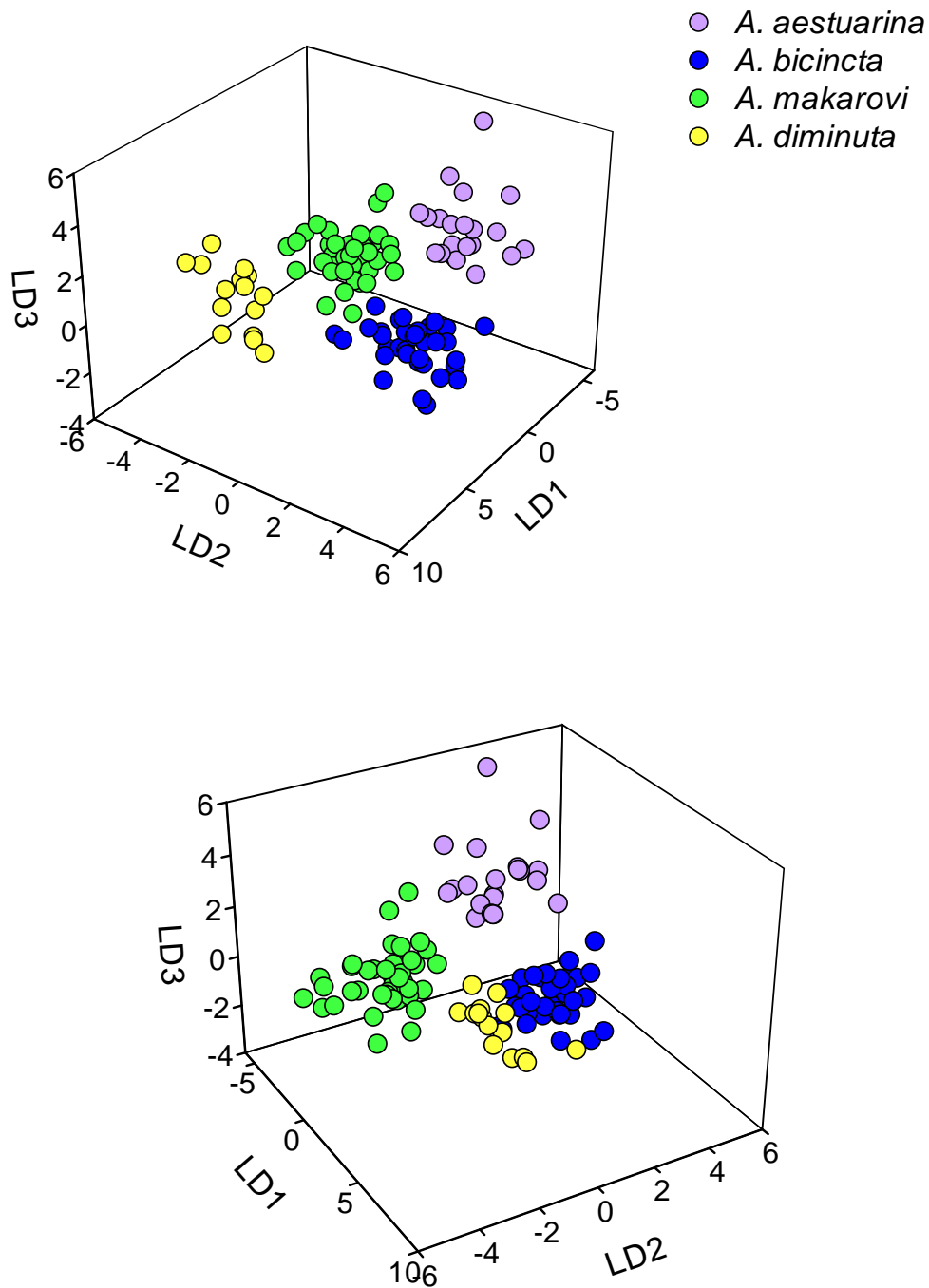
| Lokus     | Pričakovana dolžina (bp) | N  | Ra (bp) | He    | Ho    | No     | PI                           | PIC   |
|-----------|--------------------------|----|---------|-------|-------|--------|------------------------------|-------|
| IME8_E    | 204 / 222                | 4  | 211-223 | 0,668 | 0,636 | 0,0192 | 0,178                        | 0,601 |
| IMIIN_F   | 255 / 273                | 4  | 253-268 | 0,598 | 1     | -0,251 | 0,246                        | 0,514 |
| H4CVH_I   | 133 / 151                | 8  | 129-175 | 0,68  | 1     | -0,189 | 0,146                        | 0,637 |
| 2404A_K   | 410 / 428                | 4  | 355-439 | 0,668 | 0,555 | 0,0675 | 0,171                        | 0,607 |
| H5SU6_L   | 227 / 245                | 6  | 219-259 | 0,679 | 1     | -0,191 | 0,158                        | 0,625 |
| IDLNS_M   | 304 / 322                | 11 | 320-362 | 0,864 | 0,95  | -0,046 | 0,032                        | 0,85  |
| INNBD_N   | 205 / 223                | 12 | 189-263 | 0,71  | 1     | -0,169 | 0,104                        | 0,69  |
| H4CII_R   | 196 / 214                | 7  | 186-206 | 0,766 | 0,857 | -0,051 | 0,086                        | 0,735 |
| GR1222_Z  | 90 / 108                 | 3  | 85-89   | 0,616 | 0,955 | -0,209 | 0,222                        | 0,542 |
| H0B37_B   | 223 / 241                | 4  | 241-257 | 0,13  | 0,136 | -0,005 | 0,759                        | 0,127 |
| 0763A_D   | 169 / 187                | 6  | 183-200 | 0,581 | 1     | -0,265 | 0,261                        | 0,495 |
| H948R_U   | 260 / 278                | 3  | 274-290 | 0,555 | 0,955 | -0,257 | 0,294                        | 0,459 |
| Skupaj    |                          | 72 |         |       |       |        | 6,378 x<br>10 <sup>-10</sup> |       |
| Povprečje |                          | 6  |         | 0,626 | 0,837 |        |                              | 0,574 |

### 3.7 MORFOMETRIČNE ANALIZE

#### 3.7.1 Samci

Razponi izmerjenih in izračunanih vrednosti morfoloških znakov za vsako vrsto so podani v slikah v prilogah C, D, F in G. V splošnem so bili osebki iz Slovenije večji kot škržatki iste vrste nabrani v Veliki Britaniji. Za vse morfološke znake velja, da se vrednosti prekrivajo vsaj med dvema vrstama. LDA na osnovi 14 znakov na telesu in aedeagusu razvrsti samce vrst *A. aestuarina*, *A. bicincta*, *A. diminuta* in *A. makarovi* v štiri jasno ločene skupine, ki se ujemajo z vrstno pripadnostjo določeno na osnovi pozivnih napevov in/ali sekvenc COI (slika 41).

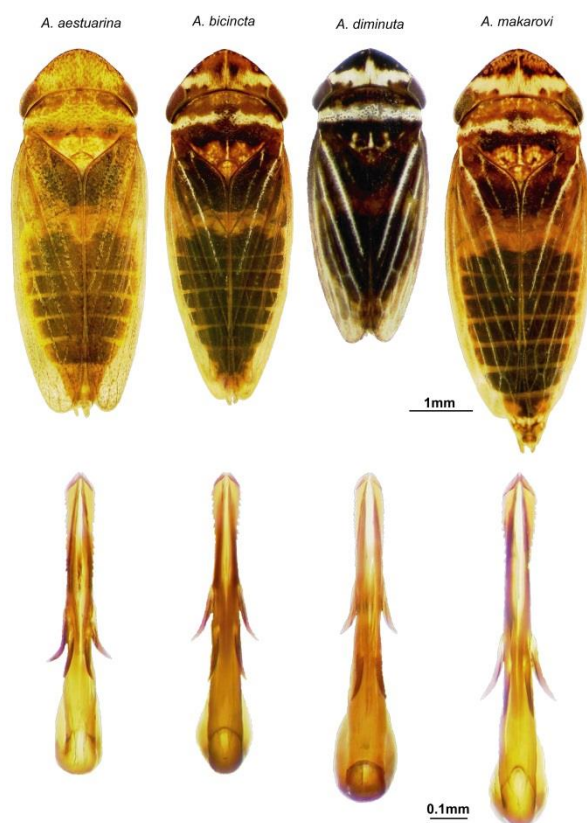
Najbolj informativen morfološki znak je bilo razmerje med dolžino telesa in dolžino aedeagusa ( $a/a_1$ ), na osnovi katerega je možno ločiti samce *A. diminuta* od ostalih vrst. Samci te vrste imajo glede na dolžino telesa sorazmerno najdaljši aedeagus, katerega deblo je v stranskem pogledu ravno (sliki 42 in 43).



Slika 41: Linearna diskrimantna analiza na osnovi 14 morfoloških znakov za samce štirih vrst (prirejeno po Bluemel in sod., 2014)

Figure 41: Linear discriminant analysis based on 14 morphological characters for males of four species (modified from Bluemel et al., 2014)





Slika 42: Telo samcev in aedeagusi s frontalne strani štirih vrst rodu *Aphrodes* (Bluemel in sod., 2014)  
Figure 42: Frontal view of the male body and aedeagus of four *Aphrodes* species (Bluemel et al., 2014)



Slika 43: Lateralni pogled na aedeaguse vseh štirih vrst rodu *Aphrodes* (Bluemel in sod., 2014)  
Figure 43: Lateral view on aedeagus of four *Aphrodes* species (Bluemel et al., 2014)

Dober informativni znak je bila tudi relativna lega zgornjega para trnov na deblu (razmerje a1/c2). Pri vrsti *A. makarovi* se zgornji par trnov v splošnem nahaja na deblu nižje kot pri drugih vrstah in deblo je tudi značilno upognjeno (sliki 42 in 43).

Samci vrste *A. aestuarina* imajo glede na dolžino telesa sorazmerno daljša krila in krajši aedeagus (slika 42).

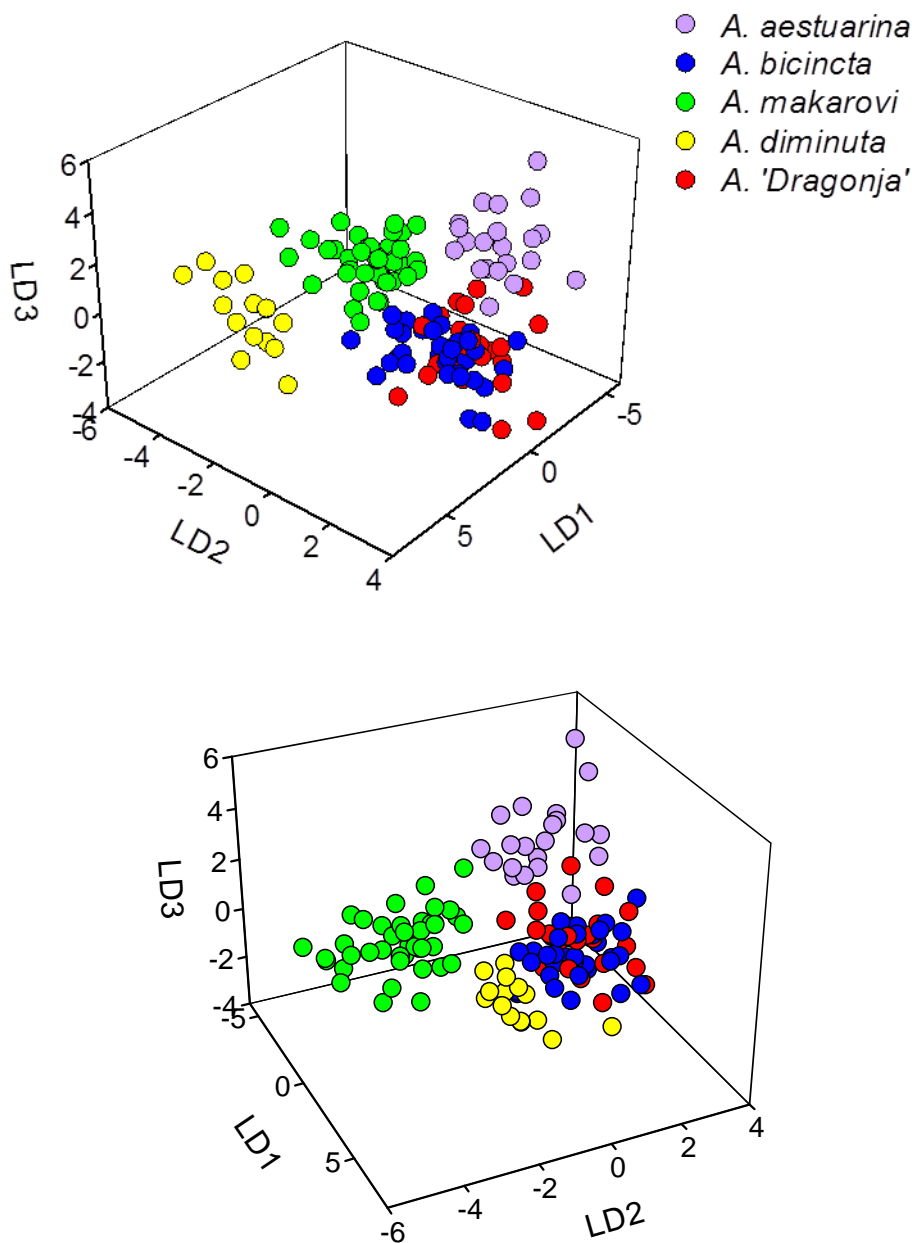
Vrednosti vseh morfoloških znakov pri samcih vrste *A. bicincta* se prekrivajo z vrednostmi vrste *A. aestuarina*. Od vrste *A. aestuarina* se ta vrsta v splošnem morfološko loči predvsem po krajših krilih, ožji bazi debela aedeagusa ter daljši razdalji med vrhoma zgornjega in spodnjega para trnov (slika 42). V stranskem pogledu je deblo aedeagusa rahlo upognjeno le na vrhu (slika 43).

### 3.7.1.1 Samci tipa *A. 'Dragonja'*

Telo in aedeagus samca tipa *A. 'Dragonja'* sta prikazana na sliki 44. Vrednosti vseh morfoloških znakov samcev tipa *A. 'Dragonja'* se tesno prekrivajo z vrednostmi vrste *A. bicincta* ter tudi vrste *A. aestuarina* (slika 44). Ko smo v LDA analizo vključili še samce tipa *A. 'Dragonja'* so se le-ti razvrščali skupaj s samci vrste *A. bicincta* in tudi vrste *A. aestuarina* (slika 45) (priloge H, I, J). Napačno je bilo razvrščenih 11 (42 %) samcev tipa *A. 'Dragonja'*. Hkrati se je 1 samec vrste *A. aestuarina* (4,8 %) ter 6 (18,8 %) samcev vrste *A. bicincta* uvrstilo v tip *A. 'Dragonja'*.



Slika 44: Telo samca tipa *A. 'Dragonja'* in aedeagus (frontalno in od strani). *A. 'Dragonja'* je podobna preostalim štirim vrstam  
Figure 44: Male body of *A. 'Dragonja'* type and aedeagus (frontal and later view). *A. 'Dragonja'* is similar to the four recognized species

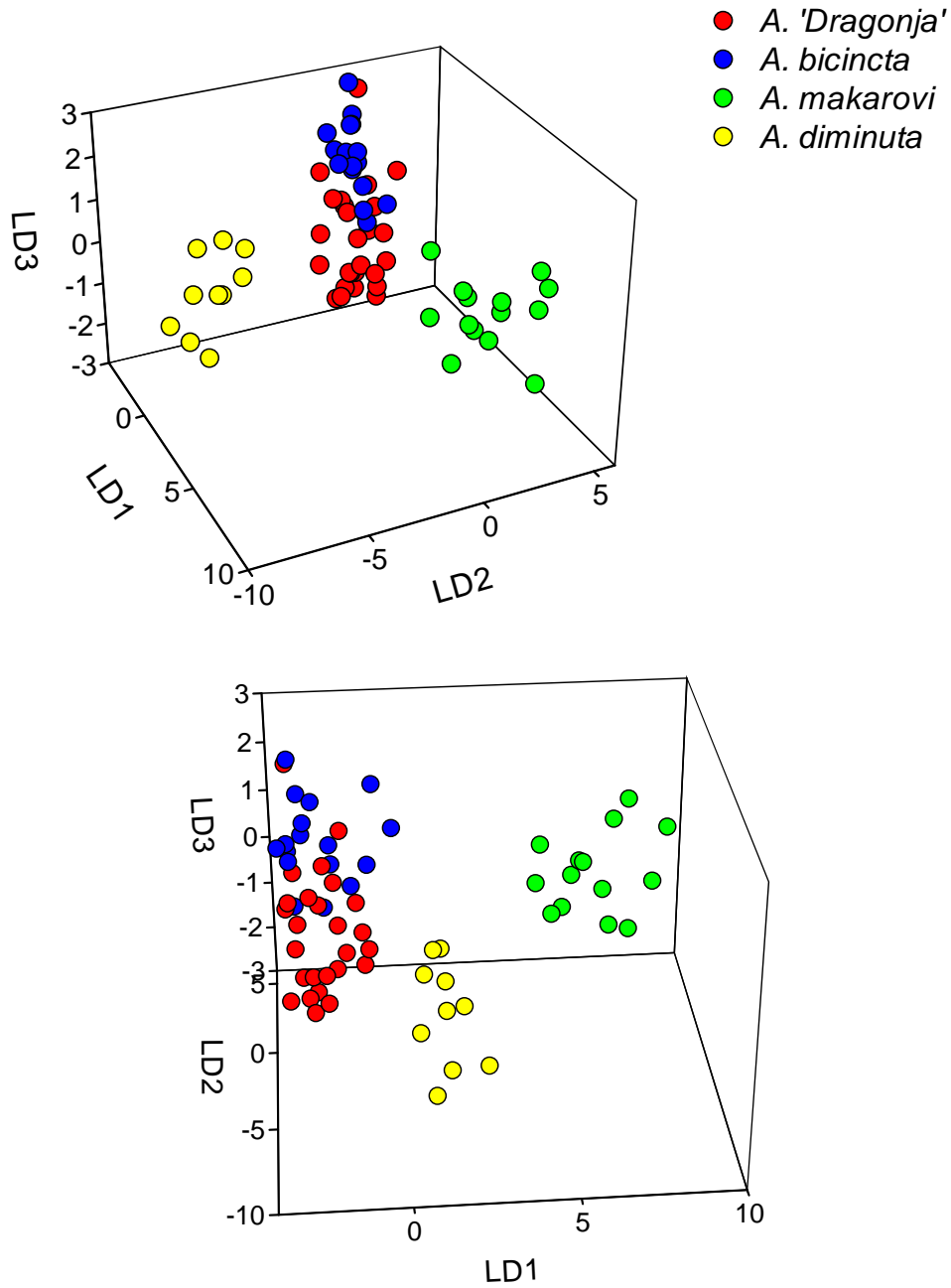


Slika 45: Linearna diskrimantna analiza na osnovi 14 morfoloških znakov za samce štirih vrst in tip *'Dragonja'*

Figure 45: Linear discriminant analysis based on 14 morphological characters of four species and *A. 'Dragonja'* type

Na osnovi LDA v katero so bili vključeni samo osebki in vrste oz. tipi iz Slovenije (slika 46) so bili napačno razvrščeni le še 4 (15,4 %) samci tipa *A. 'Dragonja'*, ki bili vsi vključeni v skupino *A. bicincta*. Štirje samci (23,5 %) vrste *A. bicincta* iz Slovenije so se uvrstili v tip *A. 'Dragonja'*. LDA slovenskih osebkov nakazuje delno oddaljevanje tipa *A. 'Dragonja'* od vrste *A. bicincta*. Od slednjih imajo samci tipa *A. 'Dragonja'* v

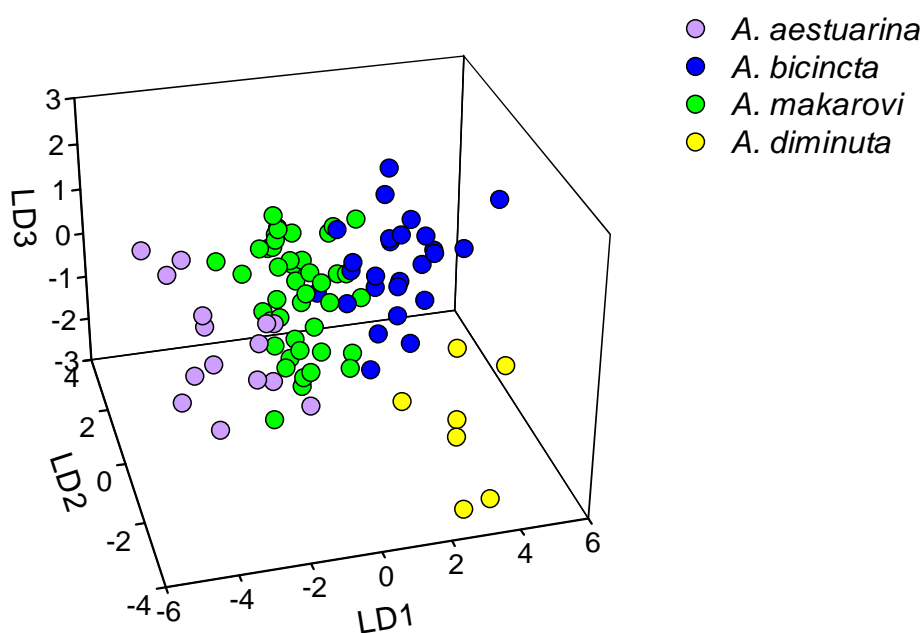
splošnem nekoliko krajšo glavo ter bolj variabilno razdaljo med vrhoma zgornjega in spodnjega para trnov.



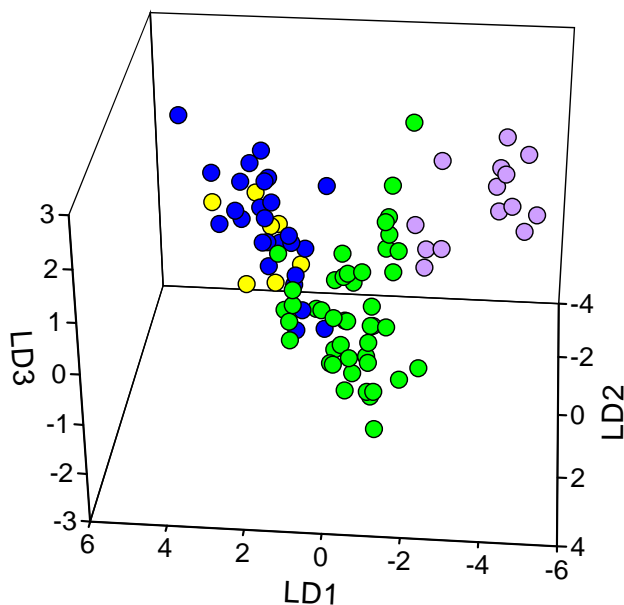
Slika 46: Linearna diskriminantna analiza 14 morfoloških znakov za samce štirih vrst in *A. 'Dragonja'* nabrane samo v Sloveniji  
Figure 46: Linear discriminant analysis of 14 morphometric characters of males of the four species and *A. 'Dragonja'* type collected only in Slovenia

### 3.7.2 Samice

Večina morfoloških znakov telesa ima visoko medsebojno korelacijo in za večino telesnih znakov samic velja, da se vrednosti med vsemi vrstami oz. tipi prekrivajo (prilogi E in H). LDA je pri samicah temeljila na sedmih telesnih razmerjih in analize niso omogočile jasnega razlikovanja med vrstami (slika 47). V analizi, ki je vključevala osebke štirih vrst iz Velike Britanije in Slovenije, je bilo napačno razvrščenih 8 (8,7 %) samic. Večina od teh (5 osebkov) so bile samice vrste *A. bicincta* uvrščene med *A. makarovi*, kar predstavlja 19 % vseh samic te vrste vključenih v analizo. Najbolj informativna telesna znaka sta bila velikost ter razmerje med dolžinama telesa in kril. Samice vrste *A. diminuta* so bile najmanjše, medtem ko so samice vrste *A. aestuarina* na splošno imele najožje telo (najvišje razmerje a/f) in sorazmerno najdaljša krila (razmerje a/w) (slika 48).



Slika 47 se nadaljuje na naslednji strani



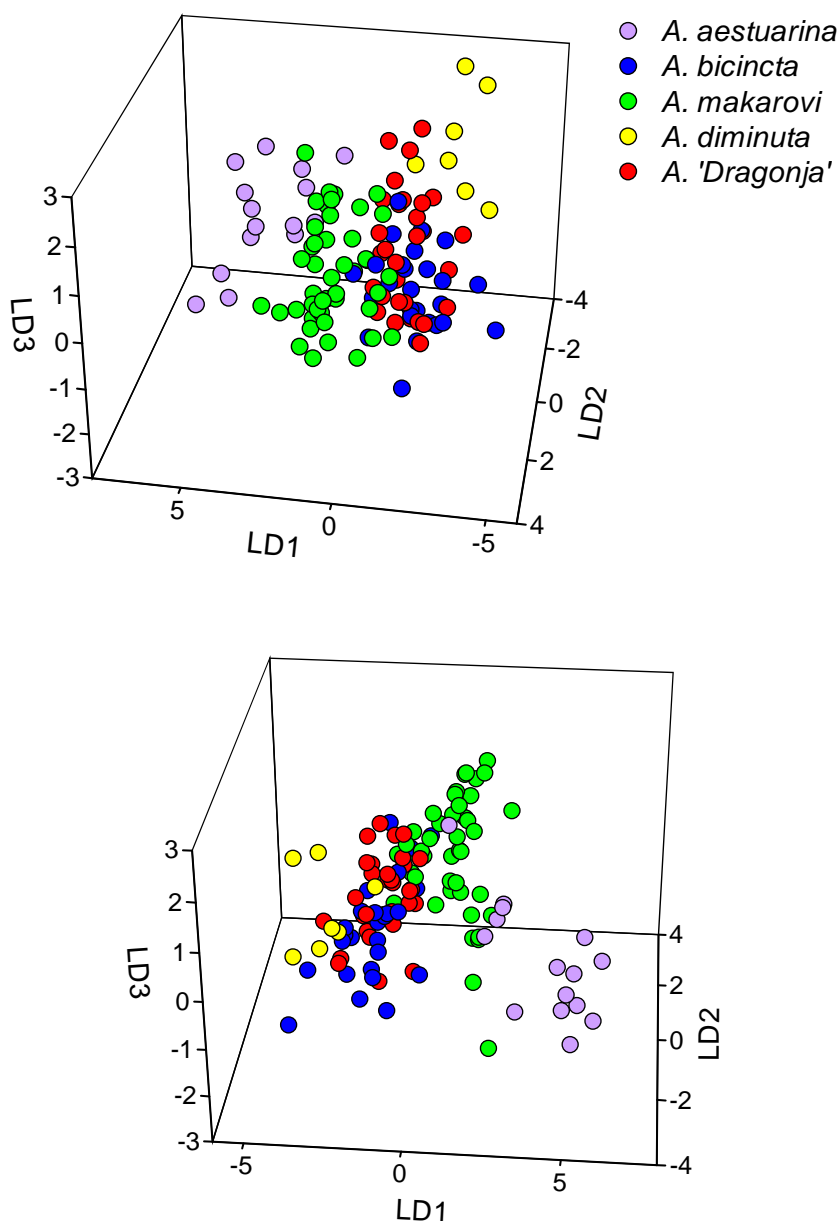
Slika 47: Linearna diskriminantna analiza na osnovi 7 morfoloških znakov za samice štirih vrst rodu *Aphrodes* (prirejeno po Bluemel in sod., 2014)  
Figure 47: Linear discriminant analysis based on 7 morphological characters of four species of the genus *Aphrodes* (modified by Bluemel et al., 2014)



Slika 48 Samice vseh štirih vrst rodu *Aphrodes* in tipa *A. 'Dragonja'* (prirejeno po Bluemel in sod., 2014)  
Figure 48: Females of four *Aphrodes* species and *A. 'Dragonja'* type (modified by Bluemel et al., 2014)

Vrednosti vseh morfoloških znakov samic tipa *A. 'Dragonja'* se tesno prekrivajo z vrednostmi vrste *A. bicincta* in tudi ostalih vrst (sliki 49 in 50) (priloga K). Ko smo v

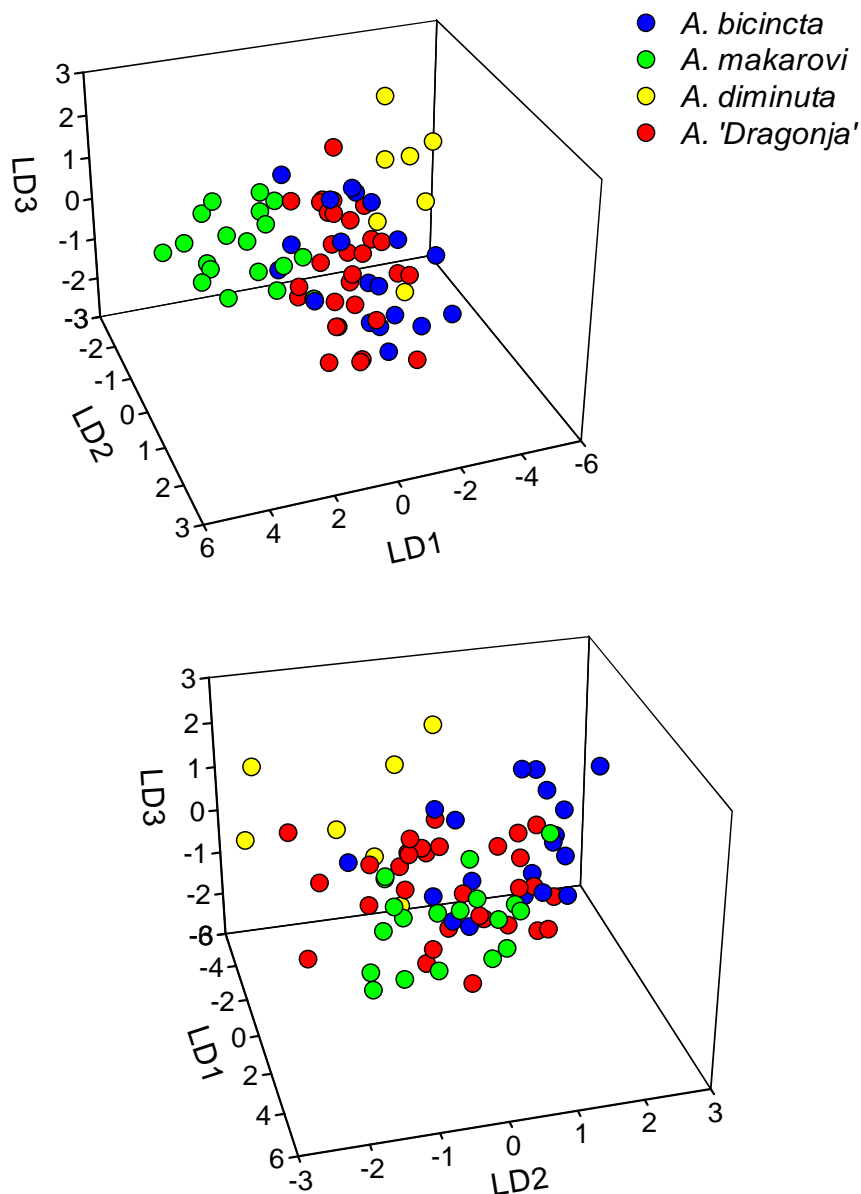
LDA analizo vključili še samice tipa *A. 'Dragonja'*, je delež napačno uvrščenih osebkov narasel na 23,6 % (29 samic). Osebkji tipa *A. 'Dragonja'* so bili uvrščeni med vse vrste in hkrati so se samice vseh ostalih vrst uvrščale v tip *A. 'Dragonja'*. Ne glede na to pa je bil visok delež napačno uvrščenih osebkov v glavnem posledica medsebojno napačno uvrščenih samic *A. bicincta* in tipa *A. 'Dragonja'* (17 samic). Skupno je bilo napačno razvrščenih 11 (42 %) samic vrste *A. bicincta* ter 11 (35,5 %) samic tipa *A. 'Dragonja'*.



Slika 49: Linearna diskriminantna analiza na osnovi 7 morfoloških znakov za samice štirih vrst rodu *Aphrodes* in tipa *A. 'Dragonja'*

Figure 49: Linear discriminant analysis based on 7 morphological characters of four species of the genus *Aphrodes* and *A. 'Dragonja'* type

Na osnovi LDA v katero so bili vključeni zgolj osebki in vrste oz. tipi iz Slovenije (slika 50) je ostal delež napačno uvrščenih samic praktično enak (23,4 %). Tudi v tem primeru so bili osebki tipa A. 'Dragonja' uvrščeni med ostale tri vrste in hkrati so bile samice teh vrst uvrščene v tip A. 'Dragonja'. Ponovno je bilo največ napačno razvrščenih samic vrste A. *bicincta* (45 %) in od teh 9 samic so bile vse razen ene uvrščene v tip A. 'Dragonja'. Napačno razvrščenih je bilo 16 % samic tipa A. 'Dragonja' in od teh 5 samic so bile tri uvrščene v vrsto A. *bicincta*.



Slika 50: Linearna diskriminantna analiza na osnovi 7 morfoloških znakov za vse samice iz rodu *Aphrodes* nabrane samo v Sloveniji

Figure 50: Linear discriminant analysis based on 7 morphological characters for all females of the genus *Aphrodes* collected only in Slovenia



## 4 RAZPRAVA

### 4.1 RAZŠIRJENOST ŠKRŽATKOV RODU *APHRODES*

Po obširnem vzorčenju po Sloveniji se je pokazalo, da so škržatki rodu *Aphrodes* široko razširjeni. Presentljivo pogosti so bili tudi leta 2004 prvič opisani osebki tipa *A. 'Dragonja'* (Virant-Doberlet, 2006b). Našli smo jih v južni, zahodni in severozahodni Sloveniji. Na vzhodu smo zaradi oddaljenosti vzorčili manj in zato nam pojavljanje rodu *Aphrodes* v tem delu Slovenije ni dobro poznano, vendar so vsi tam nabrani osebki pripadali vrsti *A. makarovi* (slika 9). Škržatke smo relativno lahko našli na ekstenzivnih travnikih, medtem ko jih je bilo na intenzivnih površinah malo ali nič.

Dejstvo, da se škržatki ne pojavljajo samo simpatrično temveč tudi sintopično je razlog, da morfološke analize v preteklosti niso ustrezno razvrstile vrst. Bluemel in sod. (2011) tako poročajo o visokem številu napačno identificiranih osebkov v muzejskih zbirkah, tudi o treh napačno določenih sintipskih primerkih za vrsto *A. aestuarina*. Na sedmih lokacijah smo našli po tri tipe napevov, od tega so bile na šestih lokacijah prisotne vrste *A. makarovi*, *A. bicincta* in *A. 'Dragonja'*, v preostalem primeru pa se je namesto *A. bicincta* pojavila *A. diminuta*. V vseh primerih se je na lokacijah z dvema tipoma napevov pojavila *A. makarovi* in to v vseh možnih kombinacijah. *A. makarovi* smo tudi edino našli na veliki koprivi (*Urtica dioica*). Skupaj z *A. aestuarina* pa se ta vrsta v Angliji pojavlja tudi na slanih naplavnih nižinah (Bluemel in sod., 2012, 2014). *A. diminuta* smo v Sloveniji popisali prvič (Seljak, 2004; Holzinger in Seljak, 2001), našli pa smo jih samo na nekaj višje ležečih lokacijah (preglednica 1). *A. 'Dragonja'* in *A. bicincta* smo našli skupaj na šestih od 81 lokacij, v glavnem na Primorskem (v Potočah pod Jezerskim na Gorenjskem smo poleg več *A. bicincta* našli tudi en osebek tipa *A. 'Dragonja'*) (slika 9).

### 4.2 VLOGA VIBRACIJSKIH SIGNALOV PRI NASTANKU IN VZDRŽEVANJU REPRODUKTIVNE IZOLACIJE V RODU *APHRODES*

Najpogostejši sistem opisan v zvočni komunikaciji je, da so med ozko sorodnimi vrstami žab (npr. Ryan in Rand, 1995) in žuželk (npr. den Bieman, 1986; Mendelson in Shaw, 2002; Cocroft in sod., 2010) pozivni napevi samcev variacije istega splošnega vzorca. Raziskave teh sistemov so pokazale, da se samice teh vrst raje približajo (Ryan in Rand, 1995; Mendelson in Shaw, 2002) ali bolje odgovarjajo (de Winter in Rollenhagen, 1990; Rodríguez in sod., 2004) samcem lastne vrste. Ker je v raziskavah nastanka vrst nastanek reproduktivne izolacije deležen izjemne pozornosti, ni presenetljivo, da so bili primeri, v katerih naj bi samice razlikovale med podobnimi napevi, deležni večje pozornosti kot tisti, pri katerih se napevi samcev izrazito ločijo med sabo. Čeprav naj bi predparitvena reproduktivna izolacija temeljila predvsem na

preferenci in izbiri samic (Kokko in sod., 2006), je v paritvenih sistemih, kjer si samec in samica izmenjujeta vrstno- in spolno-specifične napeve, prepoznavanje partnerja lahko tudi obojestransko (Servedio, 2007; Kozak in sod., 2009). Velike razlike v pozivnih napevih samcev med ozko sorodnimi vrstami v rodu *Aphrodes* omogočajo raziskave vloge zvočnih signalov v sistemu, ki se razlikuje od sedaj opisanih saj je zasnovan na duetu in v katerem prepoznavanje partnerjev temelji na zelo različnih pozivnih napevih samcev in podobnih odzivnih napevih samic.

#### 4.2.1 Primer vrst *A. aestuarina* in *A. bicincta*

Naši rezultati so pokazali, da čeprav se samice v splošnem bolje odzivajo na pozivne napeve samcev lastne kot na katerikoli napev tuje vrste, imajo pozivni napevi, ki jih sestavljajo podobni elementi, le omejeno vlogo pri vzdrževanju predparitvene reproduktivne izolacije. To je v skladu z našo hipotezo, da odzivnost samice odraža nivo podobnosti med elementi prisotnimi v pozivnih napevih samcev. Poleg tega so se, z izjemo samic vrste *A. aestuarina* pri kateri imajo samci najmanj kompleksen pozivni napev, samice odzivale na izolirane elemente lastne vrste ali na njihovo kombinacijo, enako dobro kot na celoten napev. Podoben primer so opisali pri škržatku *Graminella nigrifrons* (Forbes) pri katerem so odziv samice sprožili nujno potrebni (ang. essential) elementi v pozivnem napevu samca, in odzivnost samice se pri poenostavljenem in manj kompleksnem pozivnem napevu ni zmanjšala (Hunt in sod., 1992). Spolno selekcijo, ki vpliva na fenotipe samcev pogosto vodi preferenca samic za bolj kompleksne in številčnejše signale (Ryan in Keddy-Hector, 1992). Glede na to se zdi presenetljivo, da kompleksnost pozivnega napeva ni vplivala na samo proženje odziva samic iz rodu *Aphrodes*. Čeprav naši rezultati kažejo, da so nekateri elementi v pozivnih napevih odvečni, je to lahko posledica raziskav v laboratoriju. Ob stalni prisotnosti biotičnega in abiotičnega šuma v naravnem okolju, je nespecifičen začetni del pozivnega napeva lahko pomemben za usmerjanje pozornosti samice na vrstno-specifične elemente, ki sledijo. To je lahko še posebej pomembno pri vrsti *A. aestuarina*, pri kateri vrstno-specifičen del predstavlja le relativno kratek čirik. To predpostavko podpira rezultat, da so se samice te vrste slabše odzivale na celotne napeve drugih vrst, kot na izolirane elemente v teh napevih. Poleg tega je preferenca samic lahko izražena tudi v dolžini odgovora, ki je lahko pomembna za hitro lokalizacijo. Pri vrsti *A. makarovi*, ki ima od vseh vrst najdaljše odzivne napeve, so samice spreminjale dolžino odgovora glede na dolžino pozivnega napeva, na katerega so odgovarjale in domneva se, da je pri tej vrsti pozivni napev podvržen spolni selekciji na osnovi preference samic (de Groot in sod., 2012).

V nasprotju s pričakovanji, so pri vrstah *A. aestuarina* in *A. bicincta*, pri katerih sta čirika pomembna elementa v pozivnem napevu samcev, samice pokazale različen nivo odzivnosti na izolirane vrstno-specifične elemente. Medtem ko so se samice vrste *A.*

*aestuarina* dobro odzivale na vse elemente, ki časovno in frekvenčno spominjajo na čirik lastne vrste, so se samice vrste *A. bicincta* slabo odzivale celo na konspecifičen čirik. Taka očitna razlika v odzivnosti je verjetno povezana tudi z vrstno-specifično zgradbo pozivnih napevov. Samice vrste *A. bicincta* so bolje odgovarjale na čirike v seriji, kot jo najdemo v pozivnih napevih te vrste. V medvrstnih parjenjih so samice te vrste tudi bolje odgovarjale samcem *A. aestuarina* v fazi dvorjenja, v kateri ti samci tipično povišajo frekvenco oddajanja pozivnih napevov (in s tem čirikov). Preferenca samic je pomemben vir selekcije na signale samcev in je osnova za razvoj reproduktivne izolacije pri mnogih vrstah (Andersson, 1994; Fowler-Finn in Rodríguez, 2013; Rodríguez in sod., 2006; Ryan in sod., 2010). Samice vrste *A. bicincta* se očitno bolje odzivajo na večje število čirikov (Ryan in Keddy-Hector, 1992), vendar so potrebne dodatne raziskave za določitev vloge spolne selekcije v nastanku vrst v rodu *Aphrodes*.

Nepričakovano, posledica na splošno višje navzkrižne odzivnosti samic vrste *A. aestuarina* na pozivni napev samcev vrste *A. bicincta* ni bil hkrati tudi večji uspeh pri parjenju v tej kombinaciji medvrstnega križanja. Čeprav je v obeh kombinacijah večina samcev iskala odzivno samico, je vrstno-specifična dolžina odzivnega napeva samice v povezavi z vrstno-specifično strukturo dueta imela za posledico asimetrično spolno izolacijo med tema dvema vrstama.

Rezultati raziskav vloge vibracijskih signalov pri prepoznavanju vrst med *A. aestuarina* in *A. bicincta* kažejo, da v tistih paritvenih sistemih, ki temeljijo na duetu, vsaj v nekaterih primerih, samci lahko prispevajo več k spolni izolaciji med vrstami kot samice. Poleg pričujočih rezultatov so pred tem tudi pokazali, da samci vrste *A. makarovi* ali niso iskali pa niso našli vira odzivnega napeva samice, ki je imel ponavljalni čas pulzov ali dolžino odziva izven vrstno-specifičnih vrednosti (de Groot in sod., 2011). V teoretičnih študijah (npr. Servedio, 2007; Servedio in Lande, 2006) so predpostavili, da v sistemih v katerih se samci pariyo večkrat, preferenco le-teh lahko pričakujemo v primerih, ko te preference igrajo vlogo pri prepoznavanju vrst. V naši raziskavi je večina samcev v obeh navzkrižnih medvrstnih *A. bicincta* – *A. aestuarina* križanjih prepoznala samico, kar je razvidno iz vedenjskega odziva (oz. iskanja) (Ryan in Rand, 1993), vendar je potrebno omeniti, da se odzivna napeva teh vrst ločita le v dolžini. Ne glede na to, so samci v obeh primerih obrnili izid pričakovan na osnovi nivoja odzivnosti samice. Manj specifična struktura dueta pri vrsti *A. aestuarina* ne predstavlja vedenjske ovire za parjenje s samicami *A. bicincta* in za samce tudi relativno nizka odzivnost teh samic ni predstavljal težav. Nasprotno pa je bila nezmožnost samcev vrste *A. bicincta* za vzdrževanje dueta s samicami *A. aestuarina*, ki se odzivajo s predolgimi napevi, kar je hkrati povezano tudi s težavami pri lokalizaciji samice, zadostna ovira za uspešno parjenje. Nekateri samci *A. bicincta* so bili vseeno zmožni najti samico na rastlini s tem, da so prilagodili iskalno vedenje na pretežno tiho

približevanje, tekom katerega so pozivne napeve oddajali le občasno. Čas, ki so ga ti samci potrebovali za lokalizacijo samice, se ni razlikoval od časa iskanja v parjenjih s samicami lastne vrste. Tudi samci vrste *A. aestuarina* so samice *A. bicincta*, ki se odzivajo s krajšimi napevi, našli enako hitro kot samice lastne vrste. Za majhne žuželke, ki živijo na rastlinah in se sporazumevajo z vibracijskimi signali, je lokalizacija vira vibracij zahtevna naloga (Virant-Doberlet in sod., 2006a; Legendere in sod., 2012). Samci vrste *A. makarovi* so hitreje našli vir daljšega odzivnega napeva in pri tej vrsti so predpostavili, da s podaljšanjem dolžine odziva samica lahko zniža ceno samčevega iskanja (de Groot in sod., 2011), saj plenilci lahko izkoriščajo pozivne napeve samcev te vrste (Virant-Doberlet in sod., 2011). Zaradi velikih razlik v strukturi dueta se samci različnih vrst lahko razlikujejo tudi v iskalnem vedenju, zlasti v tem, kdaj in kako dolgo hodijo preden oddajo naslednji pozivni napev (npr. ali hodijo med duetom in/ali po končanem odzivnem napevu samice). Uspeh tistih samcev vrste *A. bicincta*, ki so našli *A. aestuarina* samice, mogoče lahko pripišemo ali njihovi visoki motivaciji ali pa njihovi boljši sposobnosti lokalizacije. Tako kot pri drugih škržatkih, ki se v času parjenja sporazumevajo z vibracijskimi signali (Mazzoni in sod., 2009; Legendre in sod., 2012), se samice iz rodu *Aphrodes* pariyo s prvim samcem, ki jih najde in zato so samci lahko pod vplivom selekcije za boljšo zmožnost lokalizacije (Kokko in Rankin, 2006). Poleg tega so lahko ti samci boljši tudi v prehodu na alternativne taktike, kot je npr. tiho približevanje, ki ga škržatki uporabljajo v rivalnih interakcijah (Mazzoni in sod., 2009).

Naša raziskava kaže, da v sistemih, ki temeljijo na duetu, oba spola pripevata k spolni izolaciji. Rezultati predhodnih raziskav na vrsti *A. makarovi* (de Groot in sod., 2011) ter dela na medsebojnem prepoznavanju vrst *A. aestuarina* in *A. bicincta* v pričujoči disertaciji kažejo, da je samčev doprinos rezultat tako prepoznavanja samice kot tudi nezmožnosti lokalizacije vira neprimerne odzivnega napeva. Za vzdrževanje reproduktivne izolacije je še zlasti pomembno vzdrževanje vrstno-specifične strukture dueta. Pomen signalov, ki jih oddajajo samice, za prepoznavanje partnerjev postaja očiten in nadaljnje raziskave naj bi izboljšale naše razumevanje procesov vpletenih v evolucijo reproduktivne izolacije (Marie Curie Speciation Network, 2001; Mendelson in Shaw 2012; Servedio, 2007; Wilkins s sod., 2013). Poleg tega je prispevek vsakega od partnerjev k spolni izolaciji odvisen od kompleksnih medsebojnih vplivov različnih faktorjev kot so relativni starševski vložek, razmerje spolov, plodnost ter cena oglašanja in iskanja (Kozak in sod., 2009; Owens in Thompson, 1994; Servedio, 2007; Servedio in Lande, 2006). Medsebojni vpliv teh interakcij tekom evolucije se po vsej verjetnosti za vsako vrsto razlikuje. V tem pogledu lahko raziskave raznolikih, vendar do sedaj v glavnem zanemarjenih skupin kot so škržatki, prispevajo nujno potrebne empirične podatke pri iskanju vprašanj o procesih, ki vodijo evolucijo sistemov prepoznavanja spolnih partnerjev.

#### 4.2.2 Tip A. 'Dragonja'

Rezultati raziskav vibracijske komunikacije škržatkov tipa A. 'Dragonja' se skladajo z ugotovitvami raziskav sporazumevanja drugih vrst v rodu *Aphrodes*, da imajo vibracijski signali, ki jih škržatki oddajo med parjenjem, pomembno vlogo pri nastanku in vzdrževanju reproduktivne izolacije. Medtem ko se samice, ki smo jih pripisali tipu A. 'Dragonja', bolje odzivajo na pozivne napeve samcev tega tipa kot na napeve ostalih vrst, so samice vrst *A. aestuarina*, *A. bicincta*, *A. diminuta* in *A. makarovi* na te napeve le slabo odgovarjale. Vendar pa so se samice tipa A. 'Dragonja' med seboj zelo razlikovale v odzivnosti na pozivne napeve drugih vrst, saj so nekatere samice na te napeve pogosto odgovarjale, medtem ko so bile druge zelo selektivne. Manj selektivne samice so bile nabrane na lokacijah, kjer so bili prisotni tudi osebki *A. bicincta* in *A. makarovi*. Možno je, da so bile samice z visoko odzivnostjo hibridi med A. 'Dragonja' ter eno izmed dveh vrst ter s posledično relativno neizrazitimi preferencami. Nedvomno izkazujejo tudi samice tipa A. 'Dragonja' zelo močno preferenco, saj se v medvrstnih parjenjih, niso parile s samci vrste *A. bicincta*. V teh poskusih, v katerih so bile izpostavljene le enemu tipu napeva, je bil odziv vseh testiranih samic na napev vrste *A. bicincta* nizek.

V nasprotju z opaznimi razlikami med samicami v selektivnosti odziva, je bila velika večina pozivnih napevov samcev tipa A. 'Dragonja' jasno prepoznavna. To nakazuje, da je vedenjska, predparitvena izolacija dovolj močna, da vzdržuje ločene populacije, kljub temu pa ne moremo izključiti možnosti hibridov, na kar kažejo še posnetki atipičnih napevov A. 'Dragonja'. Atipični napevi nakazujejo, kako bi se napev tipa A. 'Dragonja' lahko razvil iz napeva *A. bicincta* (ali tudi obratno), saj zgradba pozivnega napeva samcev tipa A. 'Dragonja' kaže pomembne podobnosti z napevom vrste *A. bicincta*.

Vibracijski signali pri škržatkih iz rodu *Aphrodes* naj bi nastali z mehanizmom, ki je morfološko podoben in mogoče celo homologen timbalnemu mehanizmu pri škržadih in se nahaja na prvem členu zadka (Claridge, 1985; Ossiannilsson, 1949; Pringle, 1957). Vendar v nasprotju z značilnim timbalom, ki ga najdemo pri škržadih, timbal pri teh škržatkih ne tvori rebrasta membranska plošča, temveč naj bi bila površina, na katero se pripenja močna timbalna mišica poraščena z dlačicami (Ossiannilsson, 1949). Zaradi taksonomskih nedoslednosti ni jasno katero vrsto je raziskoval Ossiannilsson. Čeprav v svojem delu navaja vrsto *A. bicincta*, posnetek napeva kaže, da gre za vrsto *A. makarovi*. Dodatne raziskave timbalnega mehanizma na preverjenih osebkih bi omogočile boljšo interpretacijo teh atipičnih napevov. Prav tako bi bila za nadaljnje raziskave reproduktivne izolacije in spolne selekcije nujno potrebna medvrstna križanja, v katerih bi vzgojili potomce F1 in F2 generacije.

Poleg vedenjskih razlik med tipom *A. 'Dragonja'* in *A. bicincta*, so tudi morfometrične analize samcev tipa *A. 'Dragonja'* pokazale, da se ta tip oddaljuje od vrste *A. bicincta*. Da bi zanesljiveje opisali status tipa *A. 'Dragonja'*, bi bilo potrebno opraviti nadaljne genetske študije, saj verjetno nadaljnih morfoloških razlik med samicami obeh vrst, ekoloških in vedenjskih razlik ne bi bilo mogoče zlahka odkriti. Preliminarna analiza na osnovi AFLP je pokazala genetske razlike med angleško populacijo *A. bicincta* in tipom *A. 'Dragonja'* (Virant-Doberlet, osebna komunikacija). Slovenska populacija *A. bicincta* v času te preliminarne raziskave še ni bila poznana in vanjo ni bila vključena, vseeno pa rezultati napeljujejo na možne genetske razlike med *A. bicincta* in *A. 'Dragonja'*. Naslednji korak bi bil zato uporaba mikrosatelitov na večjem vzorcu osebkov. V študijo bi bilo tako potrebno vključiti vsaj po 20 osebkov iz vsake populacije. Poleg slovenskih populacij vseh treh vrst in tipa *A. 'Dragonja'* bi vključili še angleške populacije. Tako bi dobili merilo, ki bi vključevalo velike geografske razdalje in bi lažje sklepali o podobnosti med slovenskimi populacijami *A. bicincta* ter *A. 'Dragonja'*.

#### 4.3 RAZHAJANJE POZIVNIH NAPEVOV

Medtem ko naši rezultati kažejo, da vrstno-specifični vibracijski pozivni napevi igrajo odločilno vlogo v reproduktivni izolaciji (oz. njeni odsotnosti) med vrstami v rodu *Aphrodes*, lahko s trenutnim znanjem samo razglabljam o procesih, ki so vodili do nastanka tako različnih pozivnih napevov. Dejstvo, da imajo vrste teh škržatkov, ki živijo sintopično, pozivne napeve sestavljene iz različnih elementov, nakazuje na vlogo ojačenja v evoluciji samčevih napevov (Servedio in Noor, 2003). Vendar pa opažanje, da naravni hibridi niso slabo prilagojeni (Blumel, 2012), ne podpira neposredne vloge in močne selekcije na osnovi ojačenja v razhajanju napevov. Zaradi očitnih kvalitativnih razlik med napevi različnih vrst, sta genetski zdrs in ojačenje (Marie Curie Speciation Network, 2011; Mendelson in Shaw, 2012; Wilkins in sod., 2013) manj verjetna vodilna mehanizma razhajanja v vibracijskih napevih med vrstami. Verjetnejši scenarij bi vključeval pleiotropno mutacijo, ki hkrati vpliva na pozivni napev samcev in preferenco samic (Shaw in sod., 2011) ter divergentno spolno selekcijo (npr. West-Eberhard, 1983; Wells in Henry, 1998; Rodríguez in sod., 2006; Boul in sod., 2007; Grace in Shaw, 2011) in potencialno tudi divergentno ekološko selekcijo zaradi reproduktivnih motenj in adaptacij na različne biotske krajine (Gröning in Hochkirch, 2008; Hoskin in Higgie, 2010; Mendelson in Shaw, 2012; Safran in sod., 2013). Razlike v pozivnih napevih samcev, bi lahko nastale tudi z adaptacijo na specifične prevajalne lastnosti gostiteljskih rastlin (Endler, 1993; McNett in Coccoft, 2008), vendar sedanja ekološka opažanja ne podpirajo te možnosti. Medtem ko imajo *A. makarovi*, *A. bicincta*, *A. diminuta* in *A. 'Dragonja'*, ki jih pogosto najdemo sintopično na istih rastlinskih vrstah, zelo različne pozivne napeve, sta napeva vrst *A. bicincta* in *A. aestuarina*, ki jih najdemo na različnih gostiteljskih rastlinah (metuljnice oz. tolščakasta loboda), sestavljena iz zelo podobnih elementov. Na osnovi podobnosti med pozivnimi napevi

vrst *A. aestuarina* in *A. bicincta* ter slednje in tipa *A. 'Dragonja'* bi pričakovali, da so si to najožje sorodne vrste. Vendar filogenija na osnovi COI fragmenta v mitohondrijski DNA nakazuje, da genetska skupina *A. bicincta/A. 'Dragonja'* ter *A. aestuarina* nista sestrski skupini in da nimata neposrednega skupnega prednika. Ker vrsto *A. aestuarina* najdemo v habitatu, ki je ob plimi dvakrat dnevno poplavljen, je možno, da je mtDNA pri tej vrsti pod vplivom neposredne selekcije, ki naj bi omogočila boljšo adaptacijo na ekstremne pogoje (Ballard in Whitlock, 2004; Ballard in Melvin, 2010).

#### 4.4 MORFOLOGIJA

Izčrpna analiza škržatkov iz rodu *Aphrodes* z uporabo več kriterijev je potrdila, da so *A. aestuarina*, *A. bicincta*, *A. diminuta* in *A. makarovi* vedenjsko, genetsko in morfološko ločene vrste. Analize preverjenih osebkov so med vrstami pokazale dosledne razlike v zgradbi aedeagusa, vendar samo genitalni znaki niso zadostovali za zanesljivo razlikovanje med vrstami. Poleg tega morfološke razlike v zgradbi samčevega spolnega aparata ne preprečujejo parjenja med vrstama *A. bicincta* in *A. aestuarina* (pričujoča disertacija) in med *A. aestuarina* in *A. makarovi* (Bluemel, 2012). Glede na to, da naj bi se spolni organi samcev spreminjali bolj in hitreje kot drugi morfološki znaki (Eberhard, 1985; Arnqvist, 1997; Hosken in Stockley, 2004) je presenetljivo, da so razlike v morfologiji aedeagusa med vrstami v rodu *Aphrodes* majhne, še posebej, ker živijo sintopično. Taksonomi štejejo razlike v morfologiji spolnih organov za najzanesljivejše znake za razločevanje ozko sorodnih, morfološko podobnih vrst (Eberhard, 1985; 2010) in od začetka 20. stoletja se morfologija aedeagusa uporablja tudi kot najpomembnejši taksonomski znak v taksonomiji škržatkov (npr. Ribaut, 1936; Wagner, 1937). Čeprav o mehanizmih, ki so razlog za hitro evolucijo samčevih genitalij, še vedno razpravljajo (Shapiro in Porter, 1989; Arnqvist, 1998; Eberhard, 2004; 2010; Hosken in Stockely, 2004; Wojcieszek in Simmons, 2013), obe najbolj podprti hipotezi povezujeta razlike v morfologiji spolovil s spolno selekcijo, ali na osnovi prikrite izbire samic ali pa spolnega konflikta. Obe hipotezi predpostavljata, da naj bi bila hitrost divergentne evolucije samčevih spolnih organov nizka v primeru, če se samice praviloma pariyo samo enkrat v življenju in če samci samic ne morejo prisiliti v kopulacijo. V tem primeru naj bi genitalije imele le malo vrstno-specifičnih znakov (Eberhard 1985; Arnqvist, 1998). Značilnost paritvenega sistema običajno opisanega pri škržatkih je, da se drugače kot samci samice pariyo le enkrat (vendar glej tudi Hayashi in Kimura, 2002). Laboratorijske raziskave so pokazale, da se v nasprotju s samci, ki pričnejo ponovno oddajati pozivne napeve (oz. s tem pričnejo iskati partnerja) takoj po kopulaciji, sparjene samice ne odzivajo na pozivne napeve samcev in jih posledično, samci tudi ne morejo najti (Hunt in Nault, 1991; Mazzoni in sod., 2009). Možno je, da se nekaterim samicam odzivnost povrne po določenem času, katerega dolžina je odvisna od količine ejakulata (oz. od tega kolikokrat zapovrstjo se je samec paril neposredno pred kopulacijo) (Bailey in Nuhardiyati, 2005). Čeprav je Chiykowski (1970)

predpostavljala, da pri vrsti *A. bicincta* eno samo parjenje ne zadostuje za doživljenjsko oploditev samice, naša opazovanja kažejo, da se sparjene samice ne odzivajo na napeve samcev tudi še mesec po kopulaciji. Medtem ko samice živijo 2-4 mesece, umrljivost samcev tudi v laboratorijskih pogojih naraste po 3-4 tednih (Chiykowski, 1970; osebna opazovanja). Če upoštevamo še protandrijo ter da so samci izpostavljeni večji nevarnosti zaradi plenilcev (Virant-Doberlet in sod., 2011), je verjetno, da se v naravnih pogojih samice škržatkov iz rodu *Aphrodes* parijo le enkrat v življenju, kot so pokazali tudi za druge škržatke (Heady, 1993; Wood in Guittman, 1983). Ker ima paritveni sistem zelo verjetno pomemben, če ne celo odločilen vpliv na morfologijo samčevega spolnega aparata, je njegov pomen potrebno upoštevati tudi v taksonomskih raziskavah, v katerih šele izbiramo najbolj informativne in zanesljive morfološke znake. Poleg tega predparitvena reproduktivna izolacija v rodu *Aphrodes* primarno temelji na zelo raznolikih vrstno-specifičnih vibracijskih signalih in natančno koordiniranih duetih. V takem primeru verjetno tudi ne moremo pričakovati morfoloških sprememb v samčevem genitalnem aparatu kot posledico adaptacije, ki naj bi preprečila hibridizacijo med sintopičnimi, ozko sorodnimi vrstami (Shapiro in Porter, 1989). Zelo raznolike pozivne napeve samcev ob odsotnosti razlik v samčevem spolnem aparatu so opisali tudi pri škržatkih iz rodu *Macropsis* (Tishechkin, 2002). Podobno, raznolike vibracijske napeve pri simpatričnih vrstah tenčičaric iz skupine *Chrysoperla carnea* spremljajo majhne razlike v morfologiji samčevih genitalij (Henry in sod. 2013). Pri slednji skupini so tudi ugotovili izjemno majhne genetske razdalje med akustično jasno diferenciranimi, a morfološko identičnimi vrstami.

#### 4.5 STATUS TIP A. 'DRAGONJA'

Na podlagi predzigotne reproduktivne izolacije in majhnih razlik v COI genu lahko sklepamo, da škržatki tipa A. '*Dragonja*' predstavljajo mlado, novo vrsto, ki se je iz vrste *A. bicincta* razvila nedavno. V času postavitve raziskovalnih hipotez smo na osnovi seznama vrst iz rodu *Aphrodes* v Sloveniji (Seljak, 2004; Holzinger in Seljak, 2001) in rezultatov lastnih preliminarnih vzorčenj predpostavljali, da osebki pripisani vrsti *A. bicincta* pripadajo vrsti *A. diminuta*, saj so v preteklosti zaradi nedoslednosti v določevalnih ključih, ti vrsti pogosto zamenjevali (Bluemel in sod., 2014). Predvidevali smo, da osebki z napevom vrste *A. bicincta*, kot so ga registrirali v S (Rusija - Tishechkin, 1998, 2000) in Z delu Evrope (Velika Britanija - Virant-Doberlet in sod., 2006b), ter v osrednji Aziji (Rusija in Kazahstan - Tishechkin, 1998, 2000), v Sloveniji niso prisotni in da to vrsto nadomeščajo osebki tipa A. '*Dragonja*', kar se ujema s splošno prepoznanimi kolonizacijskimi potmi iz ledenodobnega refugija na Balkanu (Hewit, 2000). Te predpostavke so bile tudi osnova hipoteze, da razlike v vibracijskih signalih med vrstama/populacijama v rodu *Aphrodes* (*A. bicincta* in A. '*Dragonja*') odražajo zgodovino teh dveh vrst/populacij oz. poselitev iz dveh različnih ledenodobnih zatočišč (refugijev). Obsežna vzorčenja, ki smo jih opravili v sklopu pričujočega



doktorata pa so razkrila, da so tudi v Sloveniji prisotni 'tipični' osebki vrste *A. bicincta*. V vzorčenjih škržatkov iz rodu *Aphrodes* izven Slovenije smo našli le vrsto *A. makarovi* (Italija, Bolgarija), ali pa škržatkov iz tega rodu pri enkratnem vzorčenju nismo našli (Hrvaška, Črna Gora). Na osnovi teh rezultatov ne moremo sklepati o izvoru in širši geografski razširjenosti tipa *A. 'Dragonja'* in potrditi hipoteze, da se je *A. 'Dragonja'* razvila v balkanskem ledenodobnem refugiju. V splošnem geografska porazdelitev v Sloveniji morda nakazuje na obstoj stične cone med vrsto *A. bicincta* in tipom *A. 'Dragonja'* v zahodni Sloveniji, v območju od Črnega Kala do vzhodnega roba Vipavske doline (slika 9), vendar smo osebke *A. bicincta* našli tudi na vzhodu (pod Gorjanci) in na severozahodu Slovenije. Glede na trenutno dostopne podatke je možno tudi, da je tip *A. 'Dragonja'* le lokalno razširjen, torej endemit. V tem primeru predpostavljamo, da tip *A. 'Dragonja'* predstavlja mlado vrsto, ki je po vsej verjetnosti nastala iz vrste *A. bicincta* simpatrično na osnovi pleiotropne mutacije, ki je hkrati vplivala na pozivni napev samcev in preferenco samic (npr. Shaw in sod. 2011). Tak scenarij so predpostavili tudi pri nastanku vrst pri tenčičaricah iz skupine *Chrysoperla carnea* (Henry in sod., 2013; Wilkins s sod., 2013).

## 5 SKLEPI

Obravnavna študija reproduktivne izolacije škržatkov iz rodu *Aphrodes* obsega vedenjski, morfološki in molekularni sklop, ki se med seboj dopolnjujejo. Izbrani integrativni pristop je omogočil boljšo interpretacijo vrst ter prispevek k novim spoznanjem o mehanizmih divergence spolnih signalov, ki so vodili do nastanka reproduktivne izolacije. Zaključimo lahko, da kljub temu, da so pri nastanku vrst v rodu *Aphrodes* udeleženi različni faktorji, imajo vibracijski signali pomembno vlogo pri nastanku in vzdrževanju reproduktivne izolacije med vrstami.

Glede na zastavljene hipoteze lahko rezultate doktorskega dela povzamemo v naslednjih sklepih:

1. Vrstno-specifični pozivni napevi samcev imajo pomembno vlogo pri nastanku in vzdrževanju reproduktivne izolacije med vrstami. Drugače kot pri drugih do sedaj proučevanih sistemih, pri škržatkih iz rodu *Aphrodes* igrajo pomembno vlogo tudi vrstno-specifični odzivni napevi samic.
2. Vrstno specifični zvočni elementi prisotni v pozivnih vibracijskih signalih samcev so pomembni za prepoznavanje spolnih partnerjev. Ker pa odzivnost samic odraža nivo podobnosti med zvočnimi elementi prisotnimi v pozivnih napevih samcev različnih vrst, zgolj le-ti ne zagotavljajo vedenjske izolacije med vrstami.
3. Pozivni napev samcev tipa *A. 'Dragonja'* se razlikuje od drugih poznanih v tem rodu in nanj se odzivajo le samice tipa *A. 'Dragonja'*. Najbolj podobne napeve oddajajo samci vrste *A. bicincta*, ki smo jih registrirali tako v Sloveniji kot v Veliki Britaniji. Škržatke tipa *A. 'Dragonja'* smo našli le v Sloveniji, kjer so splošno razširjeni in se z vrsto *A. bicincta* pogosto nahajajo na isti lokaciji. Ločljivost na osnovi izbranih mitohondrijskih molekulskih markerjev ni bila dovolj visoka, da bi lahko sklepali o prekinitvi genskega pretoka med tema dvema linijama. Poleg tega na osnovi trenutnega poznavanja razširjenosti tipa *A. 'Dragonja'* ne moremo sklepati o kolonizacijskih poteh teh dveh vrst/populacij oziroma o mehanizmih nastanka tipa *A. 'Dragonja'*. S pomočjo pirosekvenciranja in bioinformatike smo prvič izolirali 11 polimorfni mikrosatelitnih markerjev za genotipizacijo vrst iz rodu *Aphrodes*, ki bodo omogočili nadaljne študije sorodstvenih odnosov in kolonizacijskih poti.
4. Na osnovi izražene predzigotne reproduktivne izolacije in majhnih razlik v COI genu lahko sklepamo, da škržatki tipa *A. 'Dragonja'* predstavljajo mlado, novo vrsto, ki se je iz vrste *A. bicincta* razvila nedavno. Na podlagi trenutnega

poznavanja razširjenosti obeh populacij/vrst pa predpostavljamo, da je *A. 'Dragonja'* nastala na osnovi peliotropne mutacije, ki je istočasno vplivala tako na produkcijo vrstno-specifičnega pozivnega napeva kot tudi na preferenco samic.

5. Genetska razdalja med vrstami ni v korelaciji z izkazano predparitveno izolacijo, ki jo vzdržujejo vrstno-specifični vibracijski signali.

## 6 POVZETEK (SUMMARY)

### 6.1 POVZETEK

Škržatki iz rodu *Aphrodes* Curtis, 1833, so predstavniki družine Cicadellidae (Hemiptera: Auchenorrhyncha), ki je s preko 22.000 vrstami ena najštevilčnejših skupin rastlinojedih žuželk. Pri vseh škržatkih vibracijski signali, ki se prenašajo preko podlage, igrajo ključno vlogo pri prepoznavanju spolnih partnerjev (oz. vrst). Pri vseh vrstah se sporazumevanje med partnerjema prične z oddajanjem samčevega pozivnega napeva in samec in samica si nato izmenjujeta signale v duetu. Čeprav postaja čedalje bolj jasno, da so vibracijski signali pomemben način sporazumevanja, ne le pri členonožcih, temveč tudi pri vretenčarjih, je vibracijska komunikacija še vedno najmanj raziskan in poznan način sporazumevanja. Še posebej je malo znanega o evlucijskih procesih, ki vodijo k spremembam v samem mehanizmu prepoznavanja spolnih partnerjev oz. razlikam med vibracijskimi signali, ki so osnova za nastanek vedenjske izolacije ter njihovem prispevku k razhajanju naravnih populacij in nastanku vrst.

Škržatki iz rodu *Aphrodes* predstavljajo idealen sistem za raziskovanje razhajanja na osnovi vibracijskih signalov ter s tem nastanka vrst. Ta rod je poznan kot taksonomsko zahtevna skupina in vključuje najmanj štiri morfološko izjemno podobne vrste, ki jih tudi poznavalci le težko razlikujejo. V nasprotju z do sedaj raziskovanimi paritvenimi sistemi, ki temeljijo na zvočnih signalih, se pri škržatkih iz rodu *Aphrodes* pozivni napevi samcev med vrstami bistveno razlikujejo ne le na osnovi kvantitativnih razlik v določenih časovnih in frekvenčnih parametrih, temveč tudi v sami temeljni zgradbi (oz. kvalitativno), medtem ko so odzivni napevi samic variacije istega osnovnega vzorca in se med ločijo le kvantitativno. Delo prispeva nova spoznanja o mehanizmih divergence spolnih signalov, ki vodijo do nastanka predparitvene reproduktivne izolacije. Obsega vedenjski in molekularni sklop, ki se med seboj dopolnjujeta. Hkrati smo vedenjske, molekularne in morfološke podatke povezali v celostno taksonomijo tega rodu, saj je le to najzanesljivejša metoda za prepoznavanje vrst, slednje pa je osrednjega pomena tudi v raziskavah evlucijskih procesov in nastanka vrst. Celostni pristop k taksonomiji tega rodu je pokazal da so *A. aestuarina*, *A. bicincta*, *A. diminuta* in *A. makarovi* vedenjsko, genetsko in morfološko ločene vrste.

Vzorčenje na 81 lokacijah je pokazalo, da se v Sloveniji nahajajo vrste *A. bicincta*, *A. diminuta* in *A. makarovi* ter osebki tipa *A. 'Dragonja'*, katerih pozivni napevi se ločijo od drugih. Osebke tega tipa smo našli le v Sloveniji, kjer so splošno razširjeni. Na polovici vzorčnih mest sta bili prisotni vsaj dve vrsti (oz. tipa). Škržatki tipa *A. 'Dragonja'* so se pojavljali skupaj z osebki vseh treh vrst.

Med pozivnimi napevi samcev vrst iz rodu *Aphrodes* najdemo le malo podobnosti. Pri vseh vrstah začetnemu delu napeva, ki je zelo variabilen in vrstno nespecifičen, sledi vrstno-specifičen del, ki je sestavljen iz značilnih vrstno-specifičnih elementov. Osnovna struktura pozivnega napeva samcev tipa A. '*Dragonja*' je enaka kot pri vrsti A. *bicincta* – nespecifičnemu začetnemu delu sledi vrstno-specifičen del, ki je sestavljen iz ponavljajočih se dvojic pulzov in čirikov, vendar se zgradba dvojice tipa A. '*Dragonja*' od dvojice A. *bicincta* bistveno razlikuje.

V poskusih s predvajanjem posnetih signalov smo določili preference samic za pozivne napeve lastne in drugih vrst (oz. tipov) ter tudi odzivnost samic na vrstno-specifične elemente v teh napevih. Rezultati so pokazali, da čeprav se samice v splošnem bolje odzivajo na pozivne napeve samcev lastne kot na katerikoli napev tuje vrste (oz. tip), imajo pozivni napevi, ki jih sestavljajo podobni elementi, le omejeno vlogo pri vzdrževanju predparitvene reproduktivne izolacije. Tak je bil primer vrst A. *aestuarina* in A. *bicincta*, pri katerih se čirika, ki sta pomembna elementa pozivnih napevov, razlikujeta le v dolžini. Samice teh dveh vrst so se navzkrižno značilno bolje odzivale na pozivne napeve samcev teh vrst kot na ostale heterospecifične napeve, vendar je bila recipročna odzivnost samic A. *aestuarina* v primerjavi z odzivnostjo samic A. *bicincta* značilno višja.

Ko smo prepoznavanje spolnih partnerjev pri teh dveh vrstah preverili še v navzkrižnih medvrstnih parjenjih, se je v nasprotju s pričakovanji pokazalo, da posledica na splošno višje navzkrižne odzivnosti samic vrste A. *aestuarina* na pozivni napev samcev vrste A. *bicincta* ni bil hkrati tudi večji uspeh pri parjenju v tej kombinaciji medvrstnega križanja. Verjetnost kopulacije v tej kombinaciji je bila značilno nižja zaradi porušanja kompleksne strukture vrstno-specifičnega dueta A. *bicincta*, saj samice A. *aestuarina* z dolgimi odgovori niso sledile hitremu ponavljalnemu času čirikov v pozivnem napevu samca A. *bicincta*. Ti rezultati kažejo, da v sistemih, ki temeljijo na duetu, oba spola pripadata k spolni izolaciji in da vsaj v nekaterih primerih, samci lahko prispevajo več k spolni izolaciji med vrstami kot samice.

Samice vrst A. *aestuarina*, A. *bicincta*, A. *diminuta* in A. *makarovi* vrst so na pozivne napeve samcev tipa A. '*Dragonja*' le slabo odgovarjale, medtem ko se samice, ki smo jih pripisali temu tipu bolje odzivale na te pozivne napeve kot na napeve ostalih vrst. V primerjavi samicami drugih vrst, so te samice pogosteje odgovarjale tudi na napeve vseh drugih vrst, kar kaže na nižjo selektivnost. Vendar je bil uspeh obeh recipročnih križanj med vrsto A. *bicincta* in tipom A. '*Dragonja*' zelo nizek, in večina samcev je rastlino zapustila predčasno.

Analiza zaporedij fragmentov genov v mitohondrijski DNA je osebkje tipa A. '*Dragonja*' uvrstila med škrzatke vrste A. *bicincta*. Ločljivost na osnovi izbranih mitohondrijskih

molekulskih markerjev ni bila dovolj visoka, da bi lahko sklepali na genski pretok med tema dvema linijama. S pomočjo pirosekvenciranja in bioinformatike smo prvič izolirali 11 polimorfnih mikrosatelitnih markerjev za genotipizacijo vrst iz rodu *Aphrodes*, ki bodo omogočili nadaljne študije sorodstvenih odnosov in kolonizacijskih poti.

## 6.2 SUMMARY

Leafhoppers of the genus *Aphrodes* are members of the family Cicadellidae which is with more than 22.000 described species one of the most speciose groups of phytophagous insects. As in other leafhoppers, mate recognition and location is mediated exclusively via substrate-borne vibrational signals. In all species pair formation begins with emission of male advertisement calls and partners exchange signals in a stereotyped temporal pattern characteristic of a proper duet. Although in recent years it's becoming increasingly clearer that vibrational signals are an important sensory modality not only in arthropods but also in vertebrates, substrate vibrations are still the least understood channel of communication. In particular, little is known about evolutionary forces that lead to changes in mate recognition system (i.e. vibrational signals) that underlie the evolution of behavioural isolation and their contribution to divergence and speciation.

Leafhoppers of this genus provide an ideal system to study the role of signal divergence in speciation. This genus is considered a taxonomically challenging group and comprises at least four morphologically very similar, closely related species and even trained experts hardly distinguish among them. In contrast to up to now studied mating systems based on acoustic signals, in this genus male advertisement calls are highly divergent and primarily differ qualitatively between species, while female signals are variations on the same basic pattern but differ quantitatively in signal characteristics. The aim of this work was to provide much needed insight into the mechanisms of divergence in sexual signals leading to prezygotic reproductive isolation. It includes behavioural and molecular parts which complement each other. We also integrated behavioural, molecular and morphological data into species description since such an approach is generally considered the most reliable method for delimiting species. Species discrimination is also crucial for detailed investigations on evolutionary processes and speciation. Integrative approach confirmed *A. aestuarina*, *A. bicincta*, *A. diminuta* in *A. makarovi* as behaviourally, genetically and morphologically distinct species.

Sampling at 81 locations across Slovenia revealed the presence of *A. bicincta*, *A. diminuta* in *A. makarovi*, as well as of individuals belonging to *A. 'Dragonja'* type which emit advertisement calls that differ from the ones described in the above mentioned species. Individuals of this type were found only in Slovenia where they are

common and widely distributed. At about half of collecting sites more than one species (type) were present and *A. 'Dragonja'* type was collected with every other species.

There are very few similarities between male advertisement calls of different *Aphrodes* species. In all species the non-specific and highly variable first section of the male call is followed by species-specific elements. The basic structure of male advertisement call in *A. 'Dragonja'* is the same as in *A. bicincta* – the non-specific starting section is followed by the species-specific section formed by continuously repeated dyads composed of a chirp and a pulse. However, the structure of the dyad in *A. 'Dragonja'* markedly differs from the dyad in *A. bicincta*.

In playback experiments, we determined the preference of females of four *Aphrodes* species for conspecific and heterospecific male advertisement calls, as well as female responsiveness to species-specific elements in these signals. Results showed that although females of all four species responded preferentially to the advertisement calls of conspecific males, male calls composed of similar elements played only limited role in mate recognition. In particular, females of *A. aestuarina* and *A. bicincta* showed higher responsiveness to each other's male calls than to calls of other species. Male calls in these two species are both composed of chirps which differ only in duration, however, when compared, responsiveness of *A. aestuarina* females to males of *A. bicincta* was significantly higher.

We further examined the role of female signals and duet structure in these two species in assortative mating using 'no-choice' reciprocal mating experiments. Unexpectedly, the generally higher reciprocal responsiveness of *A. aestuarina* females to male calls of *A. bicincta* was not translated into higher mating success in this heterospecific cross; lengthy replies of *A. aestuarina* females resulted in a breakdown of a complex species-specific duet structure and associated difficulties in locating the female reduced the probability of heterospecific mating. These results show that in mating systems based on a duet mate recognition is likely to be reciprocal and at least in some cases, males may contribute more than females to sexual isolation between species.

Females of *A. aestuarina*, *A. bicincta*, *A. diminuta* in *A. makarovi* did not respond well to male advertisement calls of *A. 'Dragonja'*, while females which were attributed to this type responded preferentially to these calls. In comparison with other females they more frequently responded also to call of other species which indicates lower selectivity. However, the success in both reciprocal matings with *A. bicincta* was very low and almost all males left the plant before the allotted time.

Analyses of mtDNA sequences grouped individuals of *A. 'Dragonja'* together with *A. bicincta*. We were not able to infer gene flow between these two lineages based on the

chosen mtDNA markers. However, the recently available pyrosequencing enabled us to develop 11 polymorphic microsatellite markers for genotyping leafhoppers from genus *Aphrodes*. These specific markers are necessary for further studies to unravel patterns of colonization.



## 7 VIRI

- Abdelkrim, J., Robertson, B., Stanton, J.-A., Gemmell, N. 2009. Fast, cost-effective development of species-specific microsatellite markers by genomic sequencing. *BioTechniques*, 46, 3: 185–192
- Andersson, M. 1994. *Sexual selection*. Princeton, New Jersey, Princeton University Press: 624 str.
- Angulo, A., Reichle, S. 2008. Acoustic signals, species diagnosis, and species concepts: the case of a new cryptic species of *Leptodactylus* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) from the Chapare region, Bolivia. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 152, 1: 59–77
- Arnegard, M. E., McIntyre, P. B., Harmon, L. J., Zelditch, M. L., Crampton, W. G. R., Davis, J. K., Sullivan, J. P., Lavoue, S., Hopkins C. D. 2010. Sexual signal evolution outpaces ecological divergence during electric fish species radiation. *The American Naturalist*, 176, 3: 335–356
- Arnqvist, G. 1997. The evolution of animal genitalia: distinguishing between hypothesis by single species studies. *Biological Journal of the Linnean Society*, 60, 365–379
- Arnqvist, G. 1998. Comparative evidence for the evolution of genitalia by sexual selection. *Nature*, 393: 784–786
- Bailey, W. J. 2003. Insect duets: underlying mechanisms and their evolution. *Physiological Entomology*, 28, 3: 157–174
- Bailey, W. J., Nuhardiyati, M. 2005. Copulation, the dynamics of sperm transfer and female refractoriness in the leafhopper *Balclutha incisa* (Hemiptera: Cicadellidae: Deltocephalinae): Copulation and sperm transfer in a leafhopper. *Physiological Entomology*, 30, 4: 343–352
- Ballard, J. W. O., Melvin, R. G. 2010. Linking the mitochondrial genotype to the organismal phenotype. *Molecular Ecology*, 19, 8: 1523–1539
- Ballard, J. W. O., Whitlock, M. C. 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, 13, 4: 729–744
- Beckers, O., Schul, J. 2010. Female adaptation to developmental plasticity in male calling behavior. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 64, 1279–1290

- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K. L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K. K., Das, I. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 22, 3: 148–155
- Bluemel, J. K. 2012. Introgressive hybridization and incipient ecological speciation amongst saltmarsh *Aphrodes* leafhoppers. PhD thesis, School of Biosciences, Cardiff University: 265 str.
- Bluemel, J. K., Derlink M., Pavlovčič, P., Russo, I. M., King, R. A., Corbett, E., Sherrard-Smith, E., Wilson M. R., Stewart, A. J. A., Symondson, W. O. C., Virant-Doberlet, M. 2014. Integrating vibrational signals, mitochondrial DNA and morphology for species determination in the genus *Aphrodes* (Hemiptera: Cicadellidae). *Systematic Entomology*, 39, 2: 304-324
- Bluemel, J. K., King, R. A., Virant-Doberlet, M., Symondson, W. O. C. 2011. Primers for identification of type and other archived specimens of *Aphrodes* leafhoppers (Hemiptera, Cicadellidae). *Molecular Ecology Resources*, 11, 5: 770–774
- Boake, C. R. 2000. Flying Apart: Mating Behavior and Speciation. *BioScience*, 50, 6: 501–508
- Boughman, J. W. 2002. How sensory drive can promote speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, 17, 12: 571–577
- Boul, K. E., Funk, W. C., Darst, C. R., Cannatella, D. C., Ryan, M. J. 2007. Sexual selection drives speciation in an Amazonian frog. *Proceedings of the Royal Society*, 274, 1608: 399–406
- Braune, P., Schmidt, S., Zimmermann, E. 2008. Acoustic divergence in the communication of cryptic species of nocturnal primates (*Microcebus* spp.). *BMC Biology*, 6, 1: 19
- Bressan, A., Clair, D., Sémétey, O., Boudon-Padieu, E. 2006. Insect injection and artificial feeding bioassays to test the vector specificity of Flavescence dorée phytoplasma. *Phytopathology*, 96, 7: 790–796
- Broughton, W. B. 1963. Method in bioacoustic terminology. In: *Acoustic behaviour in animals* (Ed. by R. G. Busnel), Elsevier, Amsterdam, The Netherlands: 3–24 str.
- Brown, V.K., Gibson, C.W.D. Kathirithamby, J. 1992. Community organisation in leafhoppers. *Oikos*, 65, 97–106

- Calabrese, J. M., Fagan, W. F. 2004. Lost in time, lonely, and single: reproductive asynchrony and the allee effect. *The American Naturalist*, 164, 1: 25–37
- Campbell, P., Pasch, B., Pino, J. L., Crino, O. L., Phillips, M., Phelps, S. M. 2010. Geographic variation in the song of neotropical singing mice: testing the relative importance of drift and local adaptation. *Evolution*, 64, 7: 1955–1972
- Cardoso, G. C., Hu, Y., Mota, P. G. 2012. Birdsong, sexual selection, and the flawed taxonomy of canaries, goldfinches and allies. *Animal Behaviour*, 84,1: 111–119
- Carraro, L., Ferrini, F., Ermacora, P., Loi, N., Martini, M. Osler, R. 2004. *Macropsis mendax* as a vector of elm yellows phatoplasma of *Ulmus* species. *Plant Pathology*, 53, 90–95
- Caterino, M. S., Cho, S., Sperling, F. A. 2000. The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. *Annual Review of Entomology*, 45, 1: 1–54
- Chiykowski, L. N. 1970. Notes on the biology of the leafhopper *Aphrodes bicincta* (Homoptera: Cicadellidae) in the Ottawa area. *The Canadian Entomologist*, 102, 750–758
- Claridge, M. F. 1985. Acoustic signals in the Homoptera: behavior, taxonomy and evolution, *Annual Review of Entomology*, 30, 297–317
- Claridge, M. F., Morgan, J. C. 1993. Geographical variation in acoustic signals of the planthopper *Nilaparvata bakeri* (Muir) in Asia: species recognition and sexual selection. *Biological Journal of the Linnean Society*, 48, 267–281
- Cocroft, R. B., Rodríguez, R. L. 2005. The behavioral ecology of insect vibrational communication. *Bioscience*, 55, 4: 323–334
- Cocroft, R. B., Rodríguez, R. L., Hunt, R. E. 2008. Specialization, speciation, and radiation: The evolutionary biology of herbivorous insects. University of California Press, London: 360 str.
- Cocroft, R. B., Rodríguez, R. L., Hunt, R. E. 2010. Host shifts and signal divergence: mating signals covary with host use in a complex of specialized plant-feeding insects. *Biological Journal of the Linnean Society*, 99, 1: 60–72
- Coyne, J. A., Orr, H. A. 2004. Speciation. Sinauer, Sunderland. 545 str.

- Danley, P. D., Husemann, M., Chetta, J. 2012. Acoustic diversity in Lake Malawi's rock-dwelling cichlids. *Environmental Biology of Fishes*, 93, 1: 23–30
- De Carvalho, M. R., Bockmann, F. A., Amorim, D. S., Brandão, C. R. F. 2008. Systematics must embrace comparative biology and evolution, not speed and automation. *Evolutionary Biology*, 35, 2: 150–157
- De Groot, M., Čokl, A., Virant-Doberlet, M. 2011. Searching behaviour in two hemipteran species using vibrational communication. *Central European Journal of Biology*, 6, 756–769
- De Groot, M., Derlink, M., Pavlovčič, P., Prešern, J., Čokl, A., Virant-Doberlet, M. 2012. Duetting Behaviour in the Leafhopper *Aphrodes makarovi* (Hemiptera: Cicadellidae). *Journal of Insect Behavior*, 25, 5: 419–440
- De Luca, P. A., Cocroft, R. B. 2011. The influence of age on male mate-searching behaviour in thornbug treehoppers. *Ethology*, 117, 5: 440–450
- De Winter, A. de, Rollenhagen, T. 1990. The importance of male and female acoustic behaviour for reproductive isolation in *Ribautodelphax* planthoppers (Homoptera: Delphacidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 40, 2: 191–206
- Den Bieman, C. F. M. 1986. Acoustic differentiation and variation in planthoppers of the genus *Ribautodelphax* (Homoptera, Delphacidae). *Netherlands Journal of Zoology*, 36, 461–480
- Den Bieman, K., Biedermann, R., Nickel, H., Niedrighaus, R. 2011. *The Planthoppers and Leafhoppers of Benelux*. Wissenschaftlich Akademischer Buchvertrieb-Fründ, Scheeßel, Germany: 120 str.
- Denes, A. S., Sinha, R. C. 1992. Alteration of clover phyllody mycoplasma DNA after in vitro culturing of phyllody-diseased clover. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 13, 189–252
- Derlink, M., Pavlovčič, P., Stewart, A., Virant-Doberlet, M. 2014. Mate recognition in duetting species: the role of male and female vibrational signals. *Animal Behaviour*, 90, 181–193
- Dietrich, C. H. 2004. Phylogeny of the leafhopper subfamily Evacanthinae with a review of Neotropical species and notes on related groups (Hemiptera: Membracoidea: Cicadellidae). *Systematic Entomology*, 29, 4: 455–487

- Dingle, C., Poelstra, J. W., Halfwerk, W., Brinkhuizen, D. M., Slabbekoorn, H. 2010. Asymmetric response patterns to subspecies-specific song differences in allopatry and parapatry in the gray-breasted wood-wren. *Evolution*, 64, 12: 3537–3548
- D'Urso, V. 1995. Auchenorrhyncha Homoptera. Checklist delle Specie della Fauna Italiana, 42, 1–35
- Eberhard, W.G. 1985. *Sexual Selection and Animal Genitalia*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts: 244 str.
- Eberhard, W.G. 2004. Male-female conflict and genitalia: failure to conform predictions in insects and spiders. *Biological Reviews*, 79, 121–186
- Eberhard, W.G. 2010. *The evolution of primary sexual characters in animals. Rapid divergent evolution of genitalia: theory and data updated*, Oxford University Press, New York: 537 str.
- Edwards, J. 1908. On some British Homoptera hitherto undescribed and unrecorded. *Entomologist's Monthly Magazine*, 44, 55–59
- Emerson, S. B., Boyd, S. K. 1999. Mating vocalizations of female frogs: control and evolutionary mechanisms. *Brain, Behavior and Evolution*, 53, 4: 187–197
- Endler, J. A. 1993. Some general comments on the evolution and design of animal communication systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 340, 1292: 215–225
- Endler, J. A., Basolo, A. L. 1998. Sensory ecology, receiver biases and sexual selection. *Trends in Ecology & Evolution*, 13, 10: 415–420
- Endrestøl, A. 2013. The Auchenorrhyncha of Denmark (Hemiptera: Fulgomorpha and Cicadomorpha). *Annales de la Société entomologique de France*, 49, 181–204
- Eyre, M. D. 2005. Habitat diversity in the conservation of the grassland Auchenorrhyncha (Homoptera: Cercopidae, Cicadellidae, Cixidae, Delphacidae) of Northern Britain. *Journal of Insect Conservation*, 9, 4: 309–317
- Eyre, M. D., Woodward, J. C., Luff, M. L. 2001. The distribution of grassland Auchenorrhyncha assemblages (Homoptera: Cercopidae, Cicadellidae, Delphacidae) in northern England and Scotland. *Journal of Insect Conservation*, 5, 37–45

- Eyre, M. D., Woodward, J. C., Sanderson, R. A. 2005. Assessing the relationship between grassland Auchenorrhyncha (Homoptera) and land cover. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 109, 187–191
- Fisher-Barham, D., Stewart, A. J. A. 2005. Differential indirect effects of excluding livestock and rabbits from chalk heath on the associated leafhopper (Hemiptera: Auchenorrhyncha) fauna. *Journal of Insect Conservation*, 9, 4: 351–36
- Folmer O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology*, 3, 5: 294–299
- Fowler-Finn, K. D., Rodríguez, R. L. 2013. Repeatability of mate preference functions in *Enchenopa* treehoppers (Hemiptera: Membracidae). *Animal Behaviour*, 85, 2: 493–499
- Futuyma, D. J. 2005. Progress on the Origin of Species. *PLoS Biology*, 3, 2: 197–199
- Gee, J. M. 2005. No species barrier by call in an avian hybrid zone between California and Gambel's quail (*Callipepla californica* and *C. gambelii*). *Biological Journal of the Linnean Society*, 86, 253–264
- Gerhardt, H. C., Huber, F. 2002. *Acoustic Communication in Insects and Anurans: Common Problems and Diverse Solutions*. Chicago, University of Chicago Press: 535 str.
- Grace, J. L., Shaw, K. L. 2011. Coevolution of male mating signal and female preference during early lineage divergence of the Hawaiian cricket, *Laupala cerasina*. *Evolution*, 65, 8: 2184–2196
- Grace, J. L., Shaw, K. L. 2012. Incipient sexual isolation in *Laupala cerasina*: females discriminate population-level divergence in acoustic characters. *Current Zoology*, 58, 416–425
- Gray, D. A. 2005. Does courtship behavior contribute to species-level reproductive isolation in field crickets? *Behavioral Ecology*, 16, 1: 201–206
- Gröning, J., Hochkirch, A. 2008. Reproductive interference between animal species. *The Quarterly Review of Biology*, 83, 3: 257–282

- Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Chaumeil, P., LéGer, P., Lepais, O., Lepoittevin, C., Malausa, T., Revardel, E., Salin, F., Petit, R. J. 2011. Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources*, 11, 4: 591–611
- Hamilton, K. G. A. 1975. A review of the Northern hemisphere Aphrodina (Rhynchota: Homoptera: Cicadellidae) with special reference to the Nearctic fauna. *Canadian Entomologist*, 107, 1009–1027
- Hamilton, K. G. A. 1983. Introduced and native leafhoppers common to the old and new worlds (Rhynchota: Homoptera: Cicadellidae). *Canadian Entomologist*, 115, 473–511
- Hayashi, F., Kimura, Y. 2002. The potential for incorporation of male derived proteins into developing eggs in the leafhopper *Bothrogonia ferruginea*. *Journal of Insect Physiology*, 48, 153–159
- Heady, S. E. 1993. Factors affecting female sexual receptivity in the planthopper *Prokelisia dolus*. *Physiological Entomology*, 18, 263–270
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., deWaard, J. R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society*, 270, 1512: 313–321
- Helden, A. J. 2005 *Aphrodes aestuarina* (Edwards), a leafhopper (Hem.) new to Ireland, with some notes on its status and identification. *Entomologist's Monthly Magazine*, 141, 161–162
- Henry, C. S., Brooks, S. J., Duelli, P., Johnson, J. B., Wells, M. M., Mochizuki, A. 2013. Obligatory duetting behaviour in the *Chrysoperla carnea* group of cryptic species (Neuroptera: Chrysopidae): its role in shaping evolutionary history. *Biological Reviews*, 88, 4: 787–808
- Henry, C. S., Wells, M. L. M. 2004. Adaptation or random change? The evolutionary response of songs to substrate properties in lacewings (Neuroptera: Chrysopidae: Chrysoperla). *Animal Behaviour*, 68, 4: 879–895
- Henry, C. S., Wells, M. M. 2010. Acoustic niche partitioning in two cryptic sibling species of *Chrysoperla* green lacewings that must duet before mating. *Animal Behaviour*, 80, 6: 991–1003

- Henry, C. S., Wells, M. L. M., Holsinger, K. E. 2002. The inheritance of mating songs in two cryptic, sibling lacewing species (Neuroptera: Chrysopidae: Chrysoperla). *Genetica*, 116: 269–289
- Henry, C. S., Wells M. L. M., Simon C. M., 1999. Convergent evolution of courtship songs among cryptic species of the *carnea* group of green lacewings (Neuroptera: Chrysopidae: Chrysoperla). *Evolution* 53, 4, 1165–1179
- Hewitt, G., 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405, 907–913
- Hill, P. S. M. 2009. How do animals use substrate-borne vibrations as an information source? *Naturwissenschaften*, 96, 12: 1355–1371
- Hollier, J. A., Brown, V. K. Edwards-Jones, G. 1994. Successional leafhopper assemblages: pattern process. *Ecological Research*, 9, 185–191
- Holzinger, W. E., Seljak, G. 2001. New records of planthoppers and leafhoppers from Slovenia with a checklist of hitherto recorded species (Hemiptera: Auchenorrhyncha). *Acta Entomologica Slovenica*, 9, 38–66
- Honda-Sumi, E. 2005. Difference in calling song of three field crickets of the genus *Teleogryllus*: the role in premating isolation. *Animal Behaviour*, 69, 4: 881–889
- Hosken, D. J., Stockley, P. 2004. Sexual selection and genital evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 19, 2: 87–93
- Hoskin, C. J., Higgie, M. 2010. Speciation via species interactions: the divergence of mating traits within species. *Ecology Letters*, 13, 4: 409–420
- Hoy, M. A. 2003. *Insect Molecular Genetics: An introduction to Principles and Applications*. 2<sup>nd</sup> ed. USA, Academic Press: 544 str.
- Hunt, R. E., Fox, J. P., Haynes, K. F. 1992. Behavioral response of *Graminella nigrifrons* (Homoptera: Cicadellidae) to experimentally manipulated vibrational signals. *Journal of insect behavior*, 5, 1: 1–13
- Hunt, R. E., Nault, L. R. 1991. Roles of interplant movement, acoustic communication, and phototaxis in mate-location behavior of the leafhopper *Graminella nigrifrons*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 28, 5: 315–320



- Huusela-Veistola, E. Vasarainen, A. 2000. Plant succession in perennial grass strips and effects on the diversity of leafhoppers (Homoptera, Auchenorrhyncha). *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 80, 101–112
- Jang, Y., Gerhardt, H. C. 2006. Divergence in female calling song discrimination between sympatric and allopatric populations of the southern wood cricket *Gryllus fultoni* (Orthoptera: Gryllidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 60, 2: 150–158
- Jobin, A., Schaffner, U., Nentwig, W. 1996. The structure of the phytophagous insect fauna on the introduced weed *Solidago altissima* in Switzerland. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 79, 33–42
- Kattwinkel, M., Strauss, B., Biedermann, R., Kleyer, M. 2009. Modelling multi-species response to landscape dynamics: mosaic cycles support urban biodiversity. *Landscape Ecology*, 24, 7: 929–941
- Kattwinkel, M., Biedermann, R., Kleyer, M. 2011. Temporary conservation for urban biodiversity. *Biological Conservation*, 144, 2335–2343
- Keathley, C. P., Potter, D. A. 2012. Arthropod abundance in tall fescue, *Lolium arundinaceum*, pastures containing novel “safe” endophytes: Arthropod abundance in novel endophyte pastures. *Journal of Applied Entomology*, 136, 8: 576–587
- Kibbe, W. A. 2007. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Research*, 35(Web Server): W43–W46
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 15, 111–120
- Klymus, K. E., Humfeld, S. C., Gerhardt, H. 2012. Geographical variation in male advertisement calls and female preference of the wide-ranging canyon treefrog, *Hyla arenicolor*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 107, 1: 219–232
- Kokko, H., Jennions, M. D., Brooks, R. 2006. Unifying and testing models of sexual selection. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 37, 1: 43–66
- Kokko, H., Rankin, D. J. 2006. Lonely hearts or sex in the city? Density-dependent effects in mating systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 361, 1466: 319–334

- Kozak, G. M., Reiland, M., Boughmann, J. W. 2009. Sex differences in mate recognition and conspecific preference in species with mutual mate choice. *Evolution*, 63, 2: 353–365
- Kőrösi, A., Batáry, P., Orosz, A., Rédei, D., Báldi, A. 2012. Effects of grazing, vegetation structure and landscape complexity on grassland leafhoppers (Hemiptera: Auchenorrhyncha) and true bugs (Hemiptera: Heteroptera) in Hungary. *Insect Conservation and Diversity*, 5, 1: 57–66
- Kraaijeveld, K., Kraaijeveld-Smit, F. J. L., Maan, M. E. 2010. Sexual selection and speciation: the comparative evidence revisited. *Biological Reviews*, 86, 2: 367–377
- Kunz G., Nickel H., Niedringhaus R. 2011. Fotoatlas der Zikaden Deutschlands (Photographic Atlas of the Planthoppers and Leafhoppers of Germany). Scheeßel, Wissenschaftlich Akademischer Buchvertrieb-Fründ: 293 str.
- Le Quesne, W.J. 1965. The establishment of the relative status of sympatric forms with special reference to cases among the Hemiptera. *Zoologische Beiträge (N.F.)*, 11, 117–128
- Lee, I.-M., Gundersen-Rindal, D. E., Bertraccini, A. 1998. Phytoplasma: ecology and genomic diversity. *Phytopathology*, 88, 1359–1366
- Legendre, F., Marting, P. R., Cocroft, R. B. 2012. Competitive masking of vibrational signals during mate-searching in a treehopper. *Animal Behaviour*, 83, 361–368
- Maan, M. E., Seehausen, O. 2011. Ecology, sexual selection and speciation: Ecology, sexual selection and speciation. *Ecology Letters*, 14, 6: 591–602
- Maczey, N., Masters, G. J., Hollier, J. A., Mortimer, S. R., Brown, V. K. 2005. Community associations of chalk grassland leafhoppers (Hemiptera: Auchenorrhyncha): conclusions for habitat conservation. *Journal of Insect Conservation*, 9, 4: 281–298
- Marie Curie SPECIATION Network. 2011. What do we need to know about speciation? *Trends in Ecology and Evolution*, 27, 27–39
- Mayr, E. 1942. Systematics and the origin of species, from the viewpoint of a zoologist. Cambridge, Harvard University Press: 337 str.

- Mazzoni, V., Prešern, J., Lucchi, A., Virant-Doberlet, M. 2009. Reproductive strategy of the Nearctic leafhopper *Scaphoideus titanus* Ball (Hemiptera: Cicadellidae). *Bulletin of Entomological Research*, 99, 04: 401
- McNett, G. D., Cocroft, R. B. 2008. Host shifts favor vibrational signal divergence in *Enchenopa binotata* treehoppers. *Behavioral Ecology*, 19, 3: 650–656
- Megléczy, E., Costedoat, C., Dubut, V., Gilles, A., Malausa, T., Pech, N., Martin, J-F. 2010. QDD: a user-friendly program to select microsatellite markers and design primers from large sequencing projects. *Bioinformatics*, 26, 3: 403–404
- Mendelson, T. C., Shaw, K. L. 2002. Genetic and behavioral components of the cryptic species boundary between *Laupala cerasina* and *L. kohalensis* (Orthoptera: Gryllidae). *Genetica*, 116, 2-3 : 301-310
- Morris, M. G., Clarke, R. T., Rispin, W. E. 2005. The success of a rotational grazing system in conserving the diversity of chalk grassland Auchenorrhyncha. *Journal of Insect Conservation*, 9, 4: 363–374
- Mullen, S. P., Mendelson, T. C., Schal, C., Shaw, K. L. 2007. Rapid evolution of cuticular hydrocarbons in a species radiation of acoustically diverse Hawaiian crickets (Gryllidae: Trigonidiinae: Laupala). *Evolution*, 61, 1: 223–231
- Nast, J. 1972. Palaearctic Auchenorrhyncha (Homoptera) An Annotated Check List. Warsaw, Polish Scientific Publishers: 550 str.
- Nast, J. 1987. The Auchenorrhyncha (Homoptera) of Europe. *Annales Zoologici Warszawa*, 40, 535–661
- Nickel, H. 2003. The Leafhoppers and Planthoppers of Germany (Hemiptera: Auchenorrhyncha): Patterns and Strategies in a Highly Diverse Group of Phytophagous Insects. Sofia-Moscow, Pensoft Publishers and Keltern, Goecke & Evers: 460 str.
- Nickel, H., Achtziger, R. 2005. Do they ever come back? Responses of leafhopper communities to extensification of land use. *Journal of Insect Conservation*, 9, 4: 319–333
- Nickel, H., Remane, R. 2002. Check list of the planthoppers and leafhoppers of Germany, with notes on food plants, diet width, life cycles, geographic range and

- conservation status (Hemiptera, Fulgoromorpha and Cicadomorpha). *Beiträge zur Zikadenkunde*, 5: 27–67
- Noh, S., Henry, C. S. 2010. Sexually monomorphic preferences contribute to premating isolation based on song in European green lacewings. *Evolution*, 64, 1: 261–270
- Ossiannilsson, F. 1949. Insect drummers. A study on morphology and function of the sound producing organ of Swedish Homoptera Auchenorrhyncha with notes on their sound production. Lund, *Opuscula Entomologica*: 146 str.
- Owens, I. P. F. Thompson, D. B. A. 1994. Sex differences, sex ratios and sex roles. *Proceedings of the Royal Society B*, 258: 93–99
- Panhuis, T. M., Butlin, R., Zuk, M., Tregenza, T. 2001. Sexual selection and speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, 16, 7: 364–371
- Park S. 2001. Microsatellite Toolkit. Ireland, Genetics Department TCD: 1 str.  
<http://oscar.gen.tcd.ie/sdepark/ms-toolkit> (januar 2012)
- Pillay, N., Rymer, T. L. 2012. Behavioural divergence, interfertility and speciation: A review. *Behavioural Processes*, 91, 3: 223–235
- Pipan, B., Šuštar-Vozlič, J., Meglič, V. 2013. Genetic differentiation among sexually compatible relatives of *Brassica napus* L. *Genetika*, 45, 2: 309–327
- Pringle, J. W. S. 1957. The structure and evolution of the organs of sound-production in Cicadas. *Proceedings of the Linnean Society of London*: 144–159
- Ptacek, M. B. 2000. The role of mating preferences in shaping interspecific divergence in mating signals in vertebrates. *Behavioural Processes*, 51, 1: 111–134
- Rasband, W. 2006. IMAGEJ. US National institute of Health, Bethesda, Maryland, USA. <http://image.nih.gov/ij/>, 1997–2012
- Ratcliffe, L. M., Grant, P. R. 1985. Species recognition in Darwin's finches (*Geospiza*, Gould). III, Male responses to playback of different song types, dialects and heterospecific songs. *Animal Behaviour*, 33, 290–307
- Ribaut, H. 1936. Homoptères Auchenorrhynques I (Typhlocibidae). *Faune de France*, 31, 1–231

- Riedle-Bauer, M., Sára, A., Regner, F. 2008. Transmission of a Stolbur Phytoplasma by the Agalliinae Leafhopper *Anaceratagallia ribauti* (Hemiptera, Auchenorrhyncha, Cicadellidae). *Journal of Phytopathology*, 156, 11-12: 687–690
- Ritchie, M. G. 2007. Sexual Selection and Speciation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 38, 1: 79–102
- Rodríguez, R. L., Cocroft, R. B. 2006. Divergence in female duetting signals in the *Enchenopa binotata* species complex of treehoppers (Hemiptera: Membracidae). *Ethology*, 112, 12: 1231–1238
- Rodríguez, R. L., Haen, C., Cocroft, R. B., Fowler-Finn, K. D. 2012. Males adjust signaling effort based on female mate-preference cues. *Behavioral Ecology*, 23, 6: 1218–1225
- Rodríguez, R. L., Ramaswamy, K., Cocroft, R. B. 2006. Evidence that female preferences have shaped male signal evolution in a clade of specialized plant-feeding insects. *Proceedings of the Royal Society*, 273, 1601: 2585–2593
- Rodríguez, R. L., Sullivan, L. E. Cocroft, R. B. 2004. Vibrational communication and reproductive isolation in the *Enchenopa binotata* species complex of treehoppers (Hemiptera: Membracidae). *Evolution*, 58, 571–578
- Rundle, H. D., Nosil, P. 2005. Ecological speciation. *Ecology Letters*, 8, 3: 336–352
- Ryan, M. J., Bernal, X. E., Rand, A. S. 2010. Female mate choice and the potential for ornament evolution in túngara frogs *Physalaemus pustulosus*. *Current Zoology*, 56, 3: 343–357
- Ryan, M. J., Keddy-Hector, A. 1992. Directional patterns of female mate choice and the role of sensory biases. *American Naturalist*, 139, S4–S35
- Ryan, M. J., Rand, A. S. 1993. Species recognition and sexual selection as a unitary problem in animal communication. *Evolution*, 47, 647–657
- Ryan, M. J., Rand, A. S. 1995. Female responses to ancestral advertisement calls in túngara frogs. *Science*. 269, 390–390
- Ryan, M. J., Rand, W., Hurd, P. L., Phelps, S. M., Rand, A. S. 2003. Generalization in response to mate recognition signals. *The American Naturalist*, 161, 3: 380–394

- Safran, R. J., Scordato, E. S. C., Symes, L. B., Rodríguez, R. L., Mendelson, T. C. 2013. Contributions of natural and sexual selection to the evolution of premating reproductive isolation: a research agenda. *Trends in Ecology & Evolution*, 28, 11: 643–650
- Santana, Q., Coetzee, M., Steenkamp, E., Mlonyeni, O., Hammond, G., Wingfield, M., Wingfield, B. D. 2009. Microsatellite discovery by deep sequencing of enriched genomic libraries. *BioTechniques*, 46, 3: 217–223
- Schlick-Steiner, B. C., Steiner, F. M., Seifert, B., Stauffer, C., Christian, E., Crozier, R. H. 2010. Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity. *Annual Review of Entomology*, 55, 1: 421–438
- Schoebel, C. N., Brodbeck, S., Buehler, D., Cornejo, C., Gajurel, J., Hartikainen, H., Keller, D., Leys, M., Řičanová, Š., Segelbacher, G., Werth, S., Csencsics, D. 2013. Lessons learned from microsatellite development for nonmodel organisms using 454 pyrosequencing. *Journal of Evolutionary Biology*, 26, 3: 600–611
- Schuch, S., Bock, J., Krause, B., Wesche, K., Schaefer, M. 2012. Long-term population trends in three grassland insect groups: a comparative analysis of 1951 and 2009. *Journal of Applied Entomology*, 136, 321–331
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature biotechnology*, 18, 2: 233–234
- Seehausen, O., Terai, Y., Magalhaes, I. S., Carleton, K. L., Mrosso, H. D. J., Miyagi, R., van der Sluijs, I., Schneider, M.V., Maan, M.E., Tachida, H., Imai, H., Okada, N. 2008. Speciation through sensory drive in cichlid fish. *Nature*, 455, 7213: 620–626
- Seljak, G. 2004. Contribution to the knowledge of planthoppers and leafhoppers of Slovenia (Hemiptera: Auchenorrhyncha). *Acta Entomologica Slovenica*, 12:189–216
- Selkoe, K. A., Toonen R., J. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9: 615–629
- Servedio, M. R. 2007. Male versus mate choice: sexual selection and the evolution of species recognition via reinforcement. *Evolution*, 61, 12: 2772–2789
- Servedio, M. R., Lande, R. 2006. Population genetic models of male and mutual mate choice. *Evolution*, 60, 4: 674–685

- Servedio, M. R., Noor, M. A. F. (2003). The role of reinforcement in speciation: theory and data. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 34, 339–364
- Shapiro, A.M., Porter, A.H. 1989. The key-and-lock hypothesis: evolutionary and biosystematic interpretation of insect genitalia. *Annual Review of Entomology*, 34, 231–245
- Shaw, K. L., Ellison, C. K., Oh, K. P., Wiley, C. 2011. Pleiotropy, “sexy” traits and speciation. *Behavioral Ecology*, 22, 1154-1155.
- Simon, C., Buckley, T. R., Frati, F., Stewart, J. B., Beckenbach, A. T. 2006. Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis, and a new compilation of conserved polymerase chain reaction primers for animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 37, 1: 545–579
- Strauss, B., Biedermann, R. 2006. Urban brownfields as temporary habitats: driving forces for the diversity of phytophagous insects. *Ecography*, 29, 6: 928–940
- Strauss, B., Biedermann, R. 2008. Fit for succession – community structure and life strategies of leafhoppers in urban brownfields. *Ecological Entomology*, 33, 107–1184
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. 2011. MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731–2739
- Thompson, J. D., Gibson, T. J. Plewiak, F., Jeanmougin, F. Higgins, D. G. 1997. Clustal X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Research*, 25, 4876–4882
- Tishechkin, D.Yu. 1998. Acoustic signals and morphological characters of leafhoppers belonging to *Aphrodes bicinctus* group (Homoptera, Cicadellidae) from European Russia. *Entomological Review*, 78, 370-377
- Tishechkin, D. Y. 2000. Vibrational communication in Aphrodinae leafhoppers (Deltocephalinae auct. Homoptera: Cicadellidae). *Russian Entomological Journal*, 9, 1–66
- Tishechkin, D.Yu. 2002. Review of the species of the genus *Macropsis* Lewis, 1934 (Homoptera: Cicadellidae: Macropsinae) from European Russia and adjacent territories. *Russian Entomological Journal*, 11, 123-184

- Trivellone, V., Pollini Paltrinier, L., Jermini, M., Moretti, M. 2012. Management pressure drives leafhopper communities in vineyards in Southern Switzerland. *Insect Conservation and Diversity*, 5, 75–85
- Verzijden, M. N., van Heusden, J., Bouton, N., Witte, F., ten Cate, C., Slabbekoorn, H. 2010. Sounds of male Lake Victoria cichlids vary within and between species and affect female mate preferences. *Behavioral Ecology*, 21, 3: 548–555
- Virant-Doberlet, M., Čokl, A. 2004. Vibrational communication in insects. *Neotropical Entomology*, 33, 2: 121–134
- Virant-Doberlet, M., Čokl, A., Zorović, M. 2006a. Use of substrate vibrations for orientation: from behaviour to physiology. In: *Insect Sounds and Communication: Physiology, Behaviour, Ecology and Evolution* (Ed. by S. Drosopoulos & M. F. Claridge), Boca Raton, Florida: Taylor & Francis: 81–97 str.
- Virant-Doberlet, M., King, R. A., Polajnar, J., Symondson, W.O.C. 2011. Molecular diagnostics reveal spiders that exploit prey vibrational signals used in sexual communication. *Molecular Ecology*, 20, 2204–2216
- Virant-Doberlet, M., Prešern, J., Bluemel, J., King, R. A., Symondson, W. O. C., Wilson, M. R., Stewart, A. J. A. 2006b. Vibrational signals and reproductive isolation in the genus *Aphrodes* (Hemiptera: Cicadellidae). V: 11th International Meeting on Invertebrate Sound and Vibration, Toronto, Canada, 8. – 11. Avgust 2006. Mason, A. C. (ur.). University of Toronto at Scarborough: 39–40
- Wagner H. W., Sefc K. M. 1999. IDENTITY 1.0. Vienna, University of Agricultural Sciences, Centre for Applied Genetics: 5 str.  
<http://www.uni-graz.at/~sefck/manual.pdf> (januar 2011)
- Wagner, W. 1937. Zur Synonymie der deutschen *Aphrodes*-Arten (Hem. Hom). *Verhandlungen des Verein für naturwissenschaftliches Heimatforschung*, 26, 65–70
- Weintraub, P. G., Beanland, L. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology*, 51, 1: 91–111
- Wells, M. M., Henry, C. S. 1998. Songs, reproductive isolation and speciation in cryptic species of insects: a case study using green lacewings. In: *Endless Forms: Species and Speciation* (Ed. by D. J. Howard & S. H. Berlocher). New York, Oxford University Press: 217–233



- West-Eberhard, M. J., 1983. Sexual selection, social competition and speciation. *Quarterly Review of Biology*, 58, 155–183
- Wickman, P.-O., Rutowski, R. L. 1999. The evolution of mating dispersion in insects. *Oikos*, 463–472.
- Wilkins, M. R., Seddon, N., Safran, R. J. 2013. Evolutionary divergence in acoustic signals: causes and consequences. *Trends in Ecology & Evolution*, 28, 3: 156–166
- Wojcieszek, J. M., Simmons, L. W. 2013. Divergence in genital morphology may contribute to mechanical reproductive isolation in a millipede. *Ecology & Evolution*, 3, 334–343
- Wood, T. K., Guttman, S. I. 1983. *Enchenopa binotata* complex: sympatric speciation. *Science*, 220, 310–312
- Wyman, M. T., Charlton, B. D., Locatelli, Y., Reby, D. 2011. Variability of female responses to conspecific vs. heterospecific male mating calls in polygynous deer: an open door to hybridization. *PLoS One*, 6, e23296
- You, F. M., Huo, N., Gu, Y., Luo, M., Ma, Y., Hane, D., Lazo, G. R., Dvorak, J., Anderson, O. D. 2008. BatchPrimer3: A high throughput web application for PCR and sequencing primer design. *BMC Bioinformatics*, 9, 1: 253
- Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular ecology*, 11, 1: 1–16

## ZAHVALA

Že drugič (prvič ob diplomi) sem imela srečo, da sem bila pod okriljem mentorice v pravem pomenu te besede. Mentorici doc. dr. Meti Virant-Doberlet se iskreno zahvaljujem za nenehno usmerjanje (ni minil teden brez sestanka), pozorno sledenje mojim rezultatom (včasih sem še sama pozabila, kaj sem počela) in da je delila z mano vse znanje, da je lahko nastala pričujoča doktorska disertacija. Nenazadnje, da je podpirala vse moje odhode v tujino, bolj ali manj povezane z mojim delom.

Hvala vsem sodelavcem z Oddelka za entomologijo (Andreju, Andreji, Anki, Alenki, Danilu, Jasni, Jerneju, Maji, Meti, Nataši, Veri) za vedno prijetno vzdušje v skupini.

Hvala Petri in Maartenu za predajanje škržatkoslovnega znanja mlajšim generacijam.

Hvala Barbari za neprecenljive bolj ali manj strokovne trenutke. Hvala vsem sodelavcem v genetskem laboratoriju Kmetijskega inštituta Slovenije za dobro sodelovanje.

Hvala članom komisije prof. dr. Andreju Čoklu, prof. dr. Dušanu Devetaku in doc. dr. Rudiju Verovniku za hitre preglede, vse komentarje in prijazno sodelovanje tekom postopka do zagovora.

Hvala vsem, ki ste hodili z mano na teren in še posebej tistim, ki ste hodili ob nenavadnih urah na nenavadne lokacije. Še posebej vsem kmetom, ki tega ne vejo.

Hvala prijateljem, da ste me podpirali, četudi nisem dovolj dobro razložila kaj počnem in upam, da boste sedaj vedeli bolje. Hvala družini, da me je podpirala ob vsem mojem pomanjkanju časa. Hvala Luku, za vse.

PRILOGA A

Seznam osebkov, ki so bili vključeni v vedenjsko, morfološko in/ali genetsko analizo (Bluemel in sod., 2014).

List of specimens included in behavioural, morphological and/or genetical analysis (Bluemel in sod., 2014).

| Lokacija           | Habitatni tip/Dominantna rastlina                                 | Nadmorska višina (m) | Osebek | Vibracijski napev | COI haplotip  |
|--------------------|---|----------------------|--------|-------------------|---------------|
| Holne-next-the-sea | tidal saltmarsh/ <i>Atriplex</i>                                  | 0                    | HM1    | makarovi          | makarovi-h1   |
|                    |   |                      | HM2    | makarovi          | makarovi-h1   |
|                    |   |                      | HM3    | makarovi          | makarovi-h1   |
|                    |   |                      | HM4    | makarovi          | makarovi-h1   |
| Overy Marsh        | tidal saltmarsh/ <i>Atriplex</i>                                  | 0                    | OM2    | aestuarina        | aestuarina-h2 |
|                    |   |                      | OM3    | aestuarina        | aestuarina-h2 |
|                    |   |                      | OM4    | aestuarina        | aestuarina-h2 |
|                    |   |                      | OM5    | aestuarina        | aestuarina-h2 |
| Stiffkey Marsh     | tidal saltmarsh/ <i>Atriplex</i>                                  | 0                    | STM2   | aestuarina        | aestuarina-h2 |
|                    |   |                      | STM4   | aestuarina        | aestuarina-h2 |
| Morston Quay       | tidal saltmarsh/ <i>Atriplex</i>                                  | 0                    | MQM2   | aestuarina        | aestuarina-h2 |
|                    |   |                      | MQM3   | aestuarina        | aestuarina-h2 |
| Wells East Quay    | tidal saltmarsh/ <i>Atriplex</i>                                  | 0                    | WM1    | aestuarina        | aestuarina-h3 |
|                    |   |                      | WM2    | aestuarina        | aestuarina-h3 |
|                    |   |                      | WM3    | aestuarina        | aestuarina-h2 |
|                    |   |                      | WM4    | aestuarina        | aestuarina-h2 |
|                    |   |                      | WM5    | aestuarina        | aestuarina-h2 |
| Warham Marsh       | tidal saltmarsh/ <i>Atriplex</i> , costal footpath/ <i>Urtica</i> | 0-5                  | WHM1   | makarovi          | makarovi-h1   |
|                    |   |                      | WHM2   | makarovi          | makarovi-h4   |
|                    |   |                      | WHM4   | makarovi          | makarovi-h1   |
|                    |   |                      | WHF1   | -                 | makarovi-h1   |
|                    |   |                      | WHF2   | -                 | makarovi-h4   |

Se nadaljuje

Nadaljevanje

| Lokacija      | Habitatni tip/Dominantna rastlina                                 | Nadmorska višina (m) | Osebek | Vibracijski napev | COI haplotip  |
|---------------|---|----------------------|--------|-------------------|---------------|
| Warham Marsh  | tidal saltmarsh/ <i>Atriplex</i> , costal footpath/ <i>Urtica</i> | 0-5                  | WHF3   | -                 | makarovi-h1   |
|               |   |                      | WHNF1  | -                 | makarovi-h1   |
|               |   |                      | WHNF2  | -                 | makarovi-h1   |
| Blakney Quay  | tidal saltmarsh/ <i>Atriplex</i>                                  | 0                    | BQM1   | aestuarina        | aestuarina-h2 |
| Horsey Island | tidal saltmarsh/ <i>Atriplex</i>                                  | 0                    | HSF1   | -                 | aestuarina-h1 |
|               |   |                      | HSF2   | -                 | aestuarina-h1 |
| Canvey Bridge | tidal saltmarsh/ <i>Atriplex</i>                                  | 0                    | CBM1   | makarovi          | makarovi-h1   |
|               |   |                      | CBM2   | makarovi          | makarovi-h1   |
|               |   |                      | CBF3   | -                 | aestuarina-h3 |
|               |   |                      | CBF2   | -                 | makarovi-h1   |
|               |   |                      | CBF4   | -                 | makarovi-h1   |
| Canvey Island | tidal saltmarsh/ <i>Atriplex</i>                                  | 0                    | CIM1   | aestuarina        | aestuarina-h4 |
| Pegwell Bay   | tidal saltmarsh/ <i>Atriplex</i>                                  | 0                    | PBM5   | -                 | makarovi-h13  |
|               |   |                      | PBM6   | -                 | makarovi-h13  |
|               |   |                      | PBF1   | -                 | makarovi-h13  |
|               |   |                      | PBF2   | -                 | makarovi-h13  |
| Rye Harbour   | tidal saltmarsh/ <i>Atriplex</i>                                  | 0                    | RHF1   | -                 | aestuarina-h1 |
|               |   |                      | RHF2   | -                 | aestuarina-h1 |
|               |   |                      | RHF3   | -                 | aestuarina-h1 |
|               |   |                      | RHF4   | -                 | aestuarina-h1 |
|               |   |                      | RHF5   | -                 | aestuarina-h1 |
|               |   |                      | RHF6   | -                 | aestuarina-h1 |
|               |   |                      | RHF8   | -                 | aestuarina-h1 |
|               |   |                      | RHF9   | -                 | aestuarina-h1 |

Se nadaljuje

Nadaljevanje

| Lokacija       | Habitatni tip/Dominantna rastlina | Nadmorska višina (m) | Osebek | Vibracijski napev | COI haplotip  |
|----------------|-----------------------------------|----------------------|--------|-------------------|---------------|
| Shoreham       | tidal saltmarsh/ <i>Atriplex</i>  | 0                    | S1AM1  | aestuarina        | aestuarina-h1 |
|                |                                   |                      | S1AM2  | aestuarina        | aestuarina-h1 |
|                |                                   |                      | S2AM2  | aestuarina        | aestuarina-h1 |
|                |                                   |                      | S2AM3  | aestuarina        | aestuarina-h1 |
|                |                                   |                      | S2AM4  | aestuarina        | aestuarina-h1 |
|                |                                   |                      | S2AM5  | aestuarina        | aestuarina-h1 |
|                |                                   |                      | S2AF1  | aestuarina        | aestuarina-h1 |
|                |                                   |                      | S2AF2  | aestuarina        | aestuarina-h1 |
|                |                                   |                      | S2AF3  | aestuarina        | aestuarina-h1 |
| Pagham Harbour | tidal saltmarsh/ <i>Atriplex</i>  | 0                    | PF4    | aestuarina        | aestuarina-h5 |
| Castle Hill 1  | path border/ <i>Urtica</i>        | 166                  | CHXMM2 | makarovi          | makarovi-h1   |
|                |                                   |                      | CHXMM4 | makarovi          | makarovi-h1   |
|                |                                   |                      | CHXMM5 | makarovi          | -             |
|                |                                   |                      | CHXMM6 | makarovi          | -             |
|                |                                   |                      | CHXMM7 | makarovi          | -             |
|                |                                   |                      | CHXMM9 | makarovi          | -             |
|                |                                   |                      | CHXMF1 | makarovi          | makarovi-h1   |
|                |                                   |                      | CHXMF2 | makarovi          | makarovi-h7   |
|                |                                   |                      | CSMF1  | makarovi          | makarovi-h1   |
| Castle Hill 2  | chalk grassland meadow            | 126                  | CH1DM1 | diminuta          |               |
|                |                                   |                      | CH1DM2 | diminuta          | diminuta-h3   |
|                |                                   |                      | CH1DM3 | diminuta          | diminuta-h1   |
|                |                                   |                      | CH1DM5 | diminuta          | -             |
|                |                                   |                      | CH2DM1 | diminuta          | -             |
|                |                                   |                      | CH2MF1 | makarovi          | -             |
|                |                                   |                      | CH2MF2 | makarovi          | makarovi-h1   |
|                |                                   |                      | CH2MF3 | makarovi          | -             |

Se nadaljuje

Nadaljevanje

| Lokacija     | Habitatni tip/Dominantna rastlina | Nadmorska višina (m) | Osebek | Vibracijski napev | COI haplotip |      |          |             |
|--------------|-----------------------------------|----------------------|--------|-------------------|--------------|------|----------|-------------|
| Mountain Ash | brown field site/Fabaceae         | 114                  | ABM1   | bicincta          | bicincta-h2  |      |          |             |
|              |                                   |                      | ABM2   | bicincta          | bicincta-h3  |      |          |             |
|              |                                   |                      | ABM3   | bicincta          | bicincta-h1  |      |          |             |
|              |                                   |                      | ABM5   | bicincta          | -            |      |          |             |
|              |                                   |                      | ABM6   | bicincta          | -            |      |          |             |
|              |                                   |                      | ABM7   | bicincta          | -            |      |          |             |
|              |                                   |                      | ABM8   | bicincta          | -            |      |          |             |
|              |                                   |                      | ABM9   | bicincta          | -            |      |          |             |
|              |                                   |                      | ABM10  | bicincta          | -            |      |          |             |
|              |                                   |                      | ABM11  | bicincta          | -            |      |          |             |
|              |                                   |                      | ABM12  | bicincta          | -            |      |          |             |
|              |                                   |                      | ABM13  | bicincta          | -            |      |          |             |
|              |                                   |                      | ABM14  | bicincta          | -            |      |          |             |
|              |                                   |                      | ABM15  | bicincta          | -            |      |          |             |
|              |                                   |                      | ABM16  | bicincta          | -            |      |          |             |
|              |                                   |                      | ABM18  | bicincta          | -            |      |          |             |
|              |                                   |                      | ABM19  | bicincta          | -            |      |          |             |
|              |                                   |                      | ABM20  | bicincta          | -            |      |          |             |
|              |                                   |                      |        |                   |              | ABF2 | bicincta | bicincta-h2 |
|              |                                   |                      |        |                   |              | ABF3 | bicincta | bicincta-h4 |
|              |                                   |                      | ABF4   | bicincta          | bicincta-h1  |      |          |             |
|              |                                   |                      | ABF5   | bicincta          | -            |      |          |             |
|              |                                   |                      | ABF6   | bicincta          | -            |      |          |             |
|              |                                   |                      | ABF7   | bicincta          | -            |      |          |             |
| Pen-clawdd   | grassland/ <i>Urtica</i>          | 10                   | PNM2   | makarovi          | makarovi-h1  |      |          |             |
|              |                                   |                      | PNF1   | -                 | makarovi-h1  |      |          |             |
|              |                                   |                      | PNF2   | -                 | makarovi-h1  |      |          |             |

Se nadaljuje

## Nadaljevanje

| Lokacija     | Habitatni tip/Dominantna rastlina   | Nadmorska višina (m) | Osebek          | Vibracijski napev             | COI haplotip |
|--------------|-------------------------------------|----------------------|-----------------|-------------------------------|--------------|
| Pen-clawdd   | grassland/ <i>Urtica</i>            | 10                   | PNF3            | -                             | makarovi-h1  |
|              |                                     |                      | PNF4            | -                             | makarovi-h1  |
|              |                                     |                      | PNF5            | -                             | makarovi-h1  |
| Lisvane      | field border/ <i>Urtica</i>         | 52                   | LSM1-08         | makarovi                      | makarovi-h3  |
|              |                                     |                      | LSM2-08         | makarovi                      | makarovi-h3  |
|              |                                     |                      | LSM3-08         | makarovi                      | makarovi-h1  |
|              |                                     |                      | LSM4-08         | makarovi                      | makarovi-h1  |
|              |                                     |                      | LSM5-08         | makarovi                      | makarovi-h1  |
|              |                                     |                      | LSM6-08         | makarovi                      | makarovi-h1  |
|              |                                     |                      | LSF1            | -                             | makarovi-h1  |
|              |                                     |                      | LSF2            | -                             | makarovi-h1  |
|              |                                     |                      | LSF3            | -                             | makarovi-h1  |
|              |                                     |                      | LSF4            | -                             | makarovi-h1  |
| Mačkovci     | pannonian grassland / <i>Urtica</i> | 306                  | mcM730          | makarovi                      | makarovi-sh4 |
|              |                                     |                      | Ledavsko jezero | pannonian grassland/ Fabaceae | 224          |
| Pod Poncami  | alpine meadow/ Fabaceae             | 885                  | pcM966          | diminuta                      | diminuta-sh1 |
|              |                                     |                      | pcM967          | diminuta                      | -            |
|              |                                     |                      | pcM968          | diminuta                      | diminuta-sh2 |
| Belca        | alpine grassland/ Fabaceae          | 678                  | bcM989          | diminuta                      |              |
|              |                                     |                      | bcM990          | diminuta                      | -            |
|              |                                     |                      | bcF1197         | diminuta                      | diminuta-sh6 |
|              |                                     |                      | bcF1201         | diminuta                      | -            |
|              |                                     |                      | bcF1214         | diminuta                      | diminuta-sh7 |
| Dolinka      | alpine meadow/ Fabaceae             | 636                  | dkF1275         | diminuta                      | -            |
| Plavški Rovt | alpine meadow/ Fabaceae             | 863                  | prM1000         | diminuta                      | diminuta-sh4 |
|              |                                     |                      | prM1001         | diminuta                      | diminuta-sh2 |

## Nadaljevanje

| Lokacija         | Habitatni tip/Dominantna rastlina | Nadmorska višina (m) | Osebek  | Vibracijski napev | COI haplotip |
|------------------|-----------------------------------|----------------------|---------|-------------------|--------------|
| Plavški Rovt     | alpine meadow/ Fabaceae           | 863                  | prM1002 | diminuta          | -            |
|                  |                                   |                      | prF1070 | diminuta          | -            |
|                  |                                   |                      | prF1274 | diminuta          | -            |
| Kočna            | alpine meadow/ Fabaceae           | 668                  | koM984  | diminuta          | diminuta-sh3 |
|                  |                                   |                      | koF1138 | diminuta          | diminuta-sh5 |
| Zgornje Jezersko | alpine meadow/ Fabaceae           | 883                  | zjM1059 | bicineta          | -            |
|                  |                                   |                      | zjF1304 | bicineta          | -            |
|                  |                                   |                      | zjF1307 | bicineta          | -            |
| Potoče           | alpine grassland/ Fabaceae        | 493                  | ptF1242 | bicineta          | -            |
|                  |                                   |                      | ptF1248 | bicineta          | -            |
| Podbela          | alpine grassland/ Fabaceae        | 463                  | pdM745  | makarovi          | makarovi-sh5 |
| Ljubljana        | alpine grassland/ <i>Urtica</i>   | 303                  | pbF862  | makarovi          | makarovi-sh5 |
|                  |                                   |                      | lpM254  | makarovi          | makarovi-sh2 |
|                  |                                   |                      | LJMM2   | makarovi          | -            |
|                  |                                   |                      | LJMM7   | makarovi          | -            |
| Neblo            | mediterranean grassland/ Fabaceae | 83                   | nbM696  | bicineta          | -            |
| Ozeljan          | mediterranean grassland/ Fabaceae | 84                   | ozF320  | bicineta          | -            |
| Stara Gora       | mediterranean meadow              | 118                  | sgF409  | makarovi          | makarovi-sh6 |
| Šempas           | mediterranean grassland           | 65                   | ssM514  | bicineta          | -            |
|                  |                                   |                      | ssF612  | makarovi          | makarovi-sh7 |
|                  |                                   |                      | ssF653  | bicineta          | -            |
|                  |                                   |                      | ssF685  | bicineta          | -            |
|                  |                                   |                      | ssF932  | bicineta          | -            |
| Malovše          | mediterranean grassland           | 158                  | mlM070  | makarovi          | -            |
|                  |                                   |                      | mlM075  | bicineta          | -            |
| Lokavec          | mediterranean grassland           | 134                  | lkM483  | makarovi          | -            |
|                  |                                   |                      | lkM470  | bicineta          | -            |



## Nadaljevanje

| Lokacija           | Habitatni tip/Dominantna rastlina                       | Nadmorska višina (m) | Osebek  | Vibracijski napev | COI haplotip |
|--------------------|---|----------------------|---------|-------------------|--------------|
| Lokavec            | mediterranean grassland                                 | 134                  | lkF282  | bicincta          | -            |
|                    |   |                      | lkF748  | bicincta          | bicincta-sh1 |
| Podnanos           | mediterranean karst grassland/ Fabaceae                 | 163                  | pnF317  | bicincta          | -            |
| Selo pri Štjaku    | mediterranean karst grassland                           | 509                  | seM167  | bicincta          | -            |
| Gabrje Podgorje    | dinaric grassland/ Fabaceae                             | 431                  | gbM873  | bicincta          | bicincta-sh1 |
|                    |   |                      | gbM874  | bicincta          | -            |
| Gospodična         | dinaric grassland/ Fabaceae                             | 826                  | gaM877  | diminuta          | -            |
| Krajna vas         | mediterranean karst grassland/ Fabaceae                 | 263                  | kvM584  | bicincta          | -            |
|                    |   |                      | kvM588  | bicincta          | bicincta-sh1 |
|                    |   |                      | kvF856  | bicincta          | -            |
| Križ               | mediterranean karst grassland/ Fabaceae                 | 318                  | kiF803  | bicincta          | bicincta-sh3 |
| Žirje              | mediterranean karst meadow                              | 388                  | zrM598  | bicincta          | -            |
|                    |   |                      | zrF817  | makarovi          | makarovi-sh2 |
|                    |   |                      | zrF830  | bicincta          | bicincta-sh1 |
|                    |   |                      | zrF839  | bicincta          | -            |
| Goriče             | mediterranean karst meadow/ Fabaceae - <i>Anthyllis</i> | 423                  | gf1220  | bicincta          | -            |
| Vrepolje           | mediterranean grassland                                 | 585                  | vpF1016 | makarovi          | -            |
| Vremščica          |   |                      |         |                   |              |
| Gorice pri Famljah | mediterranean karst meadow/ Fabaceae                    | 439                  | gfM625  | bicincta          | -            |
|                    |   |                      | gfM626  | bicincta          | -            |
|                    |   |                      | gfM629  | makarovi          | makarovi-sh2 |
|                    |   |                      | gf683   | makarovi          | makarovi-sh8 |
|                    |   |                      | gfF810  | bicincta          | bicincta-sh1 |
|                    |   |                      | gfF1093 | bicincta          | -            |
|                    |   |                      | gfF1094 | bicincta          | -            |
| Prelože Lokev      | mediterranean karst grassland/ Fabaceae                 | 461                  | plM088  | makarovi          | makarovi-sh1 |
|                    |   |                      | plF323  | makarovi          | -            |

Se nadaljuje

## Nadaljevanje

| Lokacija   | Habitatni tip/Dominantna rastlina                         | Nadmorska višina (m) | Osebek  | Vibracijski napev | COI haplotip |
|------------|---|----------------------|---------|-------------------|--------------|
| Lokev      | mediterranean karst grassland/ Fabaceae                   | 444                  | lvM608  | bicincta          | bicincta-sh2 |
|            |   |                      | lvM611  | bicincta          | bicincta-sh4 |
| Osp 2      | mediterranean karst meadow/ Fabaceae                      | 25                   | o2F336  | makarovi          | -            |
|            |   |                      | o2F338  | bicincta          | -            |
| Hotična    | mediterranean karst meadow/ Fabaceae                      | 550                  | hčM1308 | bicincta          | -            |
| Dragonja 4 | mediterranean grassland/Fabaceae - <i>Medicago sativa</i> | 31                   | d4M004  | makarovi          | -            |
|            |   |                      | D4MM1   | makarovi          | -            |
|            |   |                      | D4MM2   | makarovi          | -            |
|            |   |                      | d4F265  | makarovi          | -            |
|            |   |                      | D4MF1   | makarovi          | -            |
|            |   |                      | D4MF2   | makarovi          | -            |
|            |   |                      | D4MF3   | makarovi          | -            |
|            |   |                      | D4MF4   | makarovi          | -            |
|            |   |                      | D4MF5   | makarovi          | -            |
|            |   |                      | D4MF13  | makarovi          | -            |
|            |   |                      | D4MF15  | makarovi          | -            |
|            |   |                      | D4MF17  | makarovi          | -            |
|            |   |                      | D4MF18  | makarovi          | -            |
| Dragonja 2 | mediterranean grassland/Fabaceae - <i>Medicago sativa</i> | 26                   | d2M011  | makarovi          | -            |
|            |   |                      | d4F366  | makarovi          | -            |

## PRILOGA B

Seznam osebkov, ki so bili vključeni v vedenjsko, morfološko in/ali genetsko analizo.  
List of specimens added in behavioural, morphological and/or genetical analysis.

| <b>Lokacija</b> | <b>Osebek</b> | <b>Vibracijski napev</b> | <b>COI haplotip</b> |
|-----------------|---------------|--------------------------|---------------------|
| Adrijanci       | adF808        | makarovi                 | SH11                |
| Babno polje     | bpF955        | dragonja                 |                     |
|                 | bpF850        | dragonja                 | SH11                |
| Belca           | bcM995        | dragonja                 |                     |
| Dolga vas       | dvM764        | dragonja                 | SH1                 |
|                 | dvF853        | dragonja                 | SH12                |
|                 | dvF855        | dragonja                 |                     |
| Dolinka         | dkM1239       | dragonja                 |                     |
|                 | dkF1295       | diminuta                 | SH8                 |
| Dragonja 2      | d2M009        | dragonja                 |                     |
|                 | d2F377        | dragonja                 |                     |
| Dragonja 4      | d4M001        | dragonja                 |                     |
|                 | d4M006        | dragonja                 | SH5                 |
| Gabrje Podgorje | gfF810        | bicincta                 | SH1                 |
| Gospodična      | gaM942        | diminuta                 | SH9                 |
| Grobišče        | grM221        | dragonja                 | SH1                 |
|                 | grF393        | dragonja                 |                     |
|                 | grF394        | dragonja                 |                     |
| Hrastovlje      | hsM055        | makarovi                 | SH1                 |
|                 | hsM056        | dragonja                 |                     |
|                 | hsM093        | dragonja                 | SH5                 |
|                 | koF1139       | diminuta                 | SH7=H3              |
| Kortine         | ktM045        | dragonja                 |                     |
|                 | ktM047        | dragonja                 | SH5                 |
|                 | ktF349        | dragonja                 |                     |
|                 | ktF355        | dragonja                 |                     |
| Ljubljana       | ljF1118       | makarovi                 | SH12                |
| Lokavec         | lkM078        | dragonja                 |                     |
|                 | lkM110        | dragonja                 | SH1                 |
|                 | lkF283        | dragonja                 |                     |
|                 | lkF295        | dragonja                 |                     |
|                 | lkM465        | dragonja                 | SH10                |
|                 | lkM469        | bicincta                 | SH1                 |
|                 | lkM485        | bicincta                 | SH7                 |
|                 | lkF1041       | makarovi                 | SH2                 |

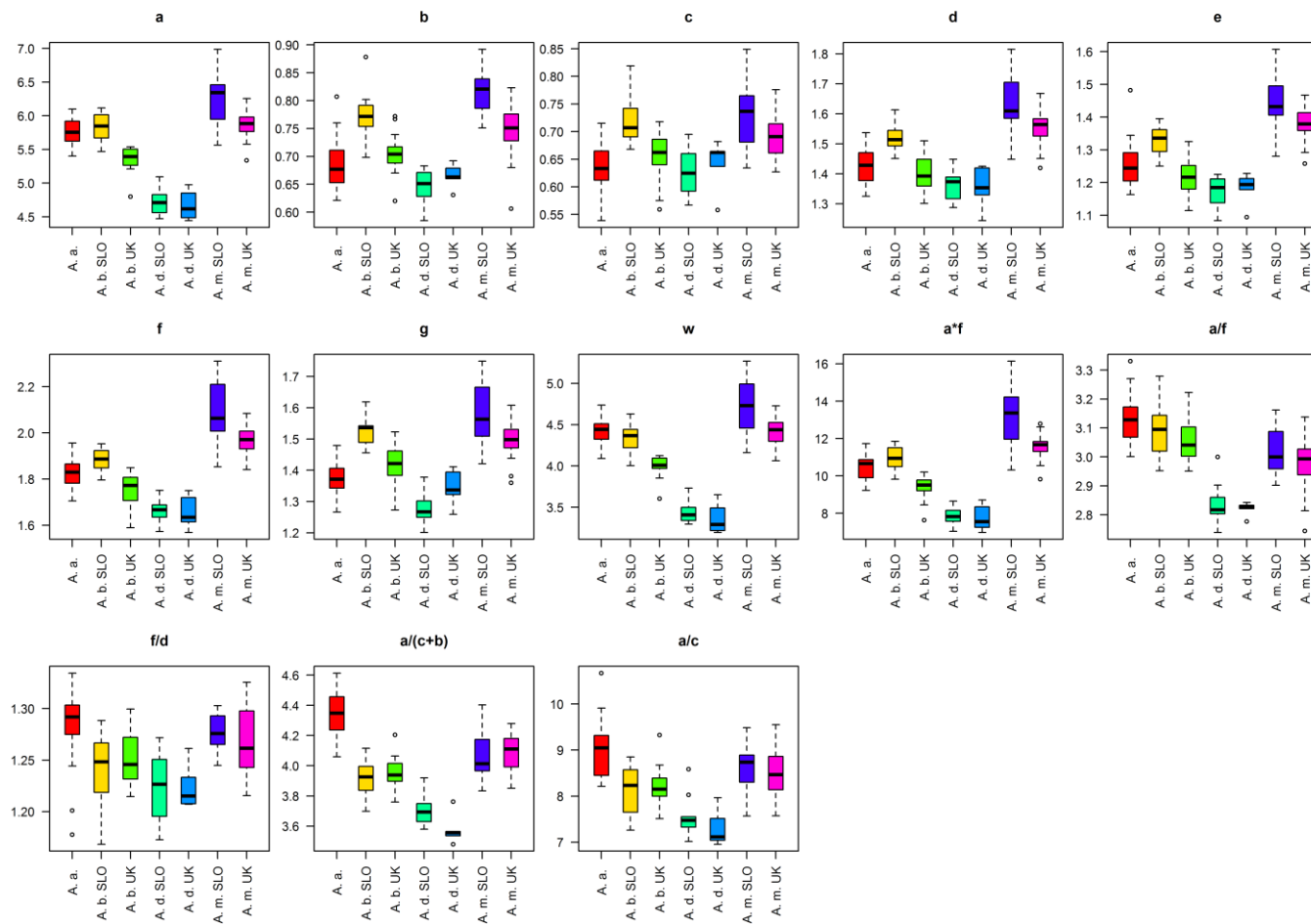
Se nadaljuje

## Nadaljevanje

| Lokacija         | Osebek  | Vibracijski napev | COI haplotip |
|------------------|---------|-------------------|--------------|
| Lokev            | lvM603  | dragonja          | SH1          |
|                  | lvM656  | dragonja          | SH1          |
|                  | lvF947  | dragonja          | SH5          |
|                  | lvF665  | dragonja          |              |
| Malovše          | mlM071  | bicincta          | SH1          |
| Na Šiji Banjšice | njM930  | dragonja          | SH6          |
| Nova Sušica      | nsM215  | dragonja          |              |
| Nova vas         | nvM796  | dragonja          |              |
|                  | nvF1123 | dragonja          | SH1          |
|                  | nvF1129 | dragonja          |              |
| Osp 1            | o1M051  | dragonja          |              |
|                  | o1M052  | dragonja          | SH5          |
|                  | o1F353  | dragonja          | SH5          |
| Petelinje        | ptM146  | dragonja          | SH1          |
|                  | ptF309  | dragonja          | SH1          |
|                  | prM1027 | dragonja          | SH13         |
|                  | pcM970  | diminuta          | SH2          |
| Podbreg          | pbM519  | dragonja          |              |
| Podnanos         | pnM065  | dragonja          |              |
|                  | pnM099  | dragonja          | SH6          |
| Poznanovci       | pzM727  | makarovi          | SH1          |
| Punngl           | puF756  | makarovi          | SH9          |
| Selce            | scM184  | dragonja          | SH1          |
| Šempas           | ssM511  | bicincta          | SH1          |
| Šmihel           | smM202  | dragonja          | SH9          |
|                  | smF357  | dragonja          |              |
|                  | smF362  | dragonja          |              |
| Šempas           | ssF814  | bicincta          | SH8          |
| Tolmin           | tlM700  | dragonja          | SH1          |
| Trnovo NG        | trM938  | dragonja          |              |
|                  | trF1148 | dragonja          |              |
| Vilazzano        | vzF802  | makarovi          | SH10         |
| Zemono           | zmM085  | bicincta          | SH1          |
|                  | zmF271  | dragonja          |              |
|                  | zmF302  | dragonja          |              |
|                  | zmM558  | dragonja          |              |
| Zgornje Jezersko | zjM1079 | bicincta          | SH6          |
|                  | ZrF830  | bicincta          | SH1          |

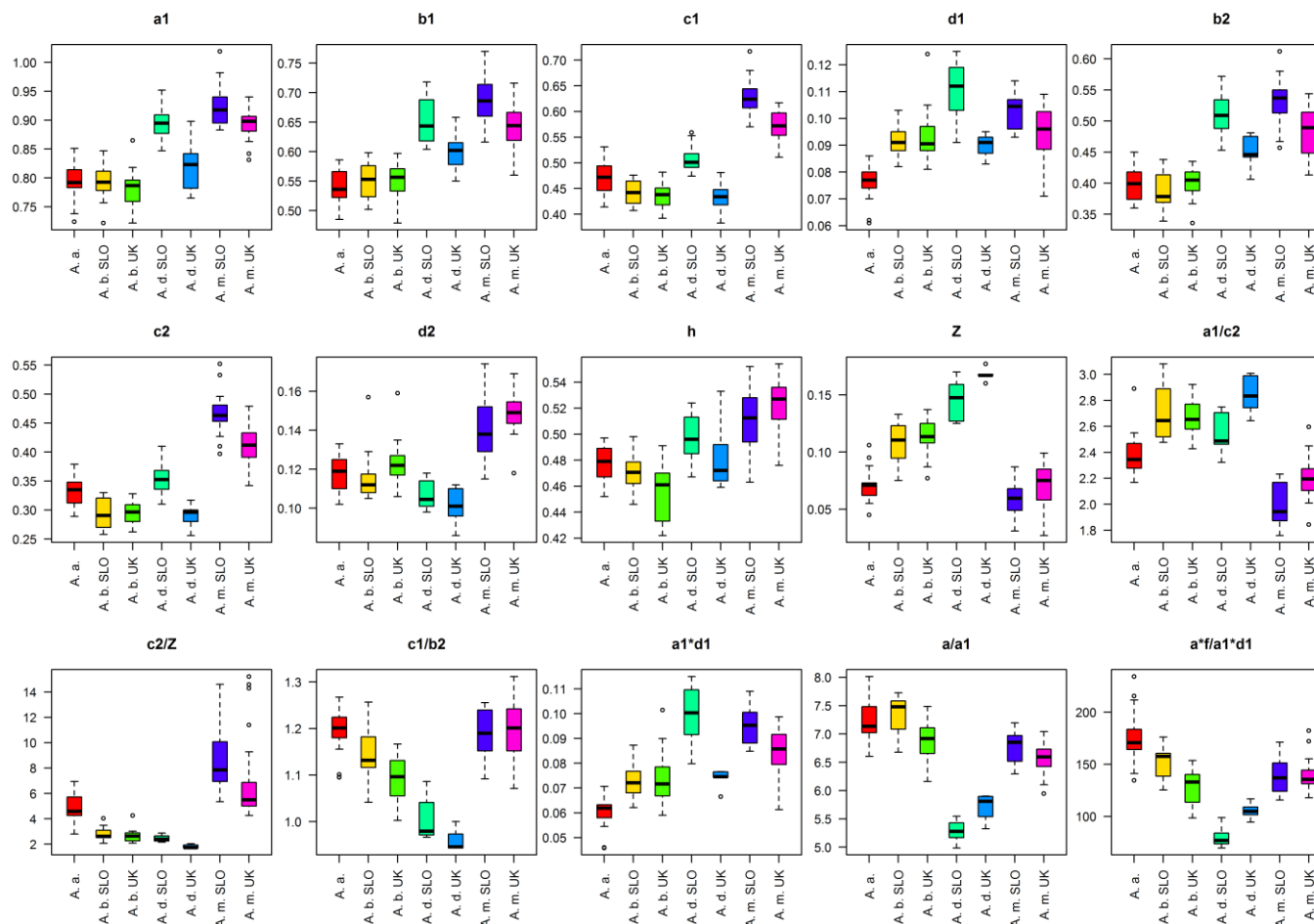
## PRILOGA C

Obseg vrednosti morfoloških znakov izmerjenih na telesu samcev štirih vrst rodu *Aphrodes* (prirejeno po Bluemel in sod., 2014). Za parametre a, b, c, d, e, f, g in w, y os predstavlja mm. Values measured for morphological characters on the male body of four species of the genus *Aphrodes* (modified by Bluemel et al., 2014). For measured parameters a, b, c, d, e, f, g and w the y axis represents mm.



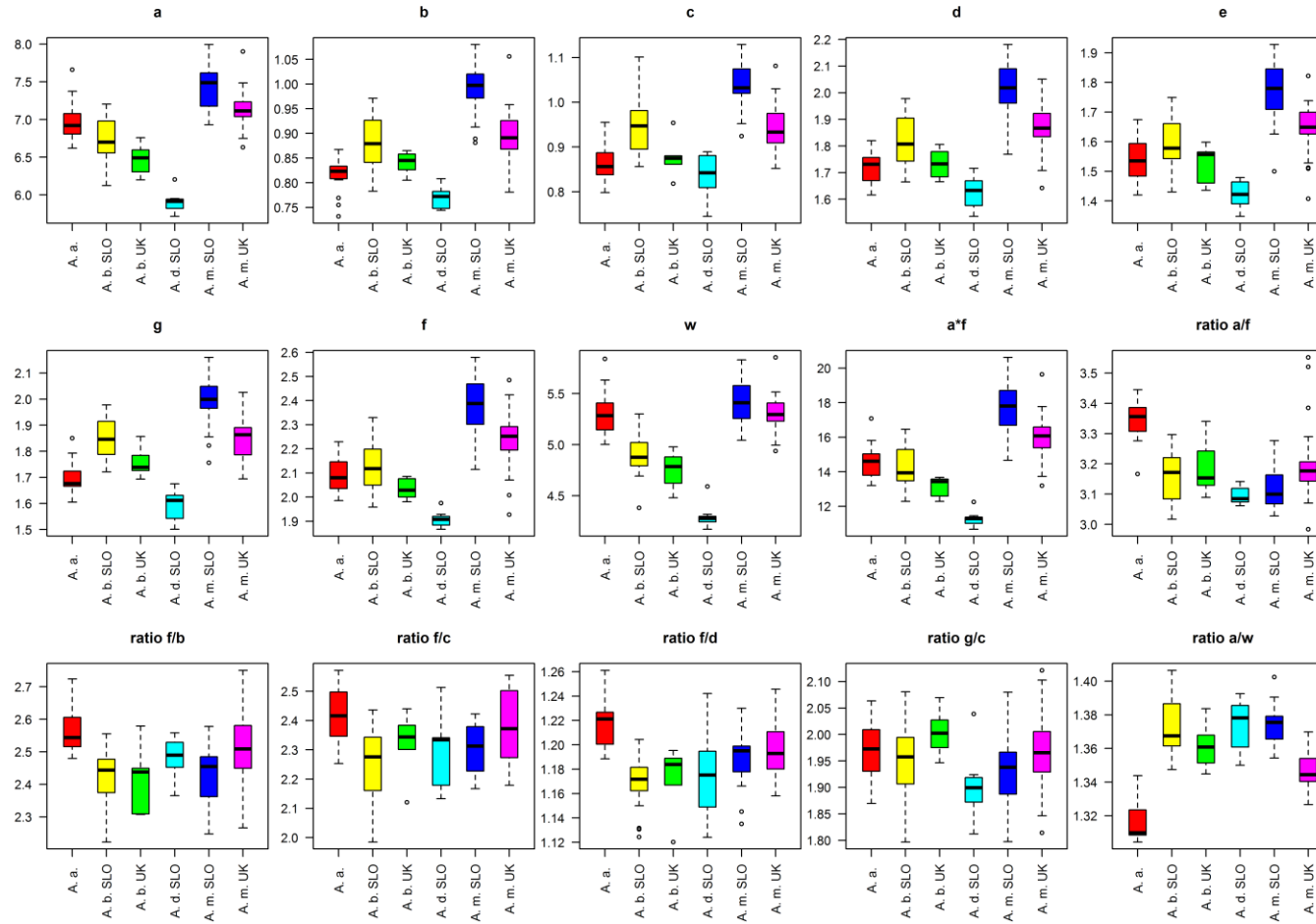
## PRILOGA D

Obseg vrednosti morfoloških znakov izmerjenih na aedeagusu samcev štirih vrst rodu *Aphrodes* (prirejeno po Bluemel in sod., 2014). Za parametre a1, b1, c1, d1, b2, c2, d2, h in Z, y os predstavlja mm. Values measured for morphological characters on the male aedeagus of four species of the genus *Aphrodes* (modified by Bluemel et al., 2014). For measured parameters a1, b1, c1, d1, b2, c2, d2, h in Z, the y axis represents mm.



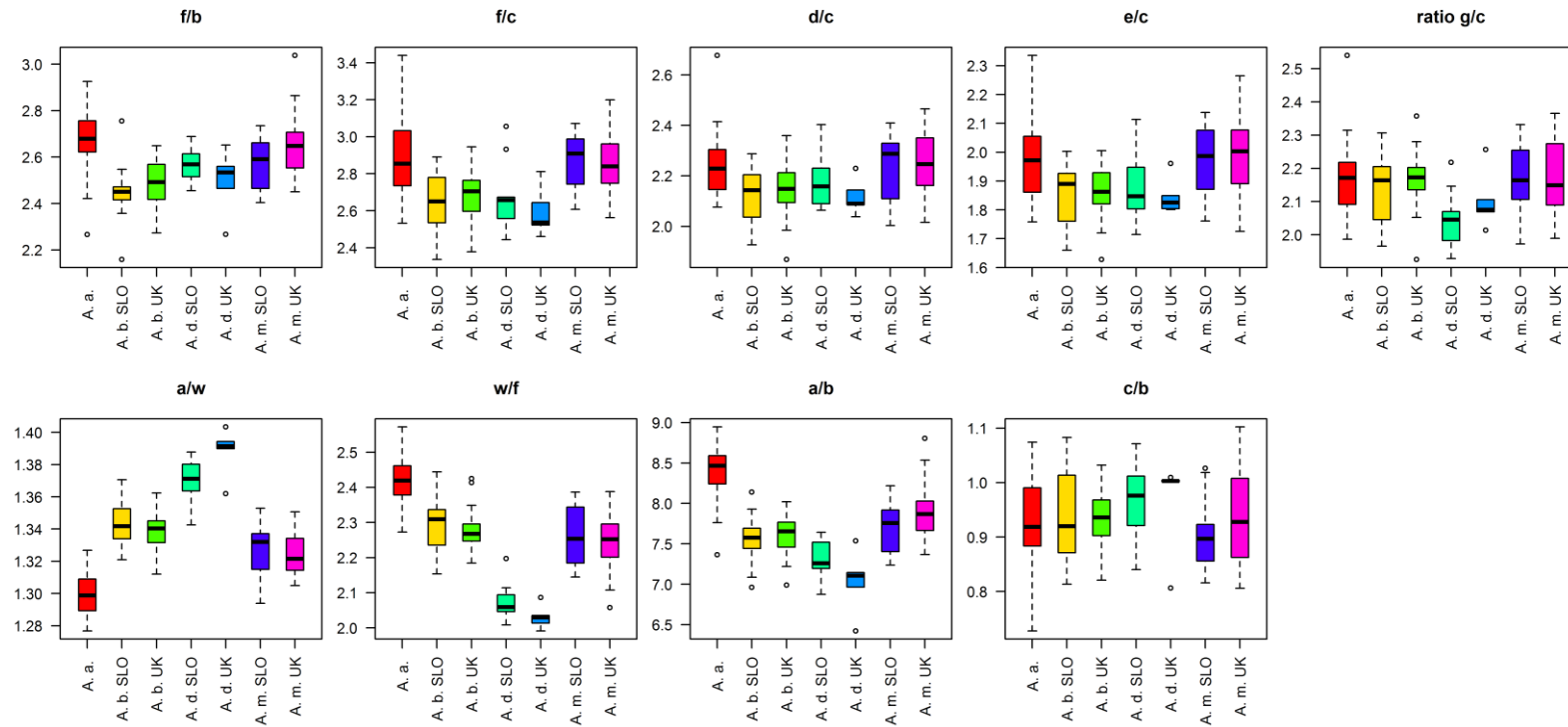
## PRILOGA E

Obseg vrednosti morfoloških znakov izmerjenih na telesu samic štirih vrst rodu *Aphrodes* (prirejeno po Bluemel in sod., 2014). Za parametre a, b, c, d, e, f, g in w, y os predstavlja mm. Values measured for morphological characters on the female body of four species of the genus *Aphrodes* (modified by Bluemel et al., 2014). For measured parameters a, b, c, d, e, f, g and w, the y axis represents mm.



## PRILOGA F

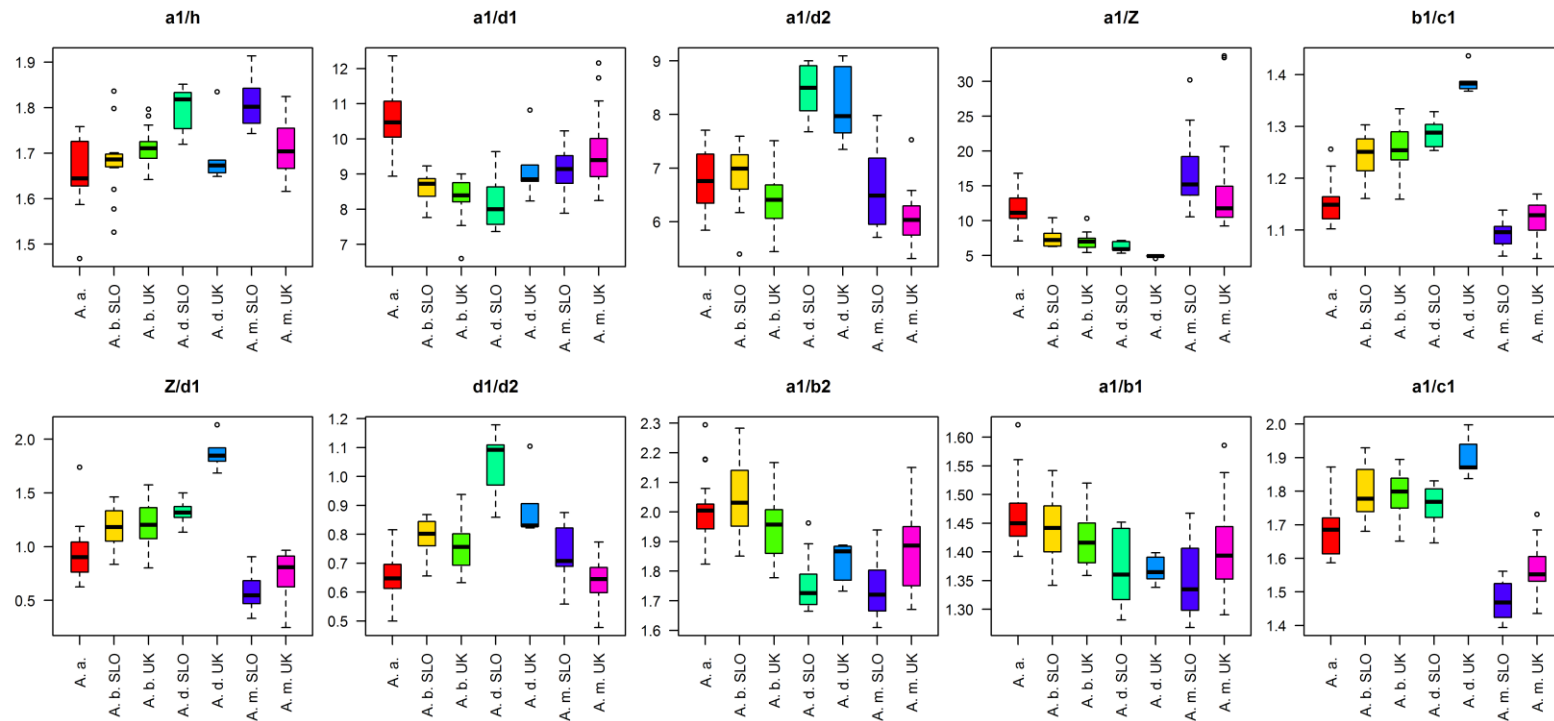
Obseg vrednosti razmerij morfoloških znakov izmerjenih na telesu samcev štirih vrst rodu *Aphrodes* izključenih iz LDA analiz (prirejeno po Bluemel in sod., 2014). The ranges of ratios measured for morphological characters of the male body of four species of the genus *Aphrodes* excluded from the LDA analysis (modified by Bluemel et al., 2014).





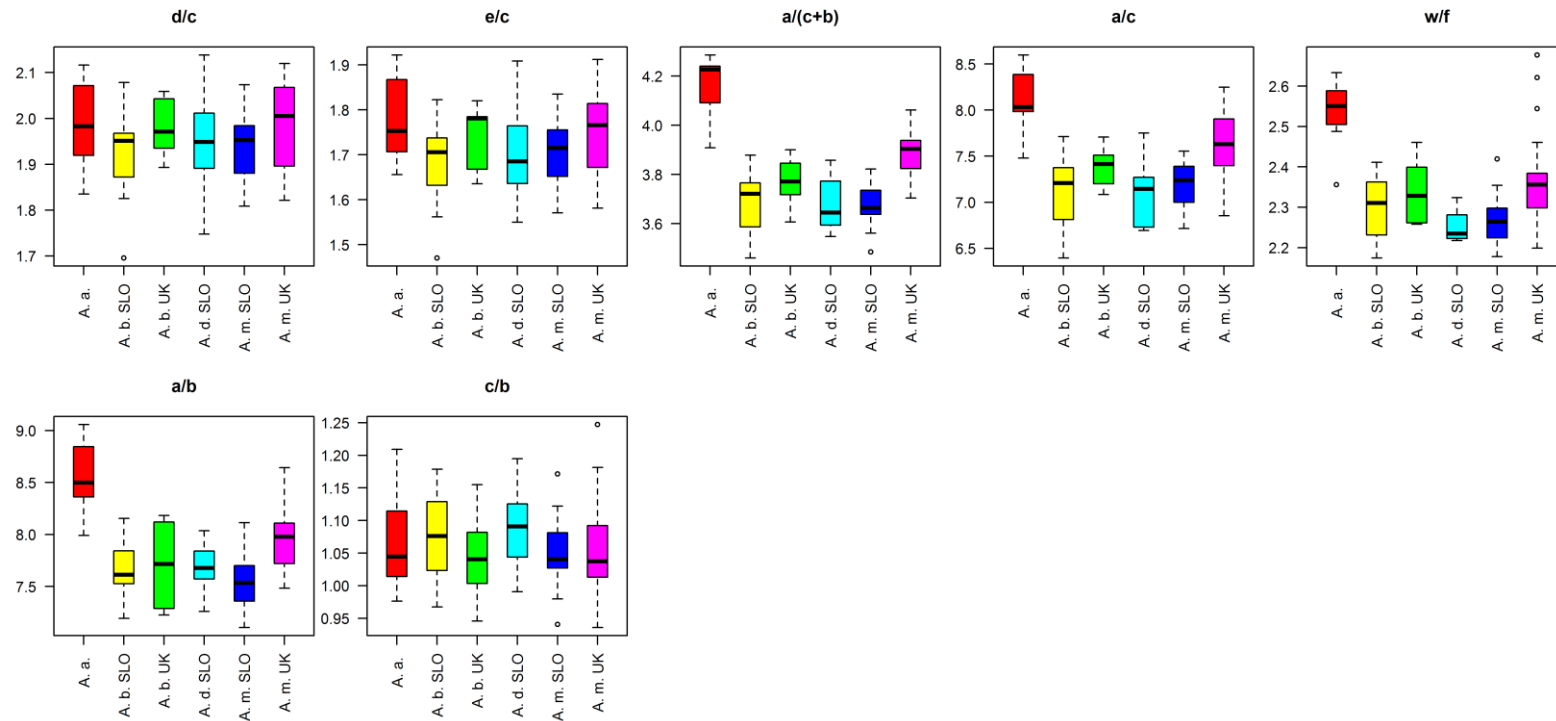
## PRILOGA G

Obseg vrednosti razmerij morfoloških znakov izmerjenih na aedeagusu samcev štirih vrst rodu *Aphrodes* izključenih iz LDA analiz (prirejeno po Bluemel in sod., 2014). The ranges of ratios measured for morphological characters of the male aedeagus of four species of the genus *Aphrodes* excluded from the LDA analysis (modified by Bluemel et al., 2014).



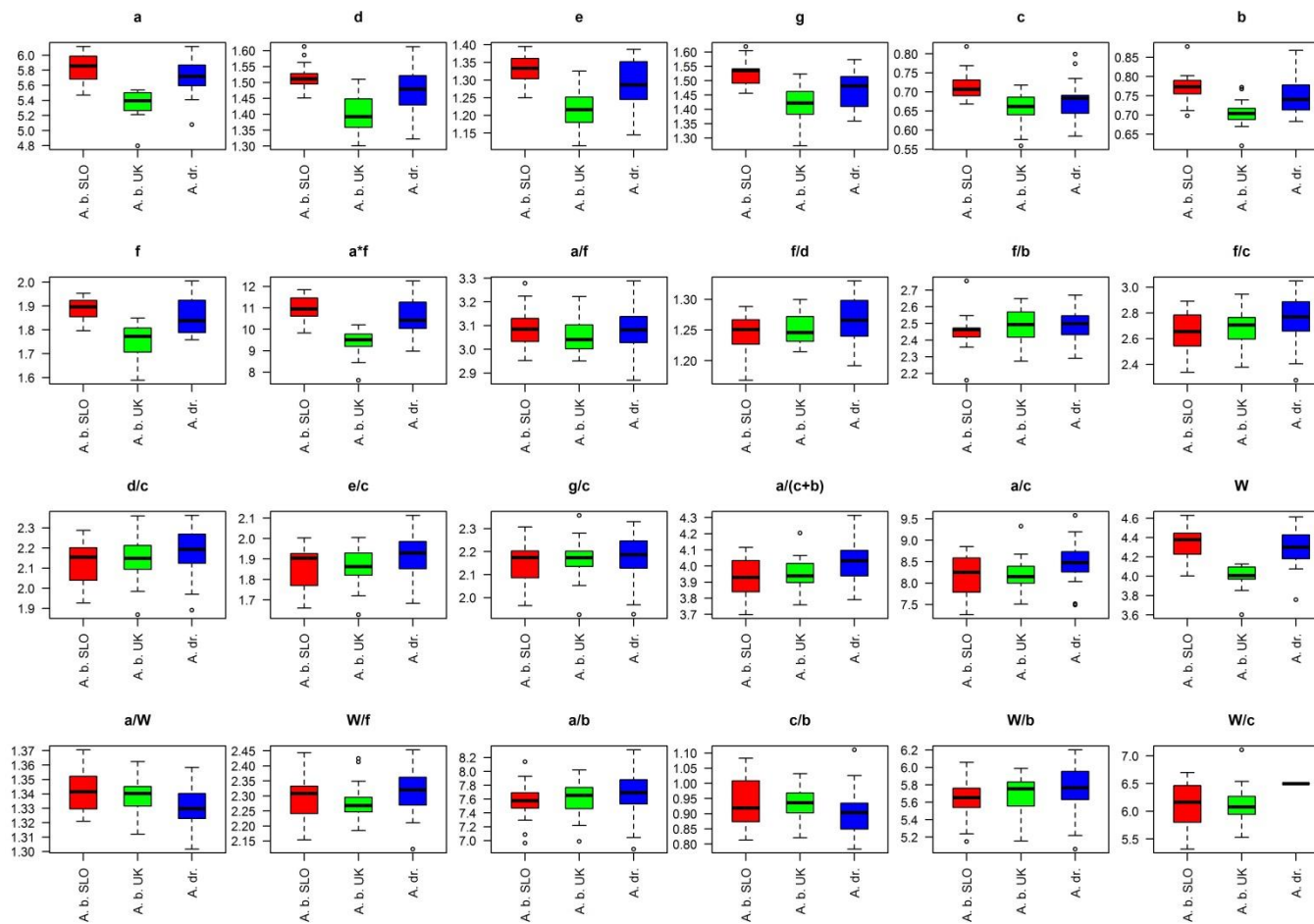
## PRILOGA H

Obseg vrednosti razmerij morfoloških znakov izmerjenih na telesu samic štirih vrst rodu *Aphrodes* izključenih iz LDA analiz (prirejeno po Bluemel in sod., 2014). The ranges of ratios measured for morphological characters of the female body of four species of the genus *Aphrodes* excluded from the LDA analysis (modified by Bluemel et al., 2014).



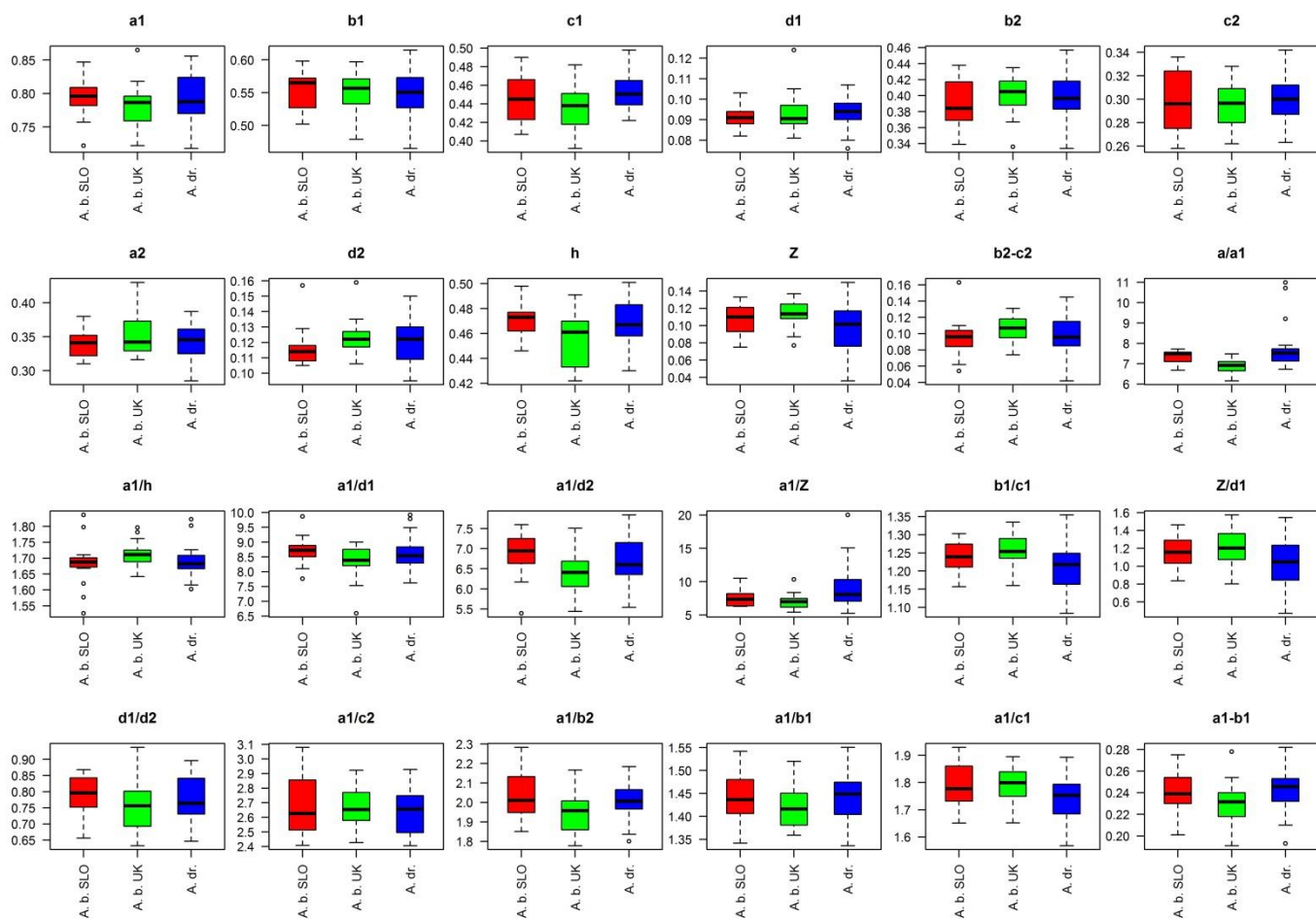
## PRILOGA I

Obseg vrednosti morfoloških znakov izmerjenih na telesu samcev vrst *A. bicincta* in tipa *A. 'Dragonja'*. Za parametre a, b, c, d, e, f, g in w, y os predstavlja mm. Values measured for morphological characters on the male body of species *A. bicincta* and type *A. 'Dragonja'*. For measured parameters a, b, c, d, e, f, g and w the y axis represents mm.



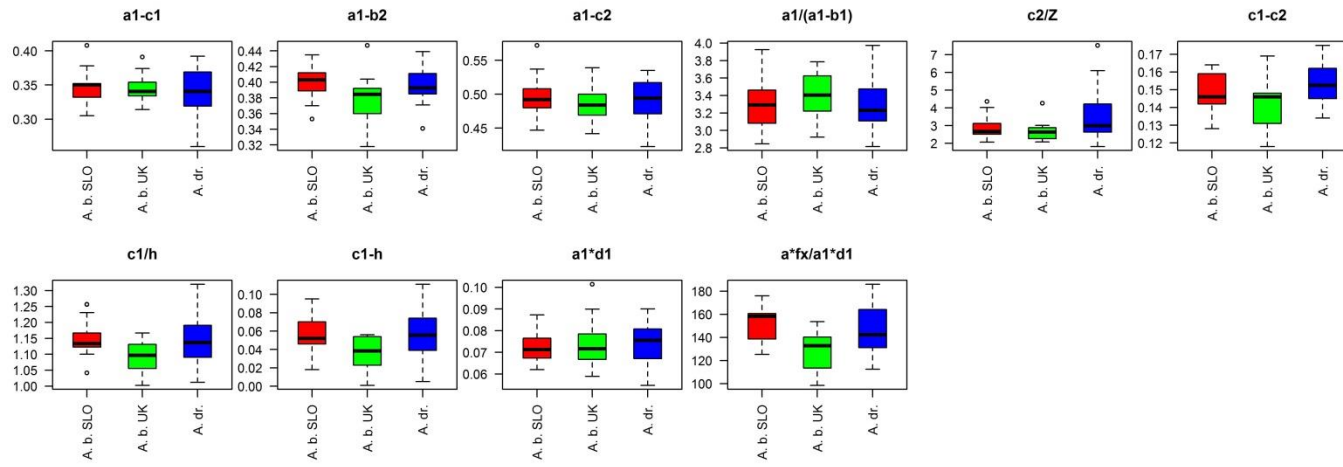
## PRILOGA J

Obseg vrednosti morfoloških znakov izmerjenih na aedeagusu samcev *A. bicincta* in tipa *A. 'Dragonja'*. Za parametre a1, b1, c1, d1, b2, c2, d2, h in Z, y os predstavlja mm. Values measured for morphological characters on the male aedeagus of the species *A. bicincta* and type *A. 'Dragonja'*. For measured parameters a1, b1, c1, d1, b2, c2, d2, h in Z, the y axis represents mm.



Se nadaljuje

# Nadaljevanje



## PRILOGA K

Obseg vrednosti morfoloških znakov izmerjenih na telesu samic vrst *A. bicincta* in tipa *A. 'Dragonja'*. Za parametre a, b, c, d, e, f, g in w, y os predstavlja mm. Values measured for morphological characters on the female body of species *A. bicincta* and type *A. 'Dragonja'*. For measured parameters a, b, c, d, e, f, g and w, the y axis represents mm.

