

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Marjeta KONEC

**GENETSKA DIFERENCIACIJA IN SPECIACIJA PODZEMELJSKIH IN
POVRŠINSKIH POPULACIJ VODNEGA OSLIČKA *Asellus aquaticus*
(Crustacea: Isopoda)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**GENETIC DIFFERENTIATION AND SPECIATION IN SUBTERRANEAN AND
SURFACE POPULATIONS OF *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda)**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2015

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 21. 9. 2011 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti, znanstveno področje biologija. Za mentorja je bil imenovan prof. dr. Peter Trontelj.

Doktorska disertacija je rezultat raziskav, ki so potekale na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani v laboratoriju Katedre za zoologijo. Del analiz je bil narejen na Oddelku za zootehniko, v laboratoriju Katedre za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo, Rodica.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Rudi VEROVNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Peter TRONTELJ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Dunja BANDELJ MAVSAR
Univerza na Primorskem, Znanstveno – raziskovalno središče in Fakulteta
za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije

Datum zagovora: 23. 3. 2015

Podpisana izjavljam, da je disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Marjeta Konec

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
DK 951:551(043.3)=163.6
KG ekološka speciacija/ paralelna evolucija/ populacijska struktura/ mikrosateliti/ podzemlje/ *Asellus aquaticus*/ Isopoda
AV KONEC, Marjeta, univerzitetni diplomirani biolog
SA TRONTELJ, Peter (mentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Bioznanosti, področje biologija
LI 2015
IN GENETSKA DIFERENCIACIJA IN SPECIACIJA PODZEMELJSKIH IN POVRŠINSKIH POPULACIJ VODNEGA OSLIČKA ASELLUS AQUATICUS (CRUSTACEA: ISOPODA)
TD Doktorska disertacija
OP IX, 87 str., 18 pregl., 23 sl., 8 pril., 190 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Razvili smo nove mikrosatelitske lokuse za genetske raziskave vodnih osličkov (*Asellus aquaticus*). Z njihovo pomočjo smo ugotovili, da so populacije površinskih in podzemeljskih vodnih osličkov v sistemu kraške Ljubljanice genetsko popolnoma diferencirane. Med njimi obstaja reproduktivna bariera in lahko trdimo, da pripadajo ločenim vrstam. Enako velja tudi za par sosednjih si populacij podzemeljskih in površinskih vodnih osličkov iz Romunije. Med podzemeljskimi populacijami, ki naseljujejo sistem kraške Ljubljanice smo zasledili kompleksno populacijsko strukturo. Začetne dele jam naseljujejo fenotipsko mešane populacije vodnih osličkov pri katerih opazimo redukcije pigmenta. Genski pretok med njimi in sosednjimi površinskimi populacijami ni okrnjen, saj posamezniki s površja migrirajo v jame in obratno. Pojav redukcij pigmenta kaže na vpliv naravne selekcije v jamah. S filogenetsko analizo smo pokazali, da so vodni oslički v Sloveniji in Romuniji v podzemlje prešli neodvisno. Tudi znotraj sistema kraške Ljubljanice so se vodni oslički večkrat neodvisno prilagodili na življenje v podzemlju. Pri vseh podzemeljskih populacijah je prišlo do evolucije konvergentnih lastnosti. Proces v ozadju nastanka novih vrst podzemeljskih vodnih osličkov je ekološka speciacija. Neodvisni nastanek reproduktivnih barrier med različnimi podzemeljskimi populacijami in možnost uspešnega križanja med njimi zadostita pogojem paralelne ekološke speciacije.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC 951:551(043.3)=163.6
CX ecological speciation/ parallel evolution/ population structure/ microsatellites/
subterranean/ *Asellus aquaticus*/ Isopoda
AU KONEC, Marjeta
AA TRONTELJ, Peter (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme
in Biosciences, scientific field Biology
PY 2015
TI GENETIC DIFFERENTIATION AND SPECIATION IN SUBTERRANEAN AND
SURFACE POPULATIONS OF ASELLUS AQUATICUS (CRUSTACEA:
ISOPODA)
DT Doctoral dissertation
NO IX, 87 p., 18 tabl., 23 fig., 8 ann., 190 ref.
LA SI
AL sl/en
AB We developed new microsatellite loci for genetic analysis of *Asellus aquaticus*. In
the karstic river system of the Ljubljanica River, populations of subterranean and
surface *Asellus aquaticus* turned out to be genetically completely differentiated.
They are separated by a reproductive barrier and thus form two separate species.
The same is true for subterranean and surface *Asellus aquaticus* population pair
from Romania. Complex population structure was detected among subterranean
populations in Slovenia. Entrance parts of the caves are inhabited by phenotypically
mixed populations, where individuals show reduction in pigmentation. Between
them and adjacent surface population, ongoing gene flow is present as surface
individuals migrate in and out of the caves. Reduction of pigmentation is under the
influence of selection pressure in the caves. Phylogenetic analysis revealed two
independent colonization events of subterranean habitat in Slovenia and Romania.
Also within the karstic river system of the Ljubljanica River *Asellus aquaticus*
colonized and adapted to the subterranean habitat several times independently. In all
subterranean populations convergent traits have evolved. The process behind
formation of new subterranean species in *Asellus aquaticus* is ecological speciation.
Independent formation of reproductive barriers in different subterranean populations
and the possibility of hybridization meet all criteria for parallel ecological
speciation.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	IX
1 UVOD	1
1.1 SPECIACIJA	1
1.1.1 Ekološka speciacija.....	1
1.1.2 Prehod v novo okolje – s površja v podzemlje	2
1.2 KONVERGENTNA EVOLUCIJA	3
1.2.1 Paralelna speciacija	4
1.3 NARAVNA SELEKCIJA JAMSKEGA OKOLJA IN FENOTIPSKO MEŠANE POPULACIJE VODNEGA OSLIČKA	6
1.3.1 Vodni osliček kot modelni organizem.....	7
1.4 MOLEKULSKE METODE IN NJIHOVA UPORABA V BIOLOGIJI PODZEMLJA	7
1.4.1 Mikrosateliti	8
1.5 HIPOTEZE IN CILJI RAZISKAVE	9
2 MATERIAL IN METODE	10
2.1 GEOGRAFSKO HIDROLOŠKI OPIS OBMOČIJ VKLJUČENIH V RAZISKAVO	10
2.1.1 Sistem kraške Ljubljaničnice	10
2.1.2 Planinska jama.....	11
2.1.3 Podzemni sistem s termalno sulfidno vodo v Romuniji	12
2.2 NABIRANJE VZORCEV POVRŠINSKIH IN PODZEMELJSKIH POPULACIJ VODNEGA OSLIČKA	13
2.3 RAZVOJ, TESTIRANJE IN OPTIMIZACIJA NOVIH ANALITSKIH LOKUSOV (MIKROSATELITOV)	19
2.3.1 Končni nabor mikrosatelitskih markerjev in multipleks reakcije.....	21
2.3.2 Romunski vzorci	23
2.4 POPULACIJSKO GENETSKE ANALIZE	24
2.5 TESTIRANJE POPULACIJSKE STRUKTURE.....	25
2.5.1 Delež skupnih alelov	26
2.6 IDENTIFIKACIJA MIGRANTOV PRVE GENERACIJE	27
2.7 ANALIZA MITOHONDRIJSKE DNK	28
2.7.1 Ocena starosti ločitve podzemeljskih in površinskih populacij	29
2.8 ANALIZE NA PODLAGI NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA JEDRNEGA GENA	29
2.9 FENOTIPI OSEBKOV V FENOTIPSKO MEŠANIH POPULACIJAH	30
3 REZULTATI.....	31

3.1	UPORABNOST NOVIH MIKROSATELITSKIH LOKUSOV.....	31
3.2	POPULACIJSKO GENETSKE ANALIZE.....	32
3.2.1	Vežavno neravnovesje lokusov.....	32
3.2.2	Genetska pestrost.....	32
3.2.3	Garza-Williamsonov index in pojav ozkega grla.....	37
3.3	POPULACIJSKA STRUKTURA.....	38
3.3.1	Testiranje z dodelitvenimi testi.....	38
3.3.2	Vzorci, nabrani v različnih časovnih obdobjih.....	44
3.3.3	Romunski podzemeljski in površinski vodni oslički.....	44
3.3.4	Delež skupnih alelov.....	44
3.3.5	Statistika Fst.....	46
3.4	MIGRANTI PRVE GENERACIJE.....	48
3.5	ANALIZE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA MITOHONDRIJSKEGA IN JEDRNEGA GENA.....	51
3.5.1	Filogenetske analize.....	51
3.5.2	Ocena starosti prehoda v podzemni habitat.....	51
3.5.3	Analiza mreže haplotipov.....	56
3.5.4	Genetska pestrost mitohondrijske DNK.....	59
3.5.5	Analiza AMOVA.....	59
3.6	POJAV REDUKCIJ PIGMENTA IN OČI V FENOTIPSKO MEŠANIH POPULACIJAH.....	60
4	RAZPRAVA.....	64
4.1	PODZEMLJE RAZKRIVA KOMPLEKSNO POPULACIJSKO STRUKTURO.....	64
4.2	PLANINSKA JAMA EDINSTVENA NE SAMO ZARADI SOTOČJA DVEH REK TEMVEČ TUDI »SOTOČJA« DVEH PODZEMELJSKIH POPULACIJ.....	64
4.3	GENETSKA PESTROST JE ZELO RAZNOLIKA TAKO NA POVRŠJU KOT V PODZEMLJU, ODRAŽA PA SE POVEZAVA Z GEOGRAFIJO.....	65
4.4	VELIKA SPOSOBNOST MIGRACIJE POVRŠINSKIH OSEBKOV IN OMEJENOST PODZEMELJSKIH POPULACIJ NA PODZEMELJSKI HABITAT.....	66
4.5	NASPROTUJOČI SI SIGNALI RAZLIČNIH GENETSKIH MARKERJEV.....	68
4.6	USMERJENA SELEKCIJA PODZEMNEGA OKOLJA DELUJE NAVKLJUB NEPREKINJENEMU GENSKEMU PRETOKU.....	68
4.7	DRUGAČNO OKOLJE JE VZROK ZA DIVERGENTNO SELEKCIJO, KAJ BI LAHKO BILA REPRODUKCIJSKA BARIERA?.....	69
4.7.1	Gre za pojav paralelne speciacije?.....	70
4.7.2	Paralelna speciacija znotraj ene populacije?.....	71
4.8	VPRAŠANJE STATUSA VRST IN ENOT VARSTVENEGA UPRAVLJANJA.....	71
5	POVZETEK (SUMMARY).....	73
5.1	POVZETEK.....	73
5.2	SUMMARY.....	74
6	VIRI.....	75
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Lokacije vzorcev vodnega oslička (<i>Asellus aquaticus</i>) iz sistema kraške Ljubljaniče.....	16
Pregl. 2: Lokacije vzorcev vodnega oslička (<i>Asellus aquaticus</i>) iz okolice Mangalije (Romunija).....	18
Pregl. 3: Sestava verižne reakcije s polimerazo za protokol z obarvanim začetnim oligonukleotidom M13.....	20
Pregl. 4: Tailing protokol, ki smo ga uporabili za prvi krog testiranja parov začetnih oligonukleotidov.....	20
Pregl. 5: Mikrosatelitski lokusi in pogoji reakcij za genotipizacijo vodnih osličkov.....	22
Pregl. 6: Reagenti in njihovi volumni v verižni reakciji s polimerazo za pomnoževanje mikrosatelitskih lokusov.....	23
Pregl.7: Protokol za pomnoževanje mikrosatelitskih lokusov.....	23
Pregl. 8: Nabor mikrosatelitskih lokusov za analizo romunskih vzorcev.....	24
Pregl. 9: Opis fenotipov vodnih osličkov, najdenih v fenotipsko mešanih populacijah.....	30
Pregl. 10: Uspešnost vezave začetnih oligonukleotidov, ki določajo mikrosatelitske lokuse.....	31
Pregl. 11: Genetska pestrost vodnih osličkov iz sistema kraške Ljubljaniče.....	34
Pregl. 12: Genetska pestrost površinskih in podzemeljskih vodnih osličkov v Romuniji in Sloveniji na osmih mikrosatelitih.....	36
Pregl. 13: Povprečje G-W indeksa preko sedmih lokusov, ki sledijo modelu mutiranja SMM v vseh populacijah in G-W indeks v podzemeljskih populacijah izračunan preko 17 lokusov, ki sledijo modelu mutiranja SMM.....	37
Pregl. 14: Število skupin, določenih s tremi različnimi pristopi ter z različnimi nabori podatkov.....	39
Pregl. 15: Fst vrednosti parov vzorcev podzemeljskih vodnih osličkov iz Planinske jame.....	46
Pregl.16: Fst vrednosti parov vzorcev vodnega oslička v sistemu kraške Ljubljaniče.....	47
Pregl.17: Genetska pestrost mitohondrijskega gena COI v porečju kraške Ljubljaniče in Romunije v okolici Mangalije.....	59
Pregl. 18: Analiza molekulske variance (AMOVA) za haplotipe COI in osem mikrosatelitov.....	60

KAZALO SLIK

Sl. 1: Načrt Planinske jame z označenimi vzorčnimi točkami.....	12
Sl. 2: Geološki prerez kraškega območja v okolici Mangalije (Romunija).....	13
Sl. 3: Lokacije nabranih vzorcev vodnega oslička (<i>Asellus aquaticus</i>) iz sistema kraške Ljubljani.....	15
Sl. 4: Vzorčne lokacije vodnega oslička (<i>Asellus aquaticus</i>) v okolici Mangalije (Romunija).....	17
Sl. 5: Diagram odločanja, ki je v pomoč pri oceni pravega števila skupin v analizi s programom FLOCK.....	26
Sl. 6: Alelska pestrost vzorcev vodnega oslička iz sistema kraške Ljubljani.....	33
Sl. 7: Grafično prikazana opažena in pričakovana heterozigotnost v vzorcih vodnega oslička s področja kraške Ljubljani.....	35
Sl. 8: Rezultati dodelitvenega testa s Structure v katerega smo zajeli vse vzorce iz sistema kraške Ljubljani.....	40
Sl. 9: Dodelitveni test (Structure) petih vzorcev vodnega oslička, treh podzemeljskih in dveh površinskih.....	41
Sl. 10: Dodelitveni test (Structure) vzorcev iz sosednjih si površinskih, fenotipsko mešanih in podzemeljskih populacij vodnega oslička.....	42
Sl. 11: Dodelitveni test vzorcev podzemeljskih vodnih osličkov iz Planinske jame.....	43
Sl. 12: Rezultat dodelitvenega testa s Structure vodnih osličkov iz Romunije, kjer se razdelitev v dve skupini popolnoma ujema z habitatom osebkov, kot njihovem fenotipom.....	44
Sl. 13: Delež skupnih alelov (25 lokusov), prikazan z evklidskimi razdaljami.....	45
Sl. 14: Poti migracij vodnih osličkov iz površinskih in fenotipsko mešanih populacij ter podzemeljske populacije iz Pivškega rokava.....	49
Sl. 15: Prikaz poti migracij podzemeljskih vodnih osličkov znotraj Planinske jame in v jamah severno od Planinskega polja.....	50
Sl. 16: Lokalitete vodnega oslička preko cele Evrope in filogenetsko drevo mitohondrijskega gena COI po Bayesovi metodi.....	52
Sl. 17: Filogenetsko drevo mitohondrijskega gena COI po Bayesovi metodi, ki vključuje vodne osličke iz centralnoevropske filogeografske skupine, kamor spadajo tudi vzorci iz Romunije.....	54
Sl. 18: Filogenetsko drevo jedrnega gena za 28S rRNK, narejeno z Bayesovim pristopom.....	55
Sl. 19: Mreža haplotipov centralnoevropske skupine, kamor spadajo vzorci iz Romunije.....	56
Sl. 20: Mreža haplotipov vodnega oslička iz sistema kraške Ljubljani.....	58
Sl. 21: Histogrami prikazujejo število osebkov z različnimi fenotipi v štirih jamah, kjer smo nabrali vzorce fenotipsko mešanih populacij.....	61
Sl. 22: Redukcija telesnega in očesnega pigmenta pri vodnem osličku v fenotipsko mešani populaciji.....	62
Sl. 23: Redukcija očesnega pigmenta pri vodnem osličku v fenotipsko mešani populaciji.....	63

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Natančnejši podatki o lokalitetah in številke vnosov podatkov v podatkovno bazo GenBank
- Priloga B: Seznam vseh testiranih začetnih oligonukleotidov za mikrosatelitske lokuse
- Priloga C: Podatki o izbranih mikrosatelitskih lokusih
- Priloga D: Rezultati populacijsko genetskih analiz (testi Hardy-Weinbergovega ravnovesja, vezavno neravnovesje in Garza-Williamsonov indeks)
- Priloga E: Rezultati dodelitvenega testa za vzorce iz Planinske jame (Structure, 25 lokusov, $K = 2$)
- Priloga F: Rezultat analize deleža skupnih alelov na vseh vzorcih iz sistema kraške Ljubljanice
- Priloga G: Fenotipi vodnih osličkov iz fenotipsko mešanih populacij, razdeljeni po spolu
- Priloga H: Vavčerske številke vodnih osličkov uporabljenih v disertaciji, vnešene v podatkovno bazo *Subbio database*

1 UVOD

1.1 SPECIACIJA

Kako nastanejo nove vrste, je eno izmed osnovnih in najstarejših vprašanj v evlucijski biologiji. Odkar je izšlo Darwinovo znamenito delo o nastanku vrst (1859), smo se že veliko naučili o mehanizmih speciacije. Mayr E. in Dobzhansky T. sta povezala nastanek vrst z nastankom reproduktivne izolacije in tako postavila osnovo za raziskovanje mehanizma speciacije (Sobel in sod., 2009). Zadnja leta si ne postavljamo več vprašanja, ali naravna selekcija igra pomembno vlogo pri nastanku vrst, temveč na kakšen način vodi do speciacije (Schluter, 2009; Langerhans in Riesch, 2013). Poznamo več mehanizmov, preko katerih pride do nastanka reproduktivne izolacije in jih lahko razdelimo med neekološke in ekološke. Neekološki zajemajo spolno selekcijo, pojav poliplodije in naravno selekcijo, pri kateri pride do nastanka in fiksacije različnih mutacij v enakih okoljskih pogojih. Pri ekoloških mehanizmih je nastanek nove vrste močno povezan s prilagoditvijo na različne ekološke niše (Schluter, 2009; Sobel in sod., 2009).

1.1.1 Ekološka speciacija

Ekološka speciacija je proces, pri katerem divergentna naravna selekcija vodi evolucijo reproduktivne izolacije med populacijami. Vzroki za divergentno selekcijo so razlike v okolju in so zunanji (ekstrinzični). Lahko so biotski (kompeticija, predacija) ali abiotski (klima, habitat, prehrana) (Rundle in Nosil, 2005; Schluter, 2009), predvsem pa je važen mehanizem v ozadju nastajanja razlik. Ekološka speciacija lahko poteka, če so populacije prostorsko popolnoma ločene (v alopatriji) ali pa niso (v parapatriji in simpatriji), ni pa od geografskih razmer popolnoma neodvisna. Geografija vpliva na vire divergentne selekcije in genski pretok (Nosil, 2012). Dhuyvetter in sod. (2007) so opredelili tri dokaze, da lahko potrdimo ekološko speciacijo: (1) divergentna lastnost je predmet naravne selekcije, (2) populacije so med seboj reproduktivno izolirane in (3) genski drift ali spolna selekcija nista primarna razloga za pojav reproduktivne izoliranosti.

Proučevanja ekološke speciacije se lahko lotimo na več načinov oziroma si lahko zastavimo različna vprašanja: 1) Ali je ekološka divergenca povezana s pojavom reproduktivne izolacije? 2) Ali lastnosti, vpletene v divergentno adaptacijo, povzročajo reproduktivno izolacijo (t.i. »magic traits«, kot so npr. barvni vzorci, na podlagi katerih prihaja do izbire pri parjenju)? 3) Ali selekcija na osnovi ekoloških razlik vpliva na fitness priseljencev in križancev? 4) Je ekološka divergenca povezana z nižjim genskim pretokom v naravi? 5) Ali nastanek vrst sovпада s prehodom v drugo ekološko nišo? (Nosil, 2012)

Speciacija je postopen proces in jo lahko razdelimo v več arbitrarnih faz. Kvantitativno lahko opišemo divergenco fenotipov, stopnjo reproduktivne izolacije (kakšen je genski pretok in prisotnost morebitnih hibridov), stopnjo grupiranja genotipov in ekološke razlike.

Tako v naravi opazimo kontinuirano variabilnost osebkov, jasno diferencirane populacije, različne ekotipe iste vrste in tudi ločene vrste. Pri tem pa je treba upoštevati, da se različni koncepti vrst razlikujejo med seboj v vprašanju, kdaj se speciacija začne in kdaj se zaključi (Nosil in sod., 2009). Ekološko speciacijo najlažje raziskujemo v začetnih fazah, ko so populacije med seboj diferencirane, vendar še niso reproduktivno izolirane (Dhuyvetter in sod., 2007; Via, 2009).

Ekološka speciacija se lahko zaključi precej hitro. Pri nevretenčarjih (raziskovali so rastlinojede žuželke na različnih gostiteljskih rastlinah) se je pokazalo, da se reproduktivna bariera lahko pojavi že v nekaj deset generacijah. Težko pa je ugotoviti, kaj točno preprečuje razmnoževanje med različnimi novonastalimi vrstami. Pri ekološki speciaciji gre lahko celo za kombinacijo različnih dejavnikov, ki so v začetnih fazah večinoma povezane z okoljem, so zunanje. Eden od možnih razlogov, katerega vpliv bi se hitro poznal, je selekcija proti migrantom oziroma hibridom. Možen način raziskave tega problema je, da primerjamo genski pretok med populacijami v različnih okoljih in populacijami v podobnih okoljih (Hendry in sod., 2007).

1.1.2 Prehod v novo okolje – s površja v podzemlje

Jamske živali predstavljajo odličen model za raziskave nastanka vrst (Riesch in sod., 2011; Strecker in sod., 2012), adaptivne radiacije (Trontelj in sod., 2012) in ekoloških vprašanj (npr. možnost sobivanja in sestavo združb) (Fišer in sod., 2012). Ti modeli dopolnjujejo že dolgo uveljavljene modele, kot so kuščarji rodu *Anolis* in ostrižniki iz velikih afriških jezer (Langerhans in sod., 2006, Seehausen, 2006, Fišer in sod., 2012; Trontelj in Polak 2012). Velike ekološke razlike med površjem in podzemeljem nudijo odlično možnost za študij ekološke speciacije, še posebej pri organizmih, pri katerih predniške površinske oblike niso izumrle. V speleobiologiji je ekološka speciacija bolj znana pod imenom hipoteza adaptivnega premika (adaptive shift hypothesis) (Howarth, 1987). Znani so predvsem primeri iz jam tropskih predelov, kjer se površinske in podzemeljske vrste pojavljajo parapatrično, torej druga ob drugi (Rivera in sod., 2002; Juan in sod., 2010). V zmernih geografskih širinah, kjer je bila favna pod močnim vplivom ledenih dob, pa velja naključna izolacija jamske populacije za bolj verjeten razlog razhajanja populacij in fiksacije različnih alelov (Sbordoni in sod., 2000).

Vodni osliček *Asellus aquaticus* Linné je razširjen preko cele Evrope, z izjemo zahoda in dela Mediterana. Kljub temu, da naseljuje območje v zmernih geografskih širinah, površinske in podzemeljske populacije živijo parapatrično (Sket, 1994; Turk in sod., 1996). Med seboj se razlikujejo v morfologiji (Prevorčnik in sod., 2004) in so tudi genetsko diferencirane (Verovnik in sod., 2003). Ekološka divergenca površinskih in podzemeljskih populacij bi morala biti povezana tudi z zmanjšanim genskim pretokom oziroma pojavom reproduktivne izolacije. Ker so jamski vodni oslički dobro prilagojeni na

specifične razmere svojega habitata, sklepamo, da so razlike v okolju in divergentna naravna selekcija gonilna sila razhajanja površinskih in podzemeljskih populacij.

1.2 KONVERGENTNA EVOLUCIJA

V naravi lahko velikokrat najdemo podobne si fenotipe, ki so rezultat paralelnih oziroma konvergentnih procesov (Arendt in Reznick, 2008; Elmer in Meyer, 2011). Če med seboj primerjamo okolje, v katerem živijo, in upoštevamo, kako zelo pogost je tak pojav, taka podobnost ne more biti plod naključja (Schluter, 2009). Eno izmed naravnih okolij, ki si je zelo podobno povsod po svetu, je podzemlje (Poulson in White, 1969). Značilnosti vseh jam so stalna tema, malo nutrientov in odsotnost naravnih ciklov, kot so letni časi. Specializirani prebivalci jamskega okolja so odličen primer konvergentne evolucije, saj se je pri večini razvil nabor morfoloških znakov (troglomorfoz), ki jih povezujemo z življenjem v podzemlju. Najpogostejši so redukcija pigmenta in oči ter podaljševanje okončin (Culver in sod. 1995; Protas in Jeffery, 2012). Celotno manj sorodne jamske vrste so si med seboj bolj podobne, kot je ostalo podobnosti z njihovimi površinskimi predniki (Trontelj, 2012), vedno več je tudi dokazov o prisotnosti kriptičnih vrst (Trontelj in sod., 2009). Najverjetnejša razlaga za to je podoben selekcijski pritisk okolja (Schluter, 2009). Še vedno nismo ugotovili, kaj je glavni vir usmerjene naravne selekcije v podzemlju. Vse več je dokazov, da je odsotnost svetlobe, in ne pomanjkanje hranil, glavni selekcijski pritisk (Pipan in Culver, 2012).

V naravi lahko najdemo mnogo primerov konvergentne evolucije, a je kljub temu prisotnih še nekaj nekonvergentnih lastnosti (Kaeuffer in sod., 2012). Razlogi za pojav nekonvergentnih lastnosti so lahko posledica edinstvenih zgodovinskih dogodkov, okoljskih dejavnikov, ki se v navidez enakemu okolju, med seboj razlikujejo in lastnostih, ki so jih podedovali od že različnih predniških skupin. Ti faktorji delujejo nasproti determinističnim okoljskim dejavnikom, ki usmerjajo konvergentno evolucijo (Losos in sod., 1998; Langerhans in Dewitt, 2004; Eroukhmanoff in sod., 2009).

Že Darwin (1859) je opazil, da si je jamska favna zelo podobna, kjer koli se pojavlja. A v jamah okolje ni tako homogeno, kot se človeškemu obiskovalcu zdi na prvi pogled. Že majhne razlike znotraj jamskih sistemov so lahko vzrok za divergentne morfološke značilnosti med seboj tesno sorodnih si vrst (Trontelj in sod., 2012; Fišer in sod., 2012). Drug potencialni dejavnik oblikovanja konvergenca je selekcijska nevtralnost mutacij, ki se izrazijo kot izguba oči in pigmenta (Kosswig in Kosswig, 1940; Wilkens, 2011). Če lastnost ni pod pritiskom naravne selekcije, lahko ostane nespremenjena, postane bolj variabilna ali pa njen razvoj krene v različne smeri. Tu se lahko vprašamo, katere od domnevnih prilagoditev na življenje v podzemlju (Christiansen, 2012) so splošne prilagoditve in tako skupne vsej podzemni favni. Iskanja odgovora na to vprašanje se lahko lotimo s primerjavo ozko sorodnih si parov populacij, ki so se neodvisno prilagodile na

ново okolje. To novo okolje je v večini okoljskih dejavnikov enako, a se hkrati v nekaterih bistveno razlikuje.

Pri vodnem osličku so si populacije iz različnih jamskih sistemov, domnevno zaradi prilagoditve na življenje v podzemlju, zelo podobne. Šele molekulske analize so razkrile, da v sistemu reke Reke pravzaprav biva druga vrsta oslička in naknadna morfološka analiza je razkrila nabor nekonvergentnih lastnosti, po katerih jih med seboj lahko ločimo (Verovnik in sod., 2009). Odličen primer za študij konvergence je primerjava dveh parov površinskih in podzemeljskih populacij vodnih osličkov iz Romunije (*Asellus aquaticus infernus* Turk-Prevorčnik in Blejec 1998) in Slovenije, ki so podzemlje verjetno naselili neodvisno (Turk in sod., 1996; Turk-Prevorčnik in Blejec, 1998). V Romuniji so se, poleg na temo, prilagodili še na specifične fizikalno-kemijske lastnosti vode, na termalno sulfidno podtalnico. Tako okolje velja za ekstremno zaradi toksičnosti žveplovih spojin, ki vplivajo na dihalno verigo (Flot in sod., 2010; Tobler in sod., 2006), hkrati pa je žveplo vir energije za kemoavtotrofne mikroorganizme, ki so osnova kompleksnega energijsko bogatega ekosistema (Sarbu, 2000). Specifični okoljski dejavniki obeh jamskih sistemov tako ponujajo še dodaten vir naravne selekcije, ki lahko razloži pojav nekonvergentnih lastnosti (Kaeuffer in sod., 2012).

1.2.1 Paralelna speciacija

Pogosto ločimo konvergentno in paralelno evolucijo. Razlika med njima je predvsem v genetskih mehanizmih v ozadju sprememb, ki so različni pri manj sorodnih si vrstah (konvergentno) in so enaki pri bolj sorodnih si vrstah (paralelno). Natančnejše raziskave genetskih mehanizmov so pokazale, da to ne drži vedno. Zato lahko vse primere neodvisne evolucije imenujemo konvergence (Arendt in Reznik, 2007). Kljub temu, pa je ponekod izraz paralelno tako uveljavljen, da se je ohranil (Kauffer in sod., 2012).

Posebna oblika paralelne evolucije je tudi paralelna speciacija. V ožjem smislu to pomeni, da se neodvisno razvije enaka reproduktivna bariera in se populacije potomcev, ki so se neodvisno prilagodile na enako novo okolje, med seboj lahko razmnožujejo (Schluter in Nagel, 1995; Rundle in sod., 2000). To je bilo dokazano na številnih primerih rib (Johannesson, 2001; Mckinnon in sod., 2004; Schluter & Conte, 2009), nakaj pa je tudi primerov iz sveta nevretenčarjev (Johannesson in sod., 2010; Nosil in Sandoval, 2008; Schluter, 1995; Eroukhmanoff in sod., 2011). Dokazi o reproduktivni barieri temeljijo predvsem na poskusih parjenja in testiranju izbire potencialnega partnerja (assortative mating) (Mckinnon in sod., 2004; Schluter, 2009; F. Eroukhmanoff in sod., 2011; Rundle in sod., 2000; Langerhans in sod., 2007).

Alternativno reproduktivno bariero predstavlja postzigotna izolacija, kjer hibridi ne preživijo, saj so slabše prilagojeni na okolje obeh starševskih populacij (Schluter in Conte, 2009). V primeru, da neviabilnost priseljencev predstavlja reproduktivno bariero v več

parih različnih vrst ali divergentnih populacij, to lahko štejemo za enak mehanizem reproduktivne izolacije (Schluter, 1995). Opisani mehanizem je še posebej pomemben pri začetnih stopnjah ekološke speciacije, kjer se neekološke oblike reproduktivne izolacije še niso razvile (Nosil, 2012). Speciacija je postopen proces in se ne zaključi v vseh primerih (Nosil in sod., 2009; Nosil, 2012). Dve divergentni populaciji v začetnih stadijih speciacije se lahko sčasoma spet zlijeta v enotno populacijo, kar je pogosto pri ekološko-evolucijsko dinamičnih procesih (Grant in Grant, 2002; Seehausen in sod., 2008; Vonlanthen in sod., 2012). Paralelna speciacija je tudi eden izmed najbolj močnih dokazov za ekološko speciacijo, kjer se je večkrat zgodil prehod v novo okolje na osnovi divergentne selekcije (Nosil, 2012).

V širšem pomenu se pojem paralelna speciacija nanaša na nastajanje vrst v enakem okolju in na enake selekcijske pritiske v ozadju procesa, zaradi česar so si novonastale vrste precej podobne (Richmond in Reeder, 2002; Kirchman, 2009; Rosenblum in Harmon, 2010).

Populacije vodnega oslička, ki so se prilagodile na življenje v podzemlju, najdemo v več ločenih jamskih sistemih. S tehniko RAPD (random amplified polymorphic DNA) so Verovnik in sod. (2003) pokazali, da ločitev na podlagi ekološko-hidrografskih značilnosti ni naravna. Združevanje populacij na podlagi genetskih podobnosti je ponudilo dokaz o večkratni neodvisni naselitvi podzemlja. Analiza mitohondrijske DNK in hierarhična analiza kladov sta nakazali možnost, da sta bila celo oba rečna rokava v Planinski jami naseljena neodvisno (Verovnik in sod., 2004). Genetska analiza romunske populacije še ni bila opravljena.

Morfometrična analiza je med seboj ločila površinske in podzemeljske vzorce, čeprav sta bili iz analize izključeni pigmentiranost in prisotnost oči (Prevorčnik in sod., 2004). Troglomorfní vzorci iz podzemlja so se ločili v štiri diskretne skupine. Eno je sestavljal vzorec iz podzemlja v Romuniji (*A. aquaticus infernus*), eno vodni osliček iz porečja Reke (zdaj opisan kot *A. kosswigi*), jasno pa sta se med seboj ločila tudi vzorca iz obeh rečnih rokavov Planinske jame. V nasprotju s podzemeljskimi, so površinski vzorci oblikovali veliko skupino, kjer se variabilnost zvezno spreminja z geografskim položajem vzorca. V diskretne skupine jih razdeli le velikost površine aree na petem pleopodu (Prevorčnik in sod., 2004, 2009).

Vprašanje sta, ali je pri vseh parih površinskih in podzemeljskih populacij vodnega oslička v ozadju razhajanja enak proces in kakšna je reproduktivna bariera. Jasna genetska (Konec in Trontelj, 2011) in morfološka (Lasnik, 2012) diskriminacija osebkov iz Planinske jame, ki se na sotočju rek pojavljajo sintopo, nakazuje prisotnost reprodukcijske izolacije celo med jamskimi populacijami. Križanje v laboratoriju ali morebitna hibridna cona v jami bi razkrila ali v nekaterih primerih vseeno lahko pride do parjenja, kar bi bil dokaz za paralelno ekološko speciacijo.

1.3 NARAVNA SELEKCIJA JAMSKEGA OKOLJA IN FENOTIPSKO MEŠANE POPULACIJE VODNEGA OSLIČKA

Najbolj opazni troglomorfni lastnosti sta izguba pigmenta in oči. Modelni organizmi, kot sta *Asellus* in *Astyanax*, omogočajo, da s križanjem različnih oblik v laboratoriju izvemo, kako se te lastnosti dedujejo (Protas in Jeffery, 2012). Vendar pa lahko tudi v naravi, sicer redko, najdemo jamske populacije, ki so fenotipsko zelo variabilne. Imajo različno stopnjo pigmentacije in različno izražene oči (Schilthuizen in sod, 2005; Espinasa in Borowsky, Cesaroni in sod., 1992; Kruckenhauser in sod., 2011; Borghezan in sod., 2012). Tu se vedno postavi vprašanje, ali so to križanci med že formirano in prilagojeno jamsko ter površinsko populacijo, ali populacija, ki se prilagaja na novo okolje pod vplivom naravne selekcije.

Pigmentiranost površinskih vodnih osličkov je zelo variabilna (Janzer and Ludwig, 1952), še posebej pri populacijah, ki jih najdemo v vodnjakih, rudnikih, vodovodu in jamah. Včasih je kakšen osebek lahko popolnoma depigmentiran (Sket, 1994). Pigment se lahko izgubi precej hitro. Hargeby in sod. (2004) so pokazali, da se je nov svetel ekotip vodnega oslička v jezeru na Švedskem pojavil v slabih dvajsetih letih. Takih primerov je celo več in vsi so se razvili paralelno, kar kaže na to, da je sprememba v pigmentaciji hiter adaptivni odziv, v tem primeru domnevno na predacijo (Eroukhmanoff in Svensson, 2009). Kljub mnogim razlikam v načinu življenja obeh ekotipov je molekulska analiza pokazala, da je genetska razlika večja med osebki iz različnih jezer kot med različnimi osebki v istem jezeru (Eroukhmanoff in sod., 2009).

V začetnih delih Postojnsko-Planinskega jamskega sistema najdemo osebke, ki so fenotipsko zelo raznoliki (lahko so popolnoma pigmentirani z očmi, brez pigmenta in z očmi ali pa brez pigmenta in popolnoma brez oči). Na začetku 20. stoletja je Racovitza (1925) opisal podvrsto troglomorfne vodnega oslička *A.a. cavernicolus* iz Črne jame. Štiri desetletja kasneje je Sket želel dopolniti opis taksona, vendar na tipski lokaliteti ni našel troglomorfne populacije. Črno jamo je naseljevala fenotipsko mešana populacija, zaradi česar je za opis vzel osebke iz Planinske jame nižje po toku podzemne Pivke (Sket, 1965).

Najprej so mislili, da začetne dele rokava podzemne Pivke naseljujejo križanci (*A.a.aquaticus* x *A.a.cavernicolus*) (Sket, 1994). Genetska analiza (Verovnik in sod., 2003) je to hipotezo ovrgla. Fenotipsko mešan vzorec iz Postojnske jame je genetsko podoben sosednji površinski populaciji in je jasno ločen od jamskih vodnih osličkov. Še več, ocena genskega pretoka je bila najnižja prav v paru dveh sosednjih populacij iz Postojnske (fenotipsko mešani) in Planinske jame (jamski). Morfometrična analiza (izvzeti pigmentacija in prisotnost oči) je osebke iz fenotipsko mešane populacije nedvoumno uvrstila med površinske (Prevočnik in sod., 2004). Filogeografska analiza pa je pokazala, da je jamska populacija iz Črne jame podzemlje naselila ločeno od populacije v Planinski

jami, ki se nahaja nižje v podzemnem toku Pivke (Verovnik in sod., 2004). V podzemlju mora delovati močna naravna selekcija, da že v kratkem časovnem obdobju pride do morfoloških sprememb, še posebej, če ostaja genski pretok med sosednjima površinsko in fenotipsko mešano populacijo neprekinjen.

1.3.1 Vodni osliček kot modelni organizem

Vodni osliček se kot modelni organizem uporablja v študijah toksikologije (Bloor, 2010; Lukančič in sod., 2010), embrionalnega razvoja (Vick in Blum, 2010) in evolucije (Protas in sod., 2011). Še posebej pa je primeren za študije prilagajanja na novo okolje, saj imamo na voljo sistem, v katerem lahko primerjamo dve različni stanji: izvorno in izpeljano. Zaradi navedenega poznamo smer evolucijske spremembe. Poleg rib iz rodov *Astyanax* (Protas in Jeffery, 2012) in *Poecilia* (Kelley in sod., 2012) ter postrance *Gammarus minus* (Fong, 2012), vodni osliček postaja vedno bolj pomemben modelni organizem v biologiji podzemlja (Protas in Jeffery, 2012).

1.4 MOLEKULSKE METODE IN NJIHOVA UPORABA V BIOLOGIJI PODZEMLJA

Ko so molekulske metode postale dostopne, so se jih poslužili tudi znanstveniki, ki so raziskovali podzemlje (Sbordoni 2000; Porter 2007; Juan in sod., 2010). Genetsko pestrost in strukturo podzemnih populacij so ocenjevali s pomočjo alocimov (Caccone, 1987; Cobolli Sbordoni in sod., 1990), markerjev RAPD (Borowsky in Vidthayanon, 2001; Verovnik in sod., 2003), nukleotidnih zaporedij (Zakšek in sod., 2009; Juan in sod., 2010) in mikrosatelitov (Strecker in sod., 2003, Tobler in sod., 2008). Nastalo je veliko filogeografskih študij, ki so začele pojasnevati biogeografske vzorce, uporaba filogenetskih metod pa je prispevala k razumevanju evolucije in taksonomije (Lefébure in sod., 2006; Porter, 2007; Fišer in sod., 2008).

V zadnjih letih so nove laboratorijske tehnike (sekveniranje naslednje generacije) prispevale k vedno večjemu naboru genetskih markerjev tudi za nemodelne organizme (Meglez in sod., 2012). Omogočile so analize z večjim številom jedrnih markerjev (Protas in sod., 2011) ter celo analize na nivoju celotnega transkriptoma (Protas in Jeffery, 2012; Kelley in sod., 2012; Gross in sod., 2013).

Kljub temu do sedaj še niso bili razviti mikrosatelitski markerji za jamske nevretenčarje, saj so mikrosatelite uporabili le za raziskave na jamskih ribah. Z razvojem novih mikrosatelitskih markerjev pri vodnem osličku bomo lahko vnesli nove analitske metode tudi v raziskave jamskih nevretenčarjev.

1.4.1 Mikrosateliti

Mikrosateliti so krajše ponovitve di-, tri- ali tetranukleotidnih zaporedij. Najdemo jih v genomu večine živih bitij. Dolžina mikrosatelitskega lokusa je zelo variabilna. Dolga je od 5 do 40 ponovitev, lahko je tudi daljša. V genomu je največ dinukleotidnih zaporedij in leta so največkrat uporabljena v raziskavah. Mikrosateliti se najpogosteje pojavljajo v nekodirajočih regijah, če pa so prisotni v kodirajoči regiji, so to ponavadi tri- ali heksanukleotidne ponovitve, ker ne vplivajo na spremembo bralnega okvira (Chistiakov in sod., 2006; Selkoe in Toonen, 2006).

Poznamo več tipov mikrosatelitov:

- popolne, ki so iz ene osnovne ponovitve (motiva) (CACACACACA),
- prekinjene, pri katerih je osnovna ponovitev prekinjena s krajšo insercijo baznih parov (CACACACGCGCACA),
- sestavljene, kjer je mikrosatelit sestavljen iz dveh različnih osnovnih ponovitev (CACACACACGCGCGCG).

Mikrosatelitski lokus obdajajo t.i. robna zaporedja, ki so ohranjena pri posameznih osebkih vrste, lahko pa tudi pri osebkih sorodnih vrst. Začetni oligonukleotidi, ki se prilegajo robnim zaporedjem in z njimi v polimerazni verižni reakciji (PCR) pomnožimo mikrosatelitski lokus, definirajo posamezen lokus. S kapilarnim genetskim analizatorjem (sekvenator) določimo dolžino pomnoženega fragmenta in iz tega sklepamo na število ponovitev. Mikrosateliti se med seboj razlikujejo v številu ponovitev motiva (so polimorfni), so selekcijsko nevtralni, omogočajo prepoznavo homozigotov in heterozigotov ter sledijo Mendlovim pravilom kodominantnega dedovanja. Zaradi tega so idealni genetski označevalci za raziskave v populacijski genetiki in molekularni ekologiji. Z njihovo pomočjo se lahko, na primer, lotimo iskanja odgovorov na naslednja vprašanja: Koliko populacij je prisotnih na določenem območju? Iz katerih populacij prihajajo posamezniki? Ali se je populacija razširila ali skrčila v zadnjih letih? Kakšni so genetski odnosi med posamezniki? Kako geografske značilnosti vplivajo na strukturo populacije in migracijo? (Selkoe in Toonen, 2006) Uporabni so tudi za izdelavo karte genske povezanosti, mapiranje lokusov kvantitativnih lastnosti, določanje starševstva, identifikacijo posameznih osebkov, povezujejo pa jih tudi z nekaterimi patogenimi stanji (Chistiakov in sod., 2006).

Poznamo več različnih modelov mutacij mikrosatelitov, njihovo poznavanje pa je pomembno pri uporabi nekaterih populacijsko genetskih metod. Model neskončno alelov, IAM (infinite allele model), kjer vsaka mutacija ustvari nov alel s hitrostjo u . Pri tem modelu je predvsem pomembno, da ne dopušča homoplazije (identični aleli imajo skupnega prednika). Model s K aleli, KAM (K-allele model), predvideva možnost K alelov, verjetnost mutacije iz enega v drug alel pa je enaka ($K-1$) in omogoča homoplazijo (enaki aleli, ki nimajo skupnega prednika). Model postopnega mutiranja SMM (stepwise

mutation model) razlaga nastanek različnih alelov z dodajanjem ali izgubo ene ponovitvene enote, verjetnost za mutacijo je v obe strani enaka. Aleli bolj podobnih dolžin so si torej bolj sorodni. SMM model je bil razširjen še z dvofaznim modelom, TPM (two-phase model), ki dopušča tudi mutacije, kjer se v enem koraku alel spremeni za več kot eno ponovitveno enoto (Balloux in Lugon-Moulin, 2002).

1.5 HIPOTEZE IN CILJI RAZISKAVE

Površinske in podzemeljske populacije vodnega oslička živijo parapatrično, med seboj pa se razlikujejo tako v morfologiji kot tudi genetsko. Jamski vodni oslički so dobro prilagojeni na specifične razmere svojega habitata, zato sklepamo, da so razlike v okolju, ki ga naseljujejo, vir divergentne naravne selekcije. Ekološka divergenca površinskih in podzemeljskih populacij, pa bi morala biti povezana tudi z zmanjšanim ali celo prekinjenim genskim pretokom.

Neodvisno nastale podzemeljske populacije vodnega oslička so si med seboj morfološko podobne, pri prilagajanju na novo okolje je delovala tudi konvergentna evolucija. V ločenih parapatričnih oziroma simpatričnih parih površinskih in podzemeljskih populacij, je diferenciacija posledica ekstremnih razlik v okolju. Če se ekološka diferenciacija ujema s pojavom reproduktivne izolacije in nastanek nove vrste sovpada s prehodom v novo ekološko nišo, je proces v ozadju ekološka speciacija. V primeru, da se novonastale podzemeljske populacije med seboj lahko križajo oziroma se je med predniško površinsko in novonastalo podzemeljsko populacijo razvila enaka reprodukcijska bariera, lahko govorimo celo o pojavu paralelne speciacije.

Speciacija je postopen proces. V začetnih delih jam najdemo fenotipsko mešane populacije, kjer že opazimo redukcije pigmenta, kar je sicer značilno za živali, prilagojene na podzemeljsko okolje. Iz preteklih raziskav vemo, da so živali iz fenotipsko mešanih populacij, morfološko in genetsko bolj podobne površinskim kot podzemeljskim populacijam. Zato pričakujemo zmanjšan genski pretok med vodnimi oslički iz pravih podzemeljskih populacij in fenotipsko mešanih populacij, čeprav naseljujejo enako okolje. Novo okolje so naselili neodvisno, kar kaže, da se nahajajo na različnih stopnjah procesa speciacije. Podzemeljski vodni oslički lahko predstavljajo že samostojno vrsto, medtem ko so populacije, pri katerih se pojavljajo redukcije pigmenta še v začetnih fazah speciacije.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 GEOGRAFSKO HIDROLOŠKI OPIS OBMOČIJ VKLJUČENIH V RAZISKAVO

2.1.1 Sistem kraške Ljubljanice

Preko kraške pokrajine teče voda izmenično na površju in v podzemlju, tako se zaporedno tudi izmenjujeta površinski in podzemeljski habitat vodnega oslička. Pretok vode je močno odvisen od količine padavin. Po obilnih padavinah se kraška polja napolnijo z vodo in se spremenijo v jezera, v času suše pa je voda lahko popolnoma omejena na podzemlje.

Z jugozahodne strani preko Postojnske kotline, imenovane tudi Pivško polje, priteče reka Pivka in v Postojni ponikne v Postojnsko-Planinski jamski sistem. V Postojnski kotlini se nahaja razvodje, ki razmejuje porečja kraške Ljubljanice in reke Reke, hkrati pa tudi loči vode, ki se iztekajo v Črno in Jadransko morje. Ko Pivka ponikne, v začetnih delih teče skozi Postojnsko jamo (Spodnji Tartar), Otoško jamo, Magdaleno jamo, Črno jamo in Pivka jamo. Temu sledijo sifon in še neodkriti rovi (skoraj 2 km), reka pa zopet postane dostopna v Planinski jami, za sifonom v Pivškem rokavu. V Otoško jamo doteka še manjši površinski dotok, imenovan Črni potok (Gams, 2004).

Na jugovzhodnem delu raziskovalnega območja površinske vode iz Loškega polja poniknejo v podzemlje (reka Obrh) in na površje spet pritečejo na Cerknškem polju oziroma Cerknškem jezeru. Na poti podzemnega toka reke Obrh so v letu 2011 po dolgotrajni suši jamarji odkrili novo jamo Obrh Čolniči. V njej so našli jamske živali, med drugim tudi podzemeljske vodne osličke. Fizikalno-kemijske analize vode, so pokazale, da se sem stekajo vode tudi iz smeri Javornikov (Prelovšek in Kržič, 2012).

Cerkniško jezero je največje kraško polje v Sloveniji, kamor z vzhoda in severa s Slivnice ter že omenjenega Loškega polja, pritekajo vode, glavni vodni pritok pa je Stržen. Na severnem delu nizke vode odtekajo tudi direktno proti Planinskemu polju. Ob naraščanju jezera pritoki presegajo odtoke, ob upadanju vodostaja, pa je situacija obratna. Obseg jezera zaradi ravnega naplavinskega dna zelo niha, in sicer od 0 do 27,3 km², v povprečju pa je jezero v koledarskem letu prisotno pol leta. Na severozahodnem delu jezera je veliko jam, največja med njimi je Karlovica.

Na tem delu voda s padcem teče proti Rakovemu Škocjanu, katerega vodne razmere so zato močno odvisne od vodnih razmer Cerknškega jezera. To je 800 m dolga dolina potoka Rak, izvir je v Zelških jamah (4,7 km). Vodni rokav Zelških jam zalivajo tri jezera, ko pa so potapljači preplavali 34 m globok sifon so odkrili še nov rov, kjer struga ni stalno zapolnjena. Ob obilnih padavinah voda priteka v Rakov Škocjan še iz drugih manjših izvirov in dolino popolnoma preplavi (nastane približno 10 m globoko jezero). Takrat voda iz Javornikov verjetno odteka proti Planinskemu polju tudi mimo Raka. Ob zelo nizkih

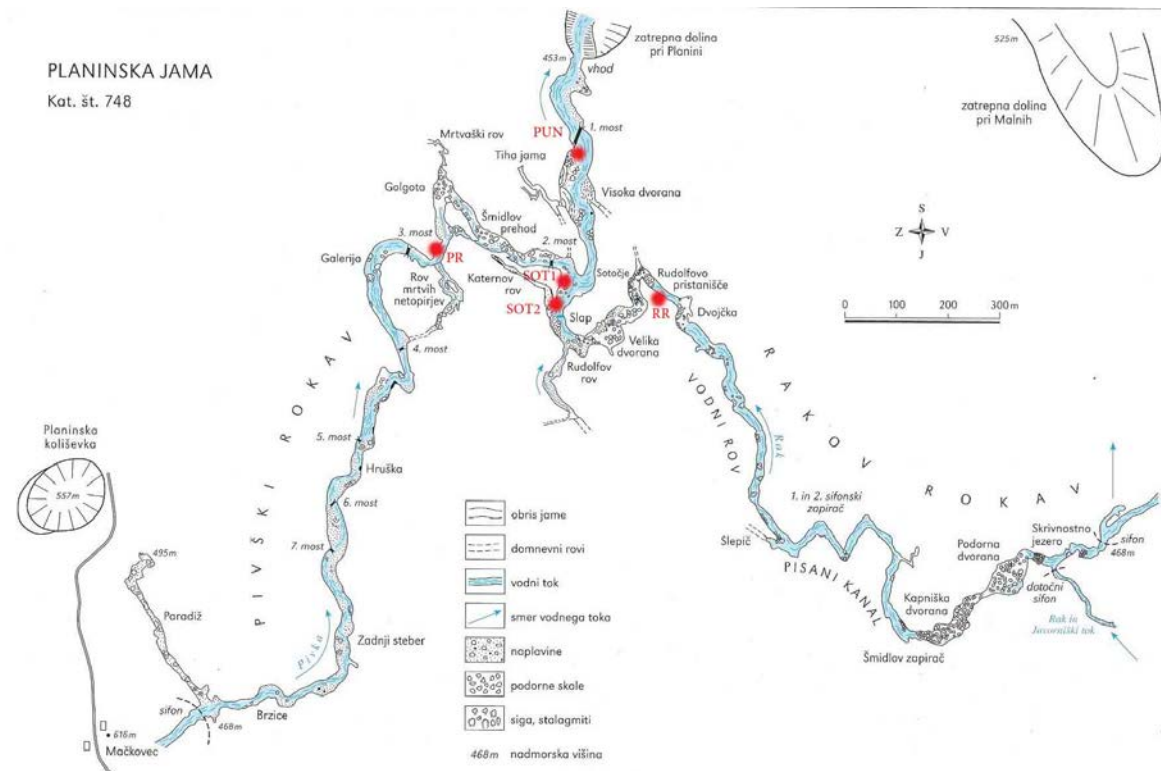
vodah Rak ponikne pod Velikim naravnim mostom in vsa voda se poveže z izviro Škratovka na Planinskem polju. Dolina je najverjetneje nastala s tektonskim ugrezanjem, saj zunaj nje ni sledov rečnega toka in naplavin.

Za Velikim mostom teče Rak v Tkalco jamo (2.885 m). Sestavljata jo dva rokava, ki se končata s sifonom, od katerega je 2 km oddaljena Planinska jama. V Planinski jami se Pivka in Rak združita v Unico.

Voda na 9 km² veliko Planinsko polje priteče iz Planinske jame in zatrepne doline Malni (Malenščica) ter Škratovke. V Malnih je črpališče vode, ki pa ni povsem neoporečna, saj nekaj onesnažene vode priteče tudi iz Cerknškega jezera. Ob nizkih vodah teče Unica le do ponorov v obrobni apnencih jugovzhodno od Laz, ob večji količini vode, dokler le-ta popolnoma ne zalije polja, pa teče do požiralnikov in ponorov Pod stenami (Katavotron) na skrajnem severnem delu. Unica prispeva manj kot polovico voda, ki potem dosežejo izvire Ljubljani. Najdaljši jami na severnem obrobju Planinskega polja sta Logarček (2.654 m) in Najdena jama (4.987 m). Gladina vode je v obeh jamah precej nižja od dna polja, skozi njiju v glavnem ne tečejo več reke oziroma ju zalijejo le ob zelo visokih povodnjih. Voda se večinoma zadržuje ujeta v kotanjah (Gams, 2004).

2.1.2 Planinska jama

Jama je dolga skoraj 7 km, sestavljajo jo visoki in široki vodni rovi. Jama je edinstvena zaradi podzemnega sotočja dveh rek: z zahodne strani vanjo priteče Pivka, z vzhodne strani pa Rak. Približno pol kilometra globoko v jami se reki združita v Unico, ki od tu teče na Planinsko polje. Ponekod so stropni udori zaježili vodni tok v številne vodne tolmine, in sicer tako v Pivškem, kot tudi Rakovem rokavu. Na koncu Rakovega rokava se nahaja 30 m globoko Skrivnostno jezero, kamor stalno priteka voda iz Javornikov in skozi nižji rov še voda iz Raka. Voda takoj spet ponikne pod jamskim stropom in izvira v Malnih, do koder vodi zapleten labirint potopljenih rovov. Pred izviro Malenščice se nahaja ožina, zaradi katere se del vode v Skrivnostnem jezeru začne pretakati v Rakov rokav Planinske jame. Ob nizkih vodah je dotok vode v Rakov rokav lahko popolnoma prekinjen in iz Planinske jame teče predvsem Pivka. Vodni režim na sotočju je tako zelo spremenljiv. Od vodnih razmer na Pivškem polju, Cerknškem jezeru in v Rakovem Škocjanu je odvisno, iz katerega rokava bo tekla močnejši tok. Na podlagi grušča, najdenega v obeh rokavih jame, predvidevajo, da je nekoč Pivka tekla v Rakov rokav (Gams, 2004).

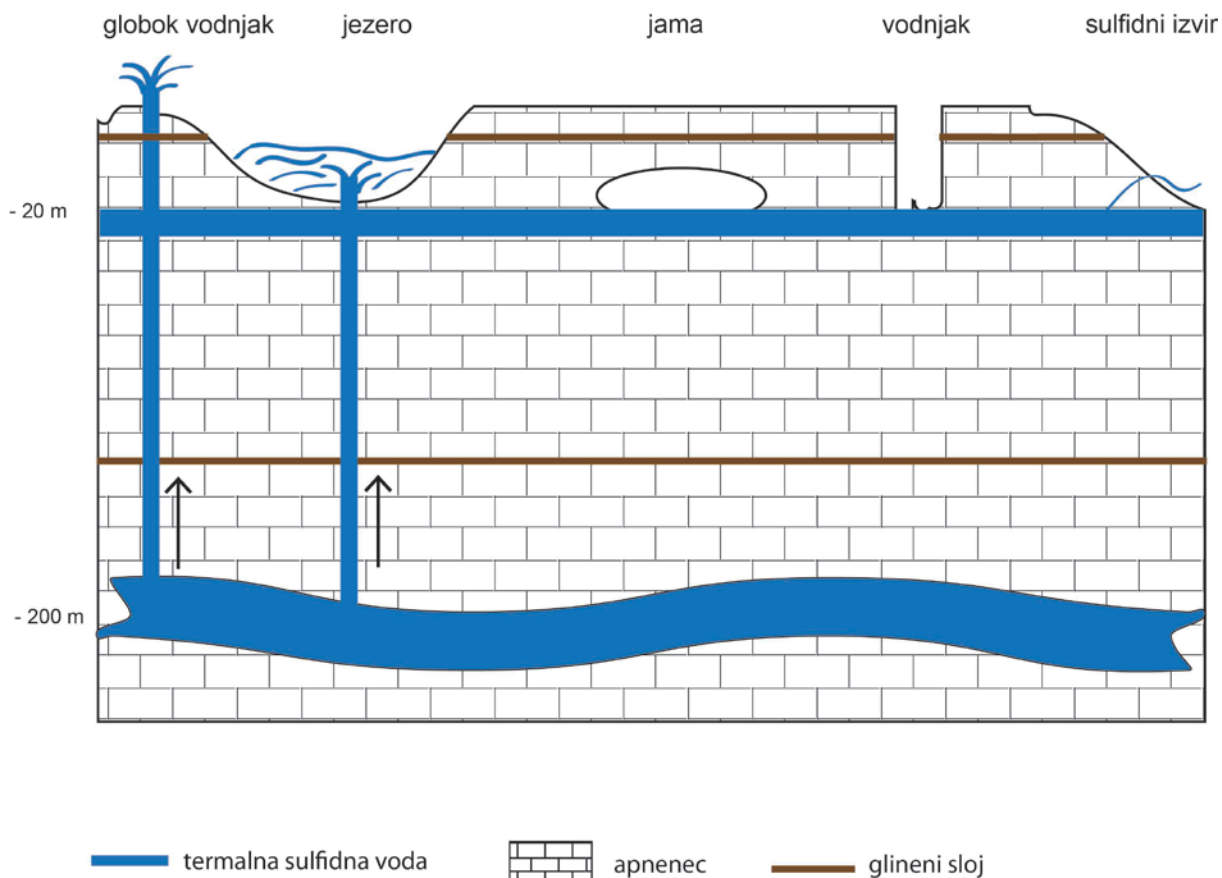


Slika 1: Načrt Planinske jame z označenimi vzorčnimi lokacijami (Gams, 2004)

Figure 1: Plan of Planina cave with sampling sites (Gams, 2004)

2.1.3 Podzemni sistem s termalno sulfidno vodo v Romuniji

Na zahodni obali Črnega morja v okolici mesta Mangalija (Dobrogea) lahko najdemo kraško pokrajino. Arteška termalna sulfidna voda zapolnjuje mrežo podzemnih kanalov, ki se nahajajo na globini 200 m. Voda se dviga proti površju po geoloških razpokah (Lascu in sod., 1995) in doseže zadrževalnik podtalnice na globini 20 m, ali pa priteče na površje skozi manjše izvire ob morski obali (bodisi na kopnem bodisi v morju). Podzemeljska favna je zelo bogata (Culver in Sket, 2000), večina vrst je endemnih, živijo pa le v zgornjem zadrževalniku podtalnice (Sarbu, 2000). Do podzemne vode, in s tem do podzemeljskih vodnih živali, lahko dostopamo preko izvirov, vodnjakov in v spodnjem nadstropju Movile jame (Slika 2). Redoks reakcije med H_2S v vodi in atmosferskim kisikom omogočajo obstoj kemoavtotrofnih bakterij, ki prekrivajo vodno gladino. In situ fiksacija ogljika mikroorganizmov jih postavlja na dno prehranjevalne verige, kar omogoča obstoj bogatega in raznolikega kemoavtotrofnega ekosistema (Sarbu, 2000). Ker pa se kisik raztaplja le v enem milimetru vodnega stolpca, je vsa vodna favna omejena na gladino (Riess in sod., 1999).



Slika 2: Geološki prerez kraškega območja v okolici Mangalije (Romunija). Jamske živali naseljujejo zgornji zadrževalnik termalne sulfidne vode na globini 20 m. Slika prikazuje različne načine dostopa do podtalne vode in s tem jamskih živali

Figure 2: Geological crosssection of karst area around Mangalia (Romania). Cave animals inhabit upper sulfidic groundwater aquifer. Different ways of accessing groundwater and cave animals are shown

2.2 NABIRANJE VZORCEV POVRŠINSKIH IN PODZEMELJSKIH POPULACIJ VODNEGA OSLIČKA

Za namen analize z mikrosatelitskimi markerji smo v roku treh let čimbolj natančno povzorčili sistem kraške Ljubljanice, in sicer smo na vsaki lokaciji poskušali nabrati vsaj 30 osebkov. Nekaj vzorcev smo vzeli iz zbirke. Preglednica 1 prikazuje seznam lokalitet in število osebkov, ki smo jih vključili v analizo z mikrosateliti ali v analizo mitohondrijske DNK. Lokalitete so prikazane tudi na sliki 3, koordinate lokalitet so podane v prilogi A. Vodne osličke smo nabirali na površju in v podzemlju, kjer smo našli jamske in fenotipsko mešane populacije.

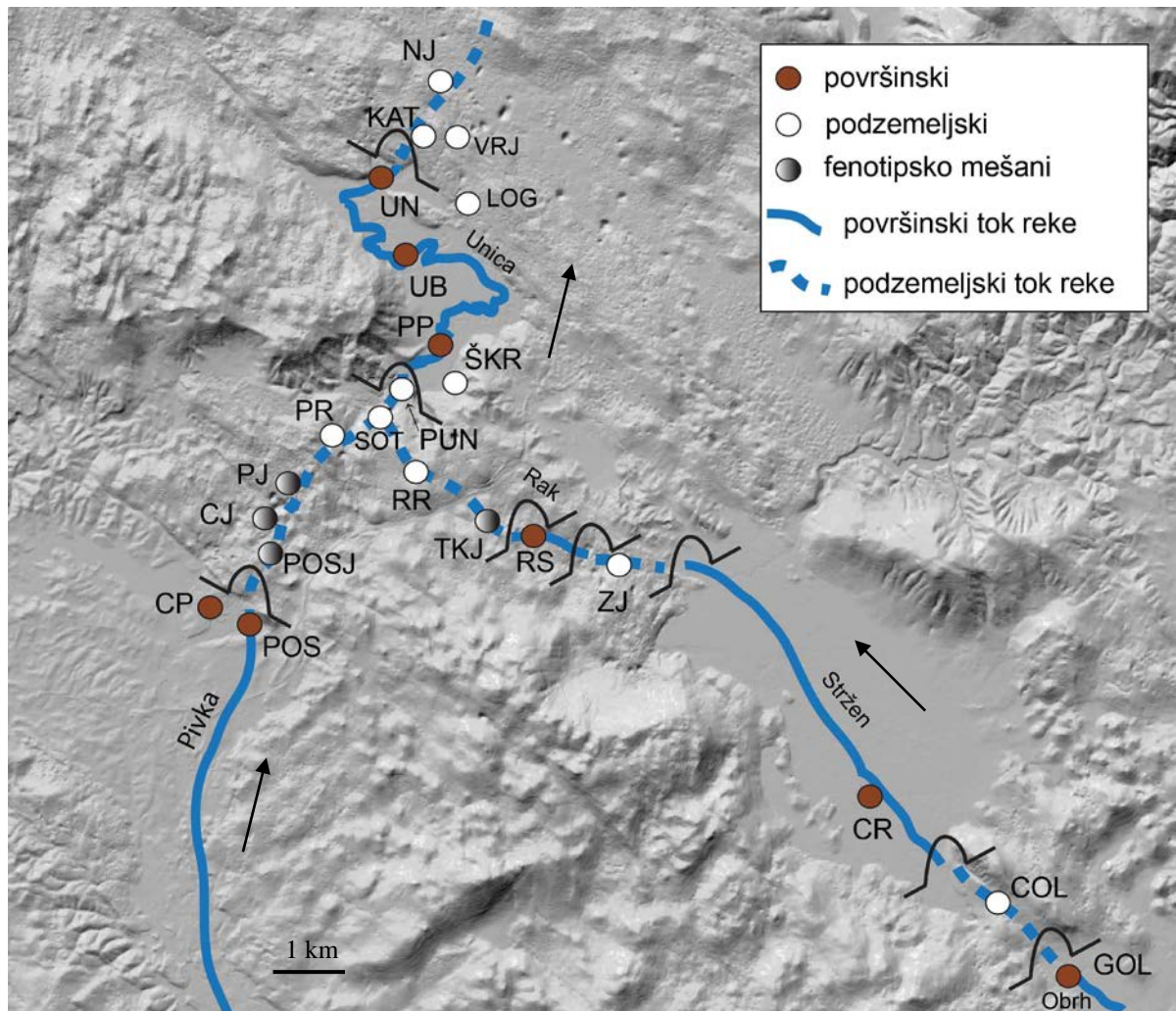
Podzemeljske vodne osličke smo nabrali v Planinski jami v Pivškem rokavu (PR) in v Rakovem rokavu (RR). Del osebkov iz Rakovega rokava smo vzeli iz zbirke. Na sotočju smo vzorčili na dveh mestih (Slika 1), bližje pritoku Pivke (SOT1) in bližje pritoku Raka (SOT2). V obdobju treh let so se vodne razmere večkrat močno spremenile, prišlo je do močnih poplav kot do dolgotrajne suše. V podzemnem delu Unice tik za prvim mostom smo vodne osličke nabrali le v času ekstremne suše, ko se je reko dalo prečkati celo peš. To vzorčno mesto smo pregledali trikrat (junij 2011, december 2011, februar 2012), ko je bila voda dovolj nizka in brez brzic. V decembru nismo našli nobenega vodnega oslička, medtem ko smo jih v februarju lahko nabrali kar veliko (39 osebkov).

Severno od Planinskega polja smo se v času nizkih voda (zima in pomlad 2012) po podzemeljske vodne osličke spustili v Najdeno jamo (NJ) in jamo Logarček (LOG) ter v Katavotron (KAT), kamor s Planinskega polja ponikne Unica. V Logarčku smo lahko nabrali le 12 osebkov, ki so bili ujeti v bazenih nizke vode. Na obeh straneh Rakovega Škocjana lahko dostopamo do jam, tako da smo nabrali vzorce v Zelških jamah (ZJ) ter v Tkalci jami (TKJ), kjer Rak ponikne. Tam smo nepričakovano našli fenotipsko mešano populacijo.

V začetnih delih podzemne Pivke smo nabrali vzorce v Postojnski jami (POSJ), Črni jami (CJ) in Pivki jami (PJ). Za genetsko analizo smo vzorec iz Pivke jame najprej vzeli iz zbirke, kasneje pa smo nabrali tudi svež vzorec, ki pa je bil vključen le v morfološki pregled in določitev različnih fenotipov.

Na površju smo vzeli vzorce z vseh delov, kjer reke prečkajo površje. Na zahodnem delu smo v času močne suše poleti 2012 nabrali površinske vodne osličke tik pred vhodom v Postojnsko jamo (POS) in v bližnjem Črnem potoku (CP), kjer so bili ujeti v nekaj lužah. Na Planinsko polje smo šli vodne osličke iskat na tri različne točke (PP, UB, UN), da bi zajeli čimbolj pester vzorec. Nabrali smo jih v različnih letih (2010 – 2012), v času ko je bila Unica zelo nizka. V analizo z mikrosateliti smo vključili še populaciji vodnih osličkov iz Rakovega Škocjana (RS) in iz zbirke vzeli vzorec iz Cerkniškega jezera (CR). Z Loškega polja (GOL) smo imeli na voljo le 11 osebkov in jih nismo vključili v analizo z mikrosateliti.

V analizo mitohondrijske DNK smo vključili nukleotidna zaporedja, ki so že bila na voljo (Verovnik in sod., 2004). Ponekod smo analizirali še dodatne osebkove in vključili nove lokalitete (Preglednica 1, Priloga A).



Slika 3: Lokacije nabranih vzorcev vodnega oslička (*Asellus aquaticus*) iz sistema kraške Ljubljanice. Tok rek je prikazan shematično, puščice označujejo smer vodnega toka. Vzorce smo ločili na površinske, podzemeljske in fenotipsko mešane. Okrajšave so podane v Preglednici 1

Figure 3: Sampling locations of *Asellus aquaticus* from Ljubljana river system. Arrows show the direction of the water flow. Samples are from subterranean, surface or phenotypically mixed populations. Abbreviations are explained in Table 1

Preglednica 1: Lokacije vzorcev vodnega oslička (*Asellus aquaticus*) iz sistema kraške Ljubljanice. Predstavljene so kratice na karti iz slike 3, tip vzorca in število osebkov, ki smo jih genotipizirali z mikrosateliti in določili nukleotidna zaporedja mitohondrijskega gena COI

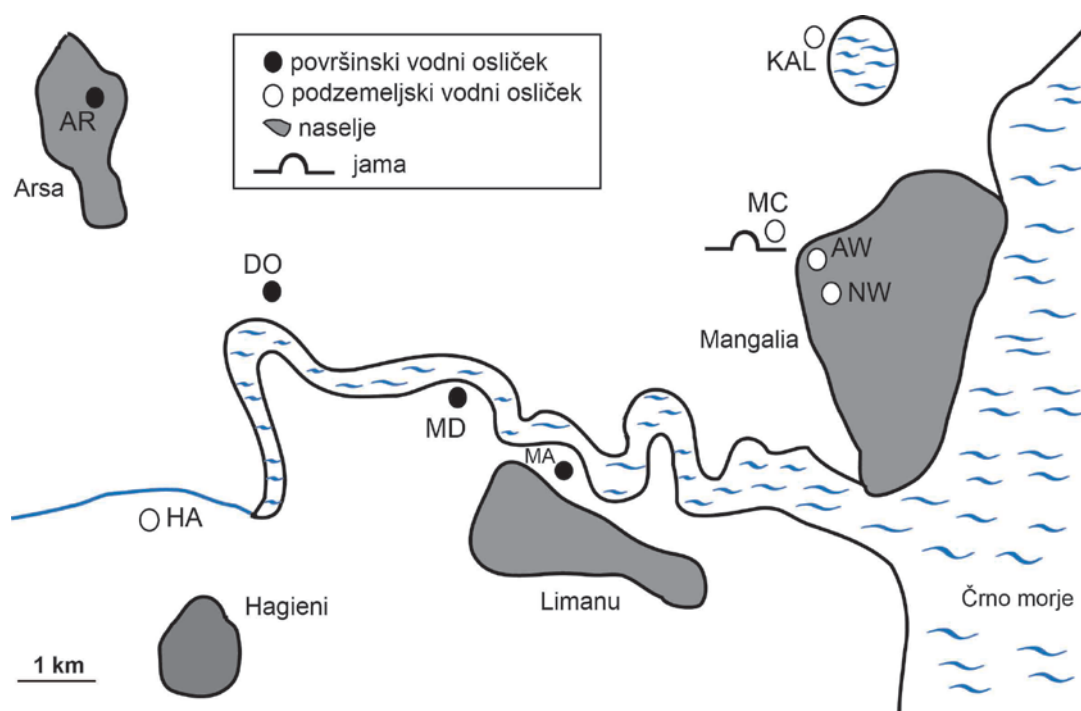
Table 1: Sampling locations of *Asellus aquaticus* from Ljubljana river system. Codes used for sampling sites in figure 3 are shown. Habitat type of the sampled site and the number of individuals used for genotyping with microsatellites and sequencing of mitochondrial gene are also given

Lokacija	Kratice na sliki 3	Tip vzorca	Št. osebkov za genotipizacijo	Št. osebkov za COI
Planinsko polje	PP	površinski	32	10*
Planinsko polje – Unica pod mostom	UB	površinski	28	10
Planinsko polje – Unica pred katavotronom 2	UN	podzemeljski	12	11
Planinska jama- Unica, tik za prvim mostom	PUN	podzemeljski	50	/
Planinska jama- sotočje	SOT	podzemeljski	112	21
Planinska jama- Pivški rokav	PR	podzemeljski, površinskih	78+6	21*
Planinska jama- Rakov rokav	RR	podzemeljski	93	12*
Jama Škratovka	ŠKR	podzemeljski	6	/
Tkalca jama	TKJ	fenotipsko mešani	44	9
Rakov Škocjan	RS	površinski	30	10
Zelške jame	ZJ	podzemeljski	34	15*
Cerkniško jezero	CR	površinski	30	10*
Jama Obrh Čolniči	COL	podzemeljski	30	10
Golobina, Loško polje	GOL	površinski	/	10
Pivka jama	PJ	fenotipsko mešani	31	10*
Črna jama	CJ	fenotipsko mešani	30	15*
Postojnska jama- spodnji Tartar	POSJ	fenotipsko mešani	32	9
Pivka polje-vhod v Postojnsko jamo	POS	površinski	7	/
Pivka polje, Črni potok	CP	površinski	17	10*
Logarček	LOG	podzemeljski	13	10
Katavotron 2	KAT	podzemeljski	12	10
Najdena jama	NJ	podzemeljski	49	14*
Vranja jama	VRJ	podzemeljski	3	2
Gašpinova jama	LO	podzemeljski	/	5*
Izviri Ljubljanice	LJ	podzemeljski	/	5*

* Nukleotidna zaporedja COI mitohondrijskega gena so iz preteklih raziskav, pri večjih vzorcih pa smo jih še nekaj dodali

V Romuniji je podzemeljski vodni osliček razširjen le v sulfidni termalni vodi, vzorce smo nabrali v jami Movile (MC), v dveh vodnjakih (NW, AW) in v jezeru Karaoban (KAL). Tu se podzemeljski osebki celo prehranjujejo na površju. Naša opažanja se skladajo z analizami izotopov, ki so predvidele, da hrana podzemeljskih živali ne izvira le iz od površja izoliranih delov podtalnice (Sarbu, 2000). Tipična lokaliteta za podzemeljske vodne osličke (*A.a.infernus*) je sulfidni izvir Hagieni (HA). Leta 2011 je bil izvir suh, zato smo v analizo vključili star vzorec iz zbirke. Površinsko obliko vodnega oslička najdemo v sladki vodi, parapatricno s podzemeljskimi. Nikoli pa jih niso opazili v sulfidni vodi. Vzorce površinskih vodnih osličkov smo nabrali vzdolž reke Limanu (DO, MD, MA) ter v vodnjaku s sladko vodo v vasi Arsa (AR) (Slika 4, Preglednica 2).

Za potrebe filogenetske analize romunskih populacij, smo nabor lokalitet, ki je bil vključen v preteklo obsežno filogeografsko študijo vodnega oslička (Verovnik in sod., 2005), dopolnili z vzorci iz Ukrajine in Romunije (Slika 16, Priloga A).



Slika 4: Vzorčne lokacije vodnega oslička (*Asellus aquaticus*) v okolici Mangalije (Romunija)

Figure 4: Sampling locations of *Asellus aquaticus* around Mangalia (Romania)

Preglednica 2: Lokacije vzorcev vodnega oslička (*Asellus aquaticus*) iz okolice Mangalije (Romunija). Predstavljene so kratice na karti iz slike 4 in število osebkov, ki smo jih genotipizirali z mikrosateliti in določili nukleotidna zaporedja mitohondrijskega gena COI

Table 2: Sampling locations of *Asellus aquaticus* around Mangalia (Romania). Codes used for sampling sites in figure 4 are shown. Habitat type of the sampled site and number of individuals used for genotyping with microsatellites and sequencing of mitochondrial gene are also given

Lokacija	Kratice na sliki 4	Tip vzorca	Št. osebkov za analizo COI	Št. osebkov za genotipizacijo
Netoi Street, vodnjak	NW	podzemeljski	31	30
D. Ana Street, vodnjak	AW	podzemeljski	10	12
jama Movile	MC	podzemeljski	3	3
jezero Karaoban	KAL	podzemeljski	30	31
Hagieni, sulfidni izvir	HA	podzemeljski	3	6
Limanu, obala reke	DO	površinski	12	17
	MA	površinski	5	9
	MD	površinski	14	18
Arsa, vodnjak s sladko vodo	AR	površinski	8	8

2.3 RAZVOJ, TESTIRANJE IN OPTIMIZACIJA NOVIH ANALITSKIH LOKUSOV (MIKROSATELITOV)

Celokupno genomsko DNK smo izolirali iz štirih podzemeljskih vodnih osličkov, ki smo jih nabrali v Planinski jami v rokavu Pivke (vavčerji AA001, AA002, AA004, AA005). Izolirano DNK smo poslali podjetju Genetic Identification Services v Kaliforniji, ZDA (www.genetic-id-services.com), ki se komercialno ukvarja z iskanjem mikrosatelitov. Mikrosatelite so poiskali s klasičnim pristopom, z izdelavo obogatene genomske knjižnice. DNK vodnega oslička so z encimi razrezali na krajše fragmente (300 do 700 bp) in poiskali fragmente, ki so vsebovali ponavljajoče se motive CA, AAC, ATG in TAGA. Izbrane fragmente so vstavili v plazmid pUC19 in tega z metodo elektroporacije v bakterijo *Escherichia coli*. Bakterije so namnožili, izolirali plazmide in pomnožili vstavljeni fragment. Kot rezultat storitve smo dobili nukleotidna zaporedja 240 kratkih fragmentov in zaporedja začetnih oligonukleotidov.

Iskanja mikrosatelitskih zaporedij smo se lotili s programom QDD (Meglez in sod., 2010) in JSTRING (Parisi in sod., 2003, De Fonzo, 2008) ter vsa zaporedja tudi še preverili na roko in jih v programu za oblikovanje besedil označili z barvami. Kasneje smo v programu Geneious (Biomatters) lahko v ta namen uporabili dodatek (Plug-in) Phobos.

Vsa nukleotidna zaporedja niso vsebovala mikrosatelitov ali pa so bili ti neustrezne dolžine (premalo ali preveč ponovitev). Za nekaj nukleotidnih zaporedij se je izkazalo, da so enaka (A3 in A11/D101 in D104/A104 in A131) ali pa se enostavno ni dalo izbrati primerne mesta, kamor bi se prilegal začetni oligonukleotid.

Testirali smo 105 parov začetnih oligonukleotidov (Priloga B). Za testiranje smo uporabili osebke iz treh populacij: Pivški rokav in Rakov rokav (Planinska jama) ter Planinsko polje. Če želimo dolžino produktov preveriti na kapilarnem genetskem analizatorju, je potrebno produkte označiti s fluorescenčnim barvilom. Barvilo je pritrjeno na en začetni oligonukleotid v paru. Ker je sinteza začetnih oligonukleotidov z dodanim fluorescenčnim barvilom precej draga, smo uporabili cenejšo metodo – tailing protokol (Schuelke, 2000, Bandelj in sod., 2004). Krajšemu začetniku v paru smo dodali univerzalno nukleotidno zaporedje M13 (5-GGT-TTT-CCC-AGT-CAC-GAC-GT-3) (tail). Posebej smo nukleotidno zaporedje M13 označili z barvilom. V verižno reakcijo s polimerazno smo tako dodali 3 začetne oligonukleotide: 2 specifična za lokus in univerzalni M13 z dodanim barvilom. Temu smo tudi prilagodili količine reagentov in pogoje reakcije, po navodilih posredovanih s strani Genetic Identification Services (Preglednici 3 in 4). Reakcije smo optimirali s spreminjanjem temperature pri prvi vezavi začetnih oligonukleotidov in številom ciklov.

Preglednica 3: Sestava verižne reakcije s polimerazo za protokol z označenim začetnim oligonukleotidom M13

Table 3: Volumes of chemicals used in PCR reaction with M13 fluorescent labeled primer

Reagenti	Volumen za eno reakcijo
H ₂ O	6.9 µL
10 x Biotools pufer z MgCl ₂	1.0 µL
dNTP (2 mM Fermentas)	0.8 µL
Začetni oligonukleotid z dodanim M13 zaporedjem (20µM)	0.1 µL
Začetni oligonukleotid (20µM)	0.1 µL
Začetni oligonukleotid M13 označen z barvilom* (20µM)	0.05 µL
Biotools Taq - polimeraza (5U/µL)	0.05 µL
Vzorec DNK	1.0 µL
Volumen reakcije	10 µL

*Uporabili smo dva M13 začetnika, enega smo označili s 6-FAM (modra), drugega pa s HEX (zelena) fluorescenčnim barvilom. To nam je omogočilo, da smo kasneje lahko produkte za analizo na kapilarnem genetskem analizatorju združili

Preglednica 4: Tailing protokol, ki smo ga uporabili za prvi krog testiranja parov začetnih oligonukleotidov

Table 4: Tailing protocol used for first round of testing primers for microsatellite loci

Začetna denaturacija	95 °C	5 min
Število ciklov	10	
Denaturacija	94 °C	30 s
Vezava začetnih oligonukleotidov	57 °C	1 min
Elongacija	72 °C	30 s
Število ciklov	25	
Denaturacija	94 °C	30 s
Vezava začetnih oligonukleotidov	55 °C*	1 min
Elongacija	72 °C	30 s
Končna elongacija	72 °C	10 min

* Vezavna temperatura za začetni oligonukleotid tail -M13

V začetni fazah testiranja smo uspešnost reakcije in morebiten polimorfizem v dolžini pomnoženega fragmenta preverili s horizontalno elektroforezo v 1,8 % agaroznem gelu z dodanim etidijevim bromidom v 1 x pufru TAE. Dolžino pomnoženega fragmenta smo ocenili s pomočjo standarda "GeneRuler™ 100bp DNA" (Fermentas).

1 µl PCR produkta vsakega vzorca smo prenesli v 9 µl mešanice formamida (Applied Biosystems) (8,75µl) in dolžinskega standarda GS500-LIZ (Applied Biosystems) (0,25 µl). Natčno dolžino uspešno pomnoženih fragmentov smo preverili na kapilarnem genetskem analizatorju ABI 3500. Za analizo elektroferogramov smo uporabili program GeneMapper (Applied Biosystems). Za prepoznavo mikrosatelitskih alelov in določanje genotipov smo si pomagali z algoritmom, ki so ga razvili Skrbinšek in sod. (2007).

2.3.1 Končni nabor mikrosatelitskih markerjev in multipleks reakcije

Sestavili smo nabor 25 mikrosatelitskih lokusov (Preglednica 5, Priloga C). Nekatere začetne oligonukleotide smo označili s fluorescenčnimi barvili 6-FAM (modra), VIC (zelena) in PET (rdeča), kar nam je omogočilo pomnoževanje več lokusov v eni sami reakciji (multipleks).

Multipleks reakcija skrajša čas genotipizacije, hkrati pa je cenejša. Za analizo velikosti fragmenta na kapilarnem genetskem analizatorju potrebujemo le 1 μ l vzorca, zaradi česar lahko volumen reakcije močno zmanjšamo (Guichoux in sod., 2011). Z različnimi barvili in z upoštevanjem dolžin produktov smo lahko sestavili reakcije, kjer hkrati pomnožimo in analiziramo več lokusov. Število lokusov se je raztezalo od dveh do sedmih, nekaj lokusov pa smo pomnožili posebej (Preglednica 5).

Za reakcije smo uporabili že pripravljeno mešanico reagentov, namenjeno multipleks reakcijam, Qiagen Multiplex PCR Kit. Kasneje je na tržišče prišla nova mešanica, pripravljena prav za genotipizacijo z mikrosateliti Type-it Microsatellite PCR Kit (Qiagen). V obeh primerih smo se pri oblikovanju protokolov držali navodil proizvajalca, volumne reagentov smo prilagodili končnemu volumnu reakcije (5 μ l).

Protokol reakcije je prilagojen specifičnim zahtevam polimeraze v mešanici reagentov. Začetna denaturacija je potrebna tudi za aktivacijo encima (hot-start polimeraza). Dolga končna elongacija je prilagojena pomnoževanju mikrosatelitov, da ne prihaja do dodajanja različnega števila adeninskih preostankov, kar se pri kasnejši analizi odraži kot več dolžin fragmenta (split-peak). Kljub temu se navedenemu pojavu pri nekaterih lokusih nismo mogli izogniti.

Določene analize zahtevajo, da se mikrosateliti držijo modela mutiranja SMM. V nasprotnem primeru jih moramo v teh analizah izločiti. Če se dolžine pomnoženega fragmenta vedno razlikujejo za dve oziroma tri ponovitve (dinukleotidni ali trinukleotidni motiv), sklepamo, da prihaja do mutacij pri pomnoževanju DNK, kjer polimeraza naredi napako in izpusti ali doda kakšno ponovitev (Chistiakov in sod., 2006). Seveda vedno obstaja možnost, da je prisotna še kakšna drugačna mutacija, vendar je, razen z natančno določitvijo nukleotidnega zaporedja, ne moremo zaznati. Pri nekaj lokusih smo opazili, da se v nekaterih primerih dolžina fragmenta ne ujema s pričakovano. Če je bil le osebek homozigot za tak alel, smo ga sekvencirali in ugotovili, za kakšno mutacijo gre. Tako smo se lahko prepričali ali mikrosatelit sledi modelu mutiranja SSM ali ne. Na podlagi teh rezultatov smo se prepričali, da smo res pomnožili isti lokus in popravili dolžino fragmenta, tako da smo lahko upoštevali število ponovitev.

Preglednica 5: Mikrosatelitski lokusi in pogoji reakcij za genotipizacijo vodnih osličkov. V oklepajih so spremenjeni pogoji za genotipizacijo površinskih in fenotipsko mešanih populacij. Barva označuje, kakšno flourescenčno barvilo je vezano na en začetni oligonukleotid v paru

Table 5: Microsatellite loci and PCR reaction conditions used for genotipization of *Asellus aquaticus*. Setting used for genotipization of samples from surface and phenotypically mixed populations are in parenthesis. Colour represents the flourescent label of the primer

Lokus	Multipleks reakcija	Koncentracija začetnikov **[μM]	Ta [°C]	Število ciklov
A2	MIX	0.2	58	32
A108	MIX	0.2	58	32
A11	MIX	0.2	58	32
A123	MIX	0.2	58	32
A129	MIX	0.2	58	32
A138	MIX	0.1	58	32
A105	MIX	0.1	58	32
C106	MIX3	0.2	57+55	10+25
C6	MIX3	0.2	57+55	10+25
A111	MIX3	0.2	57 + 55	10+25
A9	A9+A12	0.2	53 + 55	10+27
A12	A9+A12	0.2	53 + 55	10+27
A104	A104	0.2	59 +55	10+25
A133	A133	0.2	57 + 55	10+25
A227	JAM1	0.1	62*	30
A262	JAM1	0.2	62*	30
	(JAM-POV)		(58)	32
A106	JAM1	0.1	62*	30
A234	JAM1	0.2	62*	30
	(JAM-POV)		(58)	32
A236	JAM1	0.2	62*	30
	(JAM-POV)		(58)	32
A110	JAM1	0.2	62*	30
	(A110)		(58)	32
A229	JAM2	0.2	58	32
A114	JAM2	0.2	58	32
C7	JAM4	0.2	59 +55	10+25
B6	JAM4	0.2	59 +55	10+25
A129a	JAM4	0.2	59+55	10+25

Za pomnoževanje lokusov, katerih imena niso obarvana, smo uporabili tailing protokol in dodali še M13 začetnik, zato sta napisani dve temperaturi in dve števili ciklov. ** koncentracija je enaka za oba začetna oligonukleotida v paru; *62 °C touch down po 0,5 °C, dokler ne doseže 59 °C, na to še 23 ciklov pri temperaturi 59 °C.

Preglednica 6: Reagenti in njihovi volumni v verižni reakciji s polimerazo za pomnoževanje mikrosatelitskih lokusov

Table 6: Volumes of the chemical used in PCR reaction for amplification of microsatellite loci

Reagenti	Volumen za eno reakcijo
2x Multiplex PCR Master Mix ali 2x Type-it Multiplex PCR Master Mix	2.25 μ l
Q-Solution 5x	0.45 μ l
Začetniki (0.2 μ M) – volumen za posameznega	0.05 μ l, pri koncentraciji 0.2 μ M*
H ₂ O (RNase-free water)	Spreminja se glede na volumen začetnih oligonukleotidov
Vzorec DNK	0.5 μ l
Končni volumen	5 μ l

* Koncentracije v posamezni multipleks reakciji so podane v preglednici 5

Preglednica 7: Protokol za pomnoževanje mikrosatelitskih lokusov. Število ciklov (x) in vezavna temperatura (*T_a*) sta specifična za posamezen lokus in sta podana v preglednici 5

Table 7: Protocol for amplification of microsatellite loci. Number of cycles (x) and annealing temperature (*T_a*) are specific for each loci and are listed in table 5

	Multiplex PCR kit		Type-it Microsatellite Kit	
Začetna denaturacija	95 °C	15 min	95 °C	5 min
Število ciklov	x		x	
Denaturacija	94 °C	30 s	95 °C	30 s
Vezava začetnih oligonukleotidov	<i>T_a</i>	90 s	<i>T_a</i>	90 s
Elongacija	72 °C	1 min	72 °C	1 min
Končna elongacija	60 °C	30 min	60 °C	30 min

2.3.2 Romunski vzorci

Na vzorcih iz Romunije smo uspešno pomnožili osem lokusov. Najprej smo testirali vsakega posebej, ko pa smo poznali dolžine alelov, smo jih bodisi združili v multipleks reakcije bodisi združili produkte pred analizo na kapilarnem genetskem analizatorju. Če se je pri kakšnem vzorcu posamezen lokus v multipleks reakciji slabše pomnožil, smo reakcijo ponovili samo s tem parom začetnih oligonukleotidov. Volumni reagentov in protokoli so enaki kot v preglednicah 6 in 7.

Preglednica 8: Nabor mikrosatelitskih lokusov za analizo romunskih vzorcev

Table 8: Microsatellite loci used in analysis of romanian samples

Lokus	Multipleks reakcija	Koncentracija začetnih oligonukleotidov [μ M]	Ta [$^{\circ}$ C]	Število ciklov
A2	A2	0.2	58	35
A110	JAM-ROM	0.2	58	35
A262	JAM-ROM	0.2	58	35
A234	JAM-ROM	0.2	58	35
A236	JAM-ROM	0.1	58	35
C6	JAM-ROM	0.1	58	35
A9	A9	0.2	53	10+27
A111	A111	0.2	57+55	10+25

2.4 POPULACIJSKO GENETSKE ANALIZE

S programom Micro-Checker 2.2.3 (van Oosterhout in sod., 2004) smo preverili točnost genotipizacije (napaka zaradi stutteringa ali slabše amplifikacije daljšega alela) in morebitno prisotnost ničnih alelov, ki jo program zazna kot preveliko število homozigotov v populaciji.

V programu Arlequin 3.5 (Excoffier in sod., 2010) smo izračunali osnovne populacijsko genetske parametre: število alelov v populaciji, opaženo heterozigotnost (H_o), pričakovano heterozigotnost (H_e), test Hardy-Weinbergovega ravnovesja, vezavno neravnovesje lokusov, Garza-Williamsonov indeks in izvedli interpopulacijsko analizo s klasično statistiko F_{st} . Vrednost P smo korigirali s Holm-Bonferroni metodo (Holm, 1979). Z analizo molekulske variance (AMOVA) smo testirali genetsko strukturo. V programu F_{stat} (Goudet, 2002) smo izračunali F_{is} indeks in alelsko pestrost (allelic richness).

Garza-Williamsonov indeks (G-W) (Garza in Williamson, 2001, Excoffier in sod., 2005) smo izračunali po enačbi $G-W = k/(R+1)$, pri čemer k predstavlja število alelov, R pa razpon alelov (največje število ponovitev – najmanjše število ponovitev). Zaradi razpona alelov mora lokus slediti mutacijskemu modelu SMM. Če se velikost populacije zmanjša, se zaradi izgube redkih alelov število alelov hitreje zmanjša kot razpon alelov. Zaradi tega je G-W index občutljiv na pojav ozkega grla. Populacije, kjer je prišlo do nedavnega pojava ozkega grla, naj bi imela manjšo vrednost indeksa (Garza in Williamson, 2001).

Pri podzemeljskih vzorcih smo testirali prisotnost ozkega grla še z metodo viška heterozigotnosti (heterozygosity excess), implementirano v program Bottleneck (Piry in sod., 1999). V populaciji, kjer je vzpostavljeno ravnovesje med mutacijami in genetskim driftom, je enaka verjetnost, da je na lokusu primanjkljaj ali presežek heterozigotnosti. Ali je v populaciji statistično značilno večji delež lokusov s presežkom heterozigotnosti, smo preverili s statističnim testom Wilcoxon sign-rank test (Luikart in sod., 1997).

2.5 TESTIRANJE POPULACIJSKE STRUKTURE

Ocena populacijske strukture je pomembna za določanje poti migracij in enot varstvenega upravljanja. V nekaterih primerih lahko populacijsko strukturo določimo preprosto iz geografskih značilnosti območja in s standardnimi statističnimi metodami (hi², randomizacijski test). Alternativa so dodelitveni testi, kjer so posamezni osebki dodeljeni določeni lokaliteti. Če so del panmiktične populacije, je dodelitev osebka k lokaliteti, kjer je bil nabran, enako verjetna, kot dodelitev h katerikoli drugi lokaliteti. Čim pa obstaja strukturiranost populacije, je delež osebkov, ki jih pravilno dodeli k lokaliteti, kjer so bili najdeni značilno višji (Manel in sod., 2005).

Analize genetske strukture populacij smo se lotili z Bayesovim pristopom (Markov Chain Monte Carlo algoritem) v programu Structure 2.3.3 (Pritchard in sod., 2000), ki osebke razdeli v skupine na osnovi alelnih frekvenc, tako da čim bolj ustrezajo načelom Hardy-Weinbergovega ravnovesja. Admixture model omogoča tudi mešan izvor osebkov in pri testiranju ne upošteva *a priori* informacij. Za analizo celotnega nabora genotipiziranih (13 lokusov) osebkov iz Slovenije smo uporabili naslednje nastavitve: burnin = 100.000 in ngen = 1.000.000 korakov Markovske verige (MCMC). Število skupin (K) smo nastavili od 1 do 10 in test desetkrat ponovili. Za ostale, manjše nabore podatkov (hierarhični test strukture), smo analizo opravili s krajšimi nastavitvami (50.000 burnin, 200.000 MCMC) in tudi prilagodili število testiranih skupin. Največjo testirano vrednost K smo določili kot število vzorčnih mest + 1. Pravo število skupin (K) smo določili s pomočjo Evannove metode (Evanno in sod., 2005), ki izračuna *ad hoc* statistiko ΔK , ki temelji na razmerju spremembe v logaritmični verjetnosti podatkov med zaporednimi vrednostmi K (enačba 1). Metoda je implementirana v program Structure Harvester Web v0.6.92 (Earl in VonHoldt, 2012).

$$\Delta K = \text{mean} (| L''(K) |) / \text{sd} (L(K)) \quad \dots(1)$$

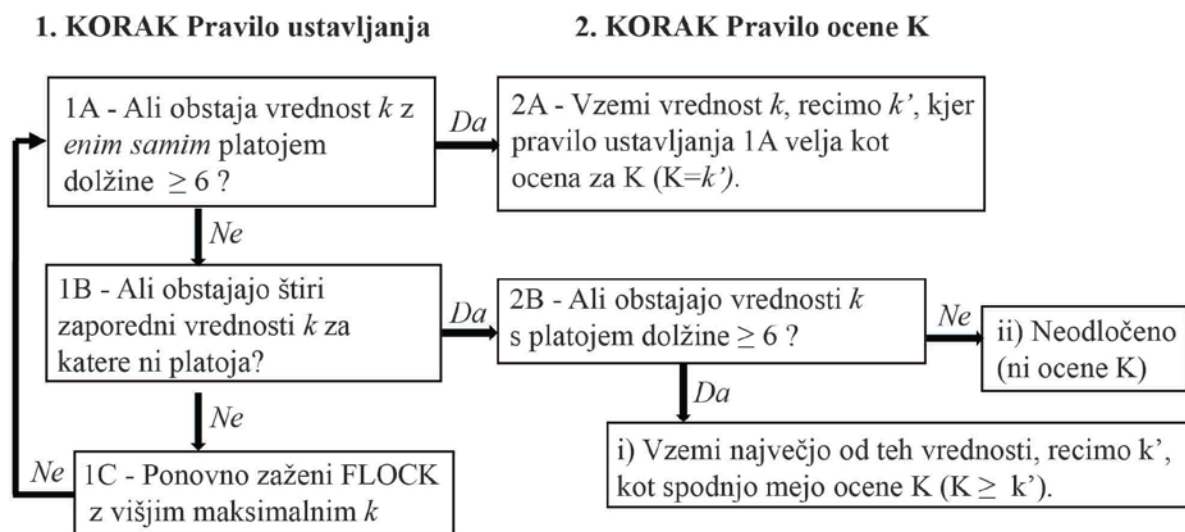
Bayesov pristop, implementiran v program Structure, je občutljiv na odstopanja od Hardy-Weinbergovega ravnovesja, vezavno neravnovesje in sokrvje (Pritchard in sod., 2000; Rodríguez-Ramilo in sod., 2009). Katerikoli od teh faktorjev lahko vpliva na preveliko ocenjeno število populacij (Rodríguez-Ramilo in sod., 2009; Hubisz in sod., 2009). Zaradi tega smo populacijsko strukturo testirali še s programoma Cluster in Flock, ki delujeta na drugačnem principu.

Cluster 1.0 (Rodríguez-Ramilo in sod., 2009) vzame največjo povprečno genetsko razdaljo med izbranim številom skupin kot kriterij za razdelitev in ne temelji na predpostavkah o Hardy-Weinbergovem ravnovesju in vezavnem neravnovesju. Število testiranih skupin se je bilo od dva do deset, odvisno od podatkovnega nabora, ki smo ga testirali. Da bi izbrali optimalno rešitev, smo izračunali največjo spremembo (highest rate of change) v povprečni

genetski razdalji med zaporednimi vrednostmi skupin (ΔK) (enačba 2) (Rodríguez-Ramilo in sod., 2009).

$$\Delta K = |D(K+1) - 2D(K) + D(K-1)| \quad \dots(2)$$

Flock 3.0 (Duchesne in Turgeon, 2012) deluje na osnovi iterativnega premeščanja. Genotipe naključno razdeli v k skupin in za vsako skupino oceni alelne frekvence. Nato vsak genotip premesti v skupino z najvišjo vrednostjo verjetja, po metodi multilokusnega največjega verjetja, ki so jo razvili Petakau in sod (1995). Že v nekaj iteracijah postane premeščanje stabilno in genotipi so razdeljeni v izbrano število skupin k . Ta proces je en tek (run), po katerem Flock izračuna logaritmično razliko verjetja (log likelihood difference, LLOD). Za razdelitev genotipov vodnega oslička smo uporabili priporočene nastavitve: 20 iteracij in 50 tekov za vsak k . Število skupin, ki smo jih testirali, je bilo odvisno od izbranega nabora genotipov. Pravo število skupin (K) smo izbrali glede na vrednosti LLDO, ki v seriji tekov dosežejo plato. Sledili smo diagramu (Slika 5), ki so ga avtorji oblikovali za pomoč pri odločanju.



Slika 5: Diagram odločanja, ki je v pomoč pri oceni pravega števila skupin v analizi s programom FLOCK (Duchesne in Turgeon, 2012)

Figure 5: Decision flowchart used in estimating true number of groups in FLOCK (Duchesne in Turgeon, 2012)

2.5.1 Delež skupnih alelov

Metode, ki združujejo osebkke v skupine (clustering), so uspešne v primerih, kjer se populacije med seboj močno razlikujejo, vendar pogosto zahtevajo eksplicitne predpostavke o demografski zgodovini, ki je včasih ne poznamo. Zato jih je dobro

dopolniti še z drugimi metodami, ki bolj direktno opredelijo razmerja med populacijami (Brdic in sod., 2012). V programskem paketu R adegenet 1.3-6 (Jombart, 2008; Jombart in Ahmed., 2011) smo z uporabo funkcije propShared izračunali delež skupnih alelov. Funkcija izračuna povprečne deleže skupnih alelov med in znotraj populacij preko vseh možnih kombinacij genotipiziranih osebkov. Rezultat je matrika deležev, ki smo jo s funkcijo calliez (Calliez, 1983) implementirano v paketu ade4 (Dray in Dufour, 2007), transformirali v matriko evklidskih razdalj in jo grafično prikazali. Analizirali smo vse vzorce, genotipizirane na 13 lokusih in analizo ponovili le z jamskimi vzorci, genotipiziranimi na 25 lokusih.

2.6 IDENTIFIKACIJA MIGRANTOV PRVE GENERACIJE

Uporabili smo program GeneClass2 (Piry in sod., 2004), ki za vsakega posameznika izračuna verjetnost, ali pripada populaciji, kjer je bil nabran, ali izhaja iz druge populacije. Tako lahko prepoznamo osebkke, ki so verjetni migranti prve generacije (F0).

Za izračun verjetnosti smo izbrali način, ki izračuna količnik med verjetnostjo, da je genotip del populacije, kjer je bil nabran, in najvišjo verjetnostjo, da je del vseh povzorčenih populacij ($L = L_{\text{home}}/L_{\text{max}}$). To statistiko smo lahko uporabili, ker predvidevamo, da smo temeljito povzročili območje raziskave in imamo v analizi vse možne vire migrantov (Petkau in sod., 2004). Računali smo z Bayesovim pristopom (Rannala in Mountain, 1997), alpha 0,05 in 1000 MCMC simulacijami (število simulacij je omejeno z zmogljivostjo računalnika) (Petkau in sod., 2004). Analiza je zajela vse vzorce, genotipizirane na 13 lokusih. Na podlagi te analize smo nabor genotipov razdelili v dva manjša dela.

Nabor genotipov je zajemal površinske in fenotipsko mešane populacije ter podzemeljsko populacijo iz Pivškega rokava Planinske jame, kjer smo nabrali šest pigmentiranih osebkov. Drugi nabor podatkov je zajemal podzemeljske populacije, od katerih je manjkal vzorec iz jame Obrh Čolniči (manjkajoči genotipi pri omenjenem vzorcu, so onemogočili analizo na vseh lokusih), Zelških jam in Logarčka. Za analize na manjšem naboru podatkov smo lahko uporabili 10000 MCMC simulacij. Grafično predstavitev rezultatov smo oblikovali v programu Adobe Illustrator. V analizo smo sicer vključili tudi starejša vzorca, nabrana v Pivki jami in Cerkniskem jezeru, čeprav je malo verjetno, da bi res lahko našli migrante prve generacije, saj se je vmes izmenjalo že več generacij. Ker pa se genetsko ne ločita od svojih sosednjih populacij, smo tako preverili, če bi potencialno lahko prišlo do migracij med njimi. Ker točno vemo, kateri osebek je morebitni migrant, smo naknadno preverili še spol migrantov. Tako lahko ugotovimo, ali pri migraciji prevladuje en spol.

2.7 ANALIZA MITOHONDRIJSKE DNK

Z univerzalnimi začetnimi oligonukleotidi (LCO 1490 in HCO2198) smo pomnožili 653bp dolg fragment mitohondrijskega gena za prvo podenoto citokromske oksidaze I (COI). Volumen reakcije je znašal 15 μ l, za eno reakcijo smo uporabili naslednje volumne reagentov: 11,52 μ l H₂O, 1,5 μ l 10 x pufru PCR z MgCl₂ (Biotools), 1,5 μ l 2 mM dNTP (Fermentas), 0,2 μ l [20 μ M] zacetnega oligonukleotida LCO, 0,2 μ l [20 μ M] začetnega oligonukleotida HCO in 0,084 μ l [5 U/ μ l] Taq - polimeraze (Biotools).

Za verižno reakcijo s polimerazo smo uporabili protokol, opisan v Verovnik in sod. (2004). Za nekatere težavne vzorce pa smo uporabili prilagojen protokol (Macdonald in sod., 2005): začetna denaturacija 95 °C - 4 min, sledilo je 40 ciklov pomnoževanja (94 °C - 1 min, 45 °C - 1 min, 72 °C - 2.5 min) in končna elongacija 72 °C -7 min.

Produkte reakcije smo očistili z encimi (Exonuclease 1 and Alkaline phosphatase, Fermentas), ki smo jih inkubirali 45 min na 37 °C in 15 min na 80 °C. Nukleotidna zaporedja so določili v podjetju Macrogen.

Nukleotidna zaporedja smo uredili v programu Geneious 5.5 (Biomatters) in jih z njegovo pomočjo tudi poravnali. Ker so vsa zaporedja enako dolga, je za poravnavo zadostoval enostaven algoritem (geneious alignment). Poravnavo smo na osnovi nevretenčarskega mitohondrijskega genskega koda prevedli v aminokislinska zaporedja in se tako prepričali, da vmes ni stop-kodonov.

S programom jModeltest 0.1.1 (Posada, 2008) smo na podlagi Akaikevega informacijskega kriterija izbrali optimalni model substitucije. HKY85 (Hasegawa–Kishino–Yano) model substitucije z gama distribucijo in večjim delom nevariabilnih mest je ustrezal naboru nukleotidnih zaporedij mitohondrijskega gena.

Filogenetska drevesa smo izračunali z Bayesovim pristopom v programu MrBayes 3.2 (Ronquist in sod., 2012). Dva neodvisna MCMC algoritma sta bila sestavljena iz štirih verig (vsak z eno hladno in tremi vročimi verigami) in sta vzorčila vsa možna drevesa ter shranila stanje dreves vsakih 100 generacij. Konvergenca je bila dosežena z 2×10^6 generacijami. Prvo četrtino vzorčenih dreves smo zavrgli.

Da bi si lažje predstavljali diverzifikacijo COI haplotipov, smo sestavili haplotipsko mrežo z metodo median-joining (Bandelt in sod., 1999). Mrežo, ki temelji na najbolj varčnih rešitvah (Streiner trees), smo izračunali s programom Network 4.610 (www.fluxus-engineering.com). Parameter, ki ovrednoti homoplazije (ϵ), je bil nastavljen na ničlo, vsa mesta v zaporedju so bila enako obtežena.

Mrežo, kjer so prikazana razmerja med haplotipi v centralno evropski filogeografski skupini, sestavlja 214 haplotipov. Mreža ki zajema vzorce iz porečja kraške Ljubljanice, pa vsebuje 239 haplotipov.

Nukleotidno pestrost (π) in pestrost haplotipov (Hd) (Nei, 1987) smo izračunali v programu DNAsp5.10 (Librado in Rozas, 2009). S programom ARLEQUIN 3.5.1.2 (Excoffier in Lischer, 2010) pa smo izvedli analizo molekularne variance (AMOVA).

2.7.1 Ocena starosti ločitve podzemeljskih in površinskih populacij

Zanimalo nas je, kdaj so se med seboj ločili površinski in podzemeljski vodni oslički. Časovni okvir divergence smo ocenili s koalescenčnim pristopom, implemetiranim v programu BEAST 1.6.2 (Drummond in Rambaut, 2007). Uporabili smo HKY substitucijski model z gama ditribucijo stopnje substitucije in significantnim številom nevariabilnih mest. Stopnja mutabilnosti za COI gen pri sorodnem podzemeljskem izopodnem raku iz rodu *Stenasellus* (Ketmaier in sod., 2003) znaša 0,0125 substitucij na mesto na milijon let. To mero smo uporabili za oceno starosti z uporabo sproščene (relaxed) modela molekulske ure (Drummond in sod., 2006). Izbrali smo konstantno velikost populacije. MCMC verige je sestavljalo 10^6 korakov pod privzetimi nastavitvami. Rezultate smo analizirali v programu Tracer 1.5 (Rambaut in Drummond, 2007), in sicer smo preverili, ali je bila efektivna velikost vzorca (effective sample size) ustrezna.

2.8 ANALIZA NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA JEDRNEGA GENA

Analizirali smo nukleotidno zaporedje jedrnega gena, ki kodira 28S ribosomsko podenoto. Jedrni gen je veliko manj variabilen kot mitohondrijski gen (Verovnik in sod., 2005), z njim pa smo predvsem želeli opredeliti filogenetski položaj romunskih vzorcev in preveriti, ali se ujema s filogenetskim položajem, ki ga razkrije mitohondrijski gen. 28S rRNK jedrni gen smo pomnožili na manjšem številu osebkov iz vzorcev površinskih in podzemeljskih vodnih osličkov, nabranih v Romuniji (Priloga A). Uporabili smo začetne oligonukleotide 28S_lev2 (5'-CAAGTACCGGTGAGGGAAAGTT-3') in 28Sr_test2 (5'-AGGGAAACTTCGGAGGGAACC-3') ter sledeči protokol: začetna denaturacija 94 °C 3 min, 34 ciklov (94 °C 45s, 48 °C 30s, 72 °C 1 min 45s) in končna elongacija 72 °C 3 min. Volumni reagentov in način čiščenja produktov so bili enaki kot pri pomnoževanju mitohondrijskega gena.

Nova zaporedja smo na roke poravnali s poravnavo, uporabljeno v Verovnik in sod. (2005). S programom jModeltest 0.1.1 (Posada, 2008) smo na podlagi Aikake informacijskega kriterija izbrali GTR model substitucije z gama distribucijo in z večjim delom nevariabilnih mest. Filogenetsko drevo smo izračunali na enak način kot filogenetsko drevo mitohondrijskega gena.

2.9 FENOTIPI OSEBKOV V FENOTIPSKO MEŠANIH POPULACIJAH

Pred izolacijo DNK smo iz nabranega materiala izbrali fenotipsko čim bolj različne osebkke. Hramba vavčerskih osebkov je omogočila natančnejši morfološki pregled materiala, za katerega smo se odločili na podlagi rezultatov analize z mikrosateliti.

Po natančnejšem pregledu (opravila ga je sodelavka Simona Prevorčnik) smo razdelili osebkke v več razredov, glede na stopnjo pigmentiranosti telesa in oči ter prisotnost omatidijev. Da bi lahko bolje zajeli variabilnost, smo v analizo vključili še osebkke, ki jih sicer genetsko nismo analizirali. Vključeni fenotipi so zajeli vse oblike, ki so jih opisali Protas in sod. (2011). Ker je določanje barve težavno in odvisno od fiksacije, smo svetlejšše odtenke pigmentacije šteli kot delno ali izrazito reducirano pigmentacijo (Preglednica 9). Različne fenotipe (pigmentiranosti telesa in oči) smo tudi fotografirali. Za poenostavitev smo fenotipe v fenotipsko mešanih populacijah razdelili le v tri glavne razrede: površinske in troglomorfne fenotipe ter fenotipe s prisotnimi redukcijami.

Preglednica 9: Opis fenotipov vodnih osličkov, najdenih v fenotipsko mešanih populacijah

Table 9: Phenotype description of *Asellus aquaticus* individuals found in phenotypically mixed populations

	pigmentacija telesa	pigmentacija oči	omatidiji
površinski	normalna	normalna	prisotni
prisotne redukcije	delno reducirana	normalna	prisotni
	delno reducirana	delno reducirana	prisotni
	izrazito reducirana	normalna	prisotni
	izrazito reducirana	delno reducirana	prisotni
	izrazito reducirana	izrazito reducirana	prisotni
	izrazito reducirana	popolnoma reducirana	prisotni
troglomorfni	popolnoma reducirana	popolnoma reducirana	ostanki
	popolnoma reducirana	popolnoma reducirana	ni

3 REZULTATI

3.1 UPORABNOST NOVIH MIKROSATELITSKIH LOKUSOV

Že v prvih fazah testiranja novih genetskih markerjev smo opazili, da slabše ali sploh ne delujejo pri površinskih osebkih, kar pomeni, da so v robnih zaporedjih prisotne številne razlike. Iz končnega nabora smo izločili lokuse, pri katerih se začetni oligonukleotidi niso specifično vezali (pomnožilo se je več krajših zaporedij) ali pa dolžina pomnoženega fragmenta ni ustrezala predvideni dolžini. Presenetljivo velik pa je bil delež lokusov, ki jih sploh nismo uspeli pomnožiti (37 %). Iz končnega nabora lokusov smo izvzeli še lokuse, pri katerih smo v programu GeneMapper težko določili dolžino fragmenta in genotip.

Preglednica 10: Uspešnost vezave začetnih oligonukleotidov, ki določajo mikrosatelitske lokuse

Table 10: Amplification success of primers that define microsatellite loci

Vezava začetnih oligonukleotidov	Število parov začetnih oligonukleotidov
Neuspešna - ni produkta reakcije	39
Nespecifična - več kot dva fragmenta, neustrezna dolžina, pojavi se v več klonih	33
Ni ustreznega vezavnega mesta začetnega oligonuklotida pri površinskih osebkih	12
Začetni oligonuklotidi se uspešno vežejo pri površinskih in podzemeljskih osebkih	21

Uspelo nam je razviti 25 mikrosatelitskih lokusov (Preglednica 5, Priloga C), ki jih lahko uspešno pomnožimo na vzorcih iz populacije, iz katere izvirajo osebki, ki so služili kot matrica za razvoj genomske knjižnice. Vseh 25 lokusov lahko pomnožimo tudi pri drugih podzemeljskih vodnih osličkih, z izjemo vzorca iz jame Obrh Čolniči, kjer štirih lokusov (A105, A106, C7, A227) nismo uspeli pomnožiti. Pri testiranju je bilo nekaj lokusov monomorfni, kar, zaradi njihove nizke informativnosti, načeloma ni zaželeno. Kljub temu so se kasneje izkazali za uporabne, saj smo v drugih populacijah srečali različne alele.

Lokusa A227 in A229 sestavlja zelo dolg niz dinukleotidnih ponovitev (Priloga C), zaradi česar sta zelo polimorfna in bi potencialno lahko prišla v poštev za analizo sorodstvenih razmerij (določanje starševstva) tudi znotraj ene populacije.

Za skupno analizo vseh vzorcev iz sistema kraške Ljubljani smo sestavili nabor 13 lokusov (A2, A108, A11, A123, A138, C106, C6, A111, A9, A104, A234, A262, A110).

Vseh 25 lokusov smo tudi testirali na vzorcih površinskih in podzemeljskih vodnih osličkov iz Romunije in naredili izbor osmih (A2, A110, A262, A234, A236, C6, A9, A111), ki smo jih lahko uporabili za genotipizacijo večjega števila osebkov. Enak nabor

smo tudi uspešno pomnožili na vzorcih iz Slovenije, kar nam je omogočilo primerjalno analizo dveh ločenih sistemov.

3.2 POPULACIJSKO GENETSKE ANALIZE

3.2.1 Vezavno neravnovesje lokusov

Velika večina lokusov je bila v vezavnem neravnovesju pri vzorcih iz Planinske jame, nabranih na sotočju in v podzemini Unici. Pri drugih vzorcih je bilo v vezavnem neravnovesju največ šest parov lokusov (vzorec iz Najdene jame). Zanimivo je, da lokusa A129 in A129a, ki sta fizično skupaj (isti klon A129), v dveh analiziranih vzorcih nista pokazala znakov vezavnega neravnovesja.

Pri vseh površinskih vzorcih sta bila v vezavnem neravnovesju lokusa A11 in A111, prav tako tudi pri podzemeljskih vzorcih iz Zelških jam in Rakovega rokava. Drugi par lokusov, ki se je pojavi v vezavnem neravnovesju pri večini površinskih in podzemeljskih vzorcih, pa je par A104 in A9. Rezultati analiz so podani v Prilogi D.

V Pivškem rokavu smo našli nekaj pigmentiranih osebkov, v Črni jami pa je genotipizacija z mikrosateliti razkrila, da je vmes pet osebkov, ki izvirajo iz troglomorfne populacije Pivškega rokava. Če so bili ti osebki vključeni v vzorec, kjer so bili nabrani, se je število lokusov v vezavnem neravnovesju povečalo. Ker smo se še z drugimi metodami prepričali, da ti osebki niso del populacije z mesta vzorčenja, kjer smo jih sicer nabrali, smo jih izvzeli iz analize vezavnega neravnovesja.

3.2.2 Genetska pestrost

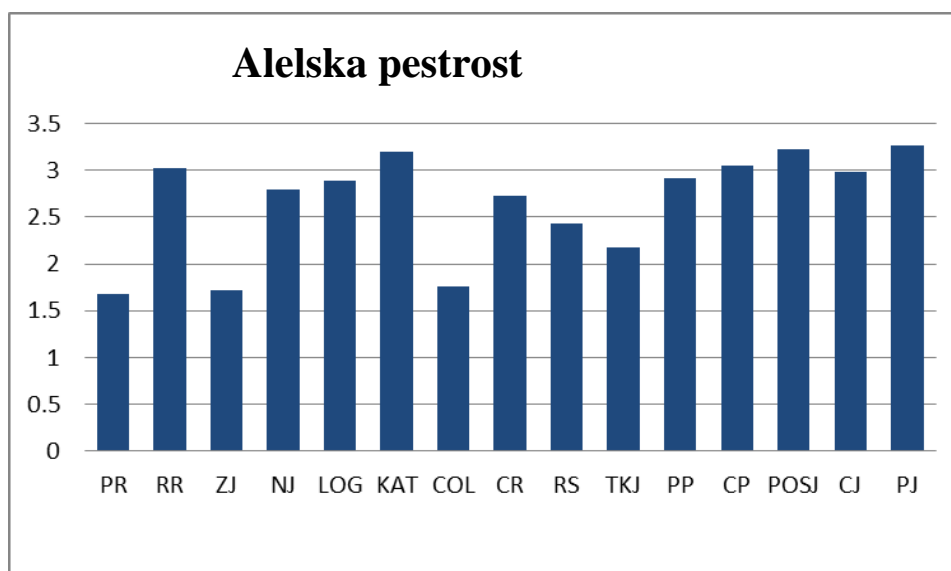
Preglednici v Prilogi D prikazujeta število alelov, opaženo in pričakovano heterozigotnost ter rezultate testa Hardy-Weinbergovega ravnovesja za posamezen lokus. Zaradi boljše preglednosti smo ločili podzemeljske in površinske lokacije.

Večina od 25 mikrosatelitskih lokusov pri podzemeljskih vzorcih je bila v Hardy-Weinbergovem ravnovesju. Sicer je analiza s programom Microchecker opozorila na možnost prisotnosti ničnih alelov, vendar je ta manj verjetna, ker smo osebke genotipizirali brez večjih težav. V nekaj primerih smo večje število manjkajočih podatkov povezali s težavami pri izolaciji DNK (testiranje avtomatizirane izolacije) ali pa s težavami pri kapilarni elektroforezi. Odstopanja od ravnovesja so lahko tudi posledica sokrvja, vpliva selekcije, hibridizacije ali Wahlundovega efekta (Salkoe in Tonen, 2006). Vzorci, nabrani na sotočju in v podzemnem toku Unice v Planinski jami, so močno odstopali od Hardy - Weinbergovega ravnovesja na večini lokusov. Izstopali so tudi po visoki pričakovani heterozigotnosti in številu alelov. Skupaj so se pojavili aleli, ki so drugače značilni le za eno od populacij v Planinski jami. Pri površinskih vzorcih je veliko lokusov odstopalo od Hardy-Weinbergovega ravnovesja, visoka je tudi F_{is} statistika. Zaradi večjega deleža

homozigotov ter več težav pri genotipizaciji v primerjavi s podzemeljskimi vzorci obstaja velika možnost ničnih alelov, na kar je opozorila tudi analiza s programom Microchecker (Priloga D). Aleli, ki smo jih pomnožili, so v večini specifični za površinske vzorce. Razlike smo našli tudi med površinskimi vzorci iz zahodne in vzhodne strani raziskovanega območja. Zaradi tega smo lokuse obdržali v analizi.

Da bi primerjali genetsko pestrost med posameznimi populacijami, smo vzeli povprečno vrednost, izračunano preko 13 lokusov. Najbolj genetsko pestri so bili Postojnski površinski vzorci in fenotipsko mešani vzorci iz začetnih delov podzemne Pivke ($H_e = 0,52$). Ostali površinski vzorci s Planinskega polja in z vzhodnega dela sistema kraške Ljubljanice so imeli za polovico nižjo pričakovano heterozigotnost ($H_e = 0,28$). Vzorci fenotipsko mešanih populacij se po genetski pestrosti niso razlikovali bistveno od bližnje površinske populacije (Sliki 6 in 7, Preglednica 11), prav tako smo pri njih lahko pomnožili enak nabor lokusov (Priloga D).

Če med seboj primerjamo genetsko pestrost podzemeljskih vzorcev (Sliki 6 in 7, Preglednica 11), opazimo kar nekaj razlik. Nizka genetska pestrost je kljub velikemu številu genotipiziranih osebkov značilna za vzorec iz Pivškega rokava Planinske jame ($H_e = 0,1$ in $R = 1,68$; R – alelska pestrost). Sosednji Rakov rokav pa je bil genetsko zelo pester ($H_e = 0,48$ in $R = 3,03$). Veliko število monomorfnih lokusov in nizka genetska pestrost sta bili prisotni še v vzorcih iz Zelških jam in jame Obrh Čolniči. Vzorci severno od Planinskega polja (dolvodno) so imeli višjo genetsko pestrost.



Slika 6: Alelska pestrost vzorcev vodnega oslička iz sistema kraške Ljubljanice. Kratice so podane v Preglednici 1

Figure 6: Allelic richness of *Asellus aquaticus* from Ljubljanica river system. Abbreviations are explained in Table 1

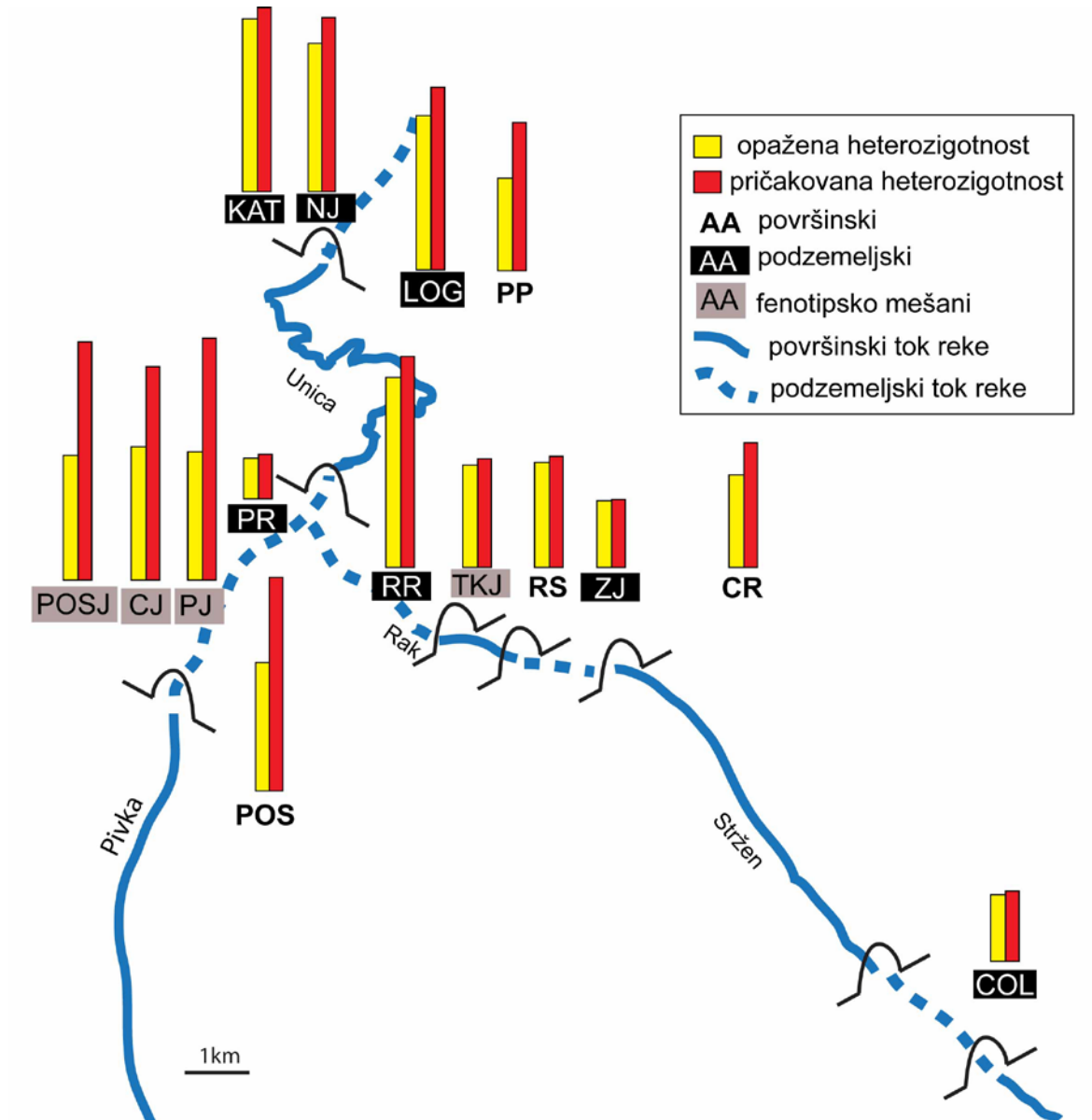
Preglednica 11: Genetska pestrost vodnih osličkov iz sistema kraške Ljubljanice. Povprečje opažene in pričakovane heterozigotnosti, alelska pestrost (glede na najmanjši vzorec – $N = 12$) in F_{is} preko 13 mikrosatelitskih lokusov v posameznih vzorcih so prikazane

Table 11: Genetic diversity of *Asellus aquaticus* from Ljubljanica river system. Observed and expected heterozygosity, allelic richness (smallest sample size = 12) and F_{is} over 13 microsatellite loci are presented

Lokacija	Št. osebkov	H_o	H_e	R	F_{is}
Pivški rokav	78	0,093	0,101	1,68	0,08
Rakov rokav	93	0,434	0,482	3,03	0,09
Zelške jame	34	0,152	0,154	1,72	0,02
Najdena jama	49	0,337	0,397	2,8	0,15
Logarček	13	0,353	0,418	2,89	0,16
Katavotron	12	0,393	0,419	3,2	0,06
Obrh Čolniči	30	0,153	0,161	1,76	0,05
Cerkniško jezero	30	0,211	0,285	2,73	0,27
Rakov Škocjan	30	0,234	0,249	2,43	0,08
Tkalca jama	44	0,24	0,253	2,18	0,06
Planinsko polje	72	0,211	0,339	2,92	0,37
Postojna	24	0,292	0,487	3,05	0,42
Postojnska jama	32	0,285	0,544	3,22	0,47
Črna jama	25	0,304	0,488	2,99	0,39
Pivka jama	31	0,294	0,553	3,27	0,41

H_o – opažena heterozigotnost, H_e – pričakovana heterozigotnost, R – alelska pestrost

Primerjava površinskih in podzemeljskih vzorcev iz sistema kraške Ljubljanice je pokazala, da so podzemeljski vzorci iz Pivškega rokava, Zelških jam in jame Obrh Čolniči genetsko manj pestri kot površinski vodni oslički (Preglednica 11, Sliki 6 in 7). Če omenjene jamske populacije primerjamo s površinskimi, ki naseljujejo kraška polja v vzhodnem delu, je pestrost manjša za polovico. Če pa za primerjavo vzamemo površinsko populacijo iz Postojne, pa je razlika še veliko večja. Podzemeljski oslički iz Rakovega rokava so genetsko tako pestri kot površinski in fenotipsko mešani vzorci iz Postojnskega dela. Pričakovana heterozigotnost je še enkrat višja kot pri sosednjih površinskih vodnih osličkih iz Rakovega Škocjana. Situacija je podobna pri vzorcih iz Najdene jame, Logarčka in Katavotona.



Slika 7: Grafično prikazani povprečni opažene (H_o) in pričakovane heterozigotnosti (H_e) v vzorcih vodnega oslička s področja kraške Ljubljane, izračunane preko 13 mikrosatelitskih lokusov. Kratice so podane v Preglednici 1

Figure 7: Graphic representation of average observed and expected heterozygosity (H_o in H_e) in *Asellus aquaticus* from Ljubljana river system over 13 microsatellite loci. Abbreviations are explained in Table 1

Vzorci iz Romunije smo genotipizirali na manjšem naboru lokusov, zaradi poenostavitve pa smo za primerjavo iz Slovenije vzeli le par sosednjih površinskih in podzemeljskih populacij, ki so bili že morfološko primerjalno analizirani (Turk in sod., 1996): površinski s Planinskega polja in podzemeljski iz Pivškega rokava Planinske jame (v to analizo smo vključili tudi osebkke, ki prav tako spadajo v to populacijo, a so bili nabrani na sotočju ter v Črni jami). Genetska pestrost romunskih vzorcev je bila veliko večja, tako površinskih ($H_e = 0,69$, $R = 6,3$) kot podzemeljskih ($H_e = 0,39$, $R = 3,15$). Če pogledamo le romunski par, vidimo, da je pestrost nižja pri jamskih, enak vzorec opazimo tudi pri slovenskem paru. Pričakovana heterozigotnost romunskih površinskih vodnih osličkov je bila tudi večja od pričakovane heterozigotnosti površinskih vodnih osličkov iz Postojne, ki sicer taksonomsko pripadajo isti podvrsti (*A. a. aquaticus*).

Preglednica 12: Genetska pestrost površinskih in podzemeljskih vodnih osličkov v Romuniji in Sloveniji (Pivški rokav in Planinsko polje) na osmih mikrosatelitih

Table 12: Genetic diversity of surface and subterranean *Asellus aquaticus* from Romania and Slovenia (Pivka channel and Planina polje) over eighth microsatellite loci

	N	He	Ho	R
Romunija				
podzemeljski	82	0,34	0,19	3,15
površinski	52	0,69	0,34	6,3
Slovenija				
podzemeljski	120	0,053	0,052	1,99
površinski	70	0,25	0,15	2,88

N – število analiziranih osebkov, H_e – pričakovana heterozigotnost,
 H_o – opažena heterozigotnost, R - alelska pestrost (na osnovi najmanjšega vzorca, $N = 45$)

3.2.3 Garza-Williamsonov index in pojav ozkega grla

Garza-Williamsonov indeks je bil najvišji v podzemeljski populaciji iz jame Obrh Čolniči. Kljub temu sta tu prisotna dva lokusa, ki imata zelo nizek indeks ($A_{129} = 0,33$ in $C_6 = 0,38$, Priloga D). Sledi ji populacija iz Rakovega rokava, nato pa vzorci iz jam severno od Planinskega polja. Na rezultate vzorcev iz Logarčka in Katavotrona bi lahko vplivala majhna velikost vzorca (Garza in Williamson, 2001). Presenetljivo je bil indeks precej visok v populacij iz Zelških jam. Med vsemi vzorci je bil najnižji v populaciji iz Pivškega rokava Planinske jame. Simulacije so pokazale, da naj bi bila vrednost indeksa pri populacijah, ki so bile podvržene pojavu ozkega grla, nižja od 0,82 (Garza in Williamson, 2001).

Indeksi, ki smo jih izračunali za površinske in fenotipsko mešane vzorce, so zelo nizki, kar bi bila lahko tudi posledica ničnih alelov.

Analiza pojava ozkega grla v podzemeljskih populacijah s programom Bottleneck je ozko grlo identificirala le v populaciji iz Pivškega rokava Planinske jame.

Preglednica 13: Povprečje G-W indeksa preko sedmih lokusov, ki sledijo modelu SMM v vseh populacijah. V podzemeljskih populacijah je G-W indeks izračunan tudi preko 17 lokusov, ki sledijo mutacijskemu modelu SMM

Table 13: Average G-W index over seven microsatellite loci that follow stepwise mutation model in all analyzed populations. In subterranean populations G-W index is also calculated over 17 loci

Vzorec	G-W (7 lokusov)	G-W (17 lokusov)
Pivški rokav	0,47	0,66
Rakov rokav	0,86	0,81
Zelške jame	0,70	0,82
Logarček	0,78	0,70
Katavotron	0,74	0,67
Najdena jama	0,80	0,76
jama Obrh Čolniči	0,91	0,90
Planinsko polje	0,58	/
Rakov Škocjan	0,64	/
Cerkniško jezero	0,63	/
Tkalca jama	0,50	/
Postojna	0,60	/
Postojnska jama	0,59	/
Črna jama	0,57	/
Pivka jama	0,59	/

3.3 POPULACIJSKA STRUKTURA

3.3.1 Testiranje z dodelitvenimi testi

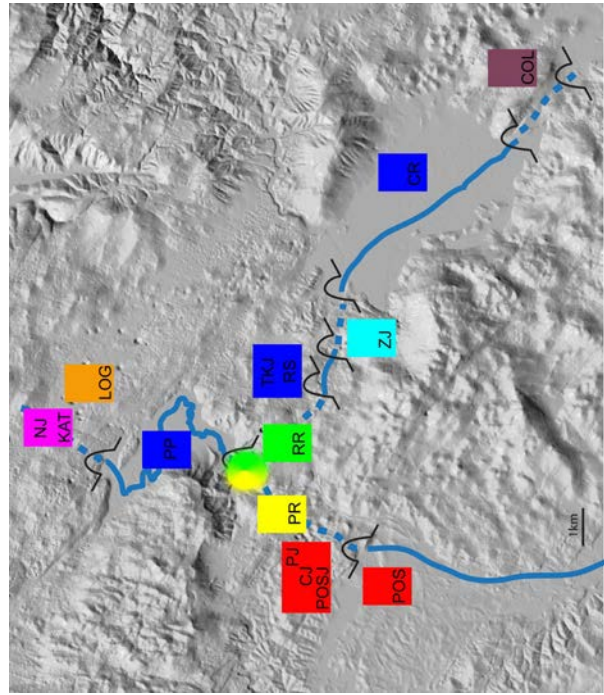
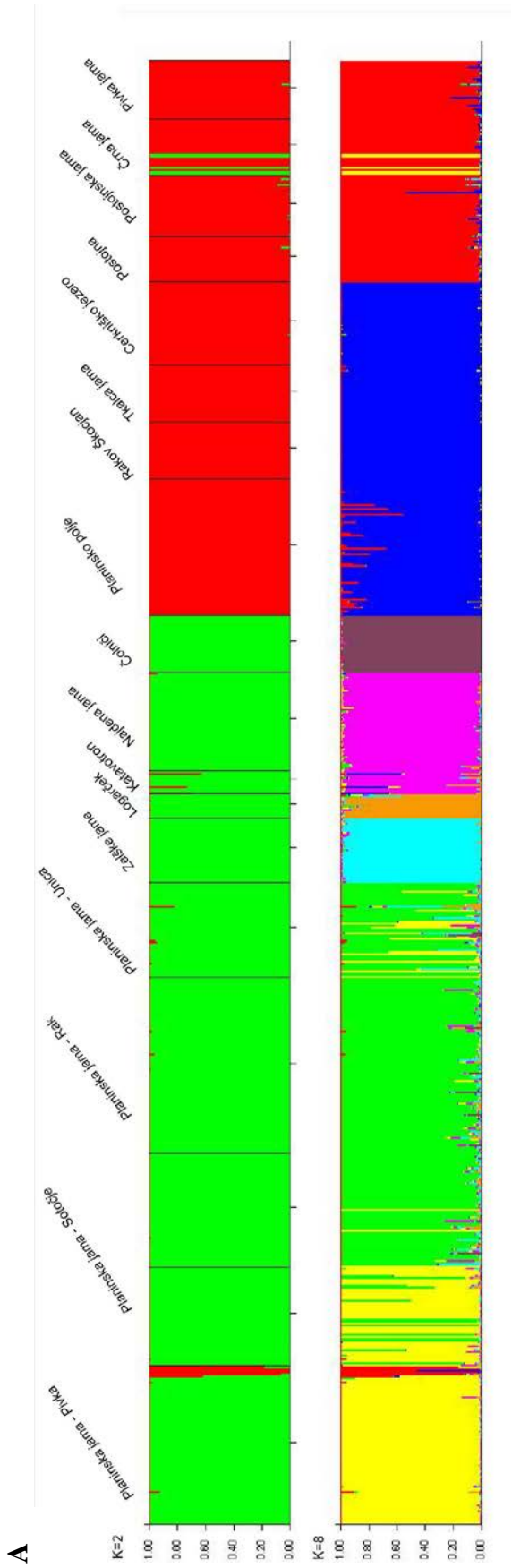
Analiza populacijske strukture genotipiziranih osebkov iz porečja kraške Ljubljanice (773 osebkov) z Bayesovim pristopom v programu Structure je z največjo verjetnostjo razdelila vzorce na dva dela: eno skupino sestavljajo vsi podzemeljski (troglomorfn) vzorci, drugo pa površinski in fenotipsko mešani vzorci iz začetnih delov ponikalnic (Slika 8). Analizo smo ponovili tudi na manjšem naboru podatkov, iz katerega smo izločili vse osebkove, pri katerih so manjkali podatki na treh ali več lokusih, in dobili enak rezultat. Rezultat smo potrdili tudi s programom Cluster, torej je genetska razdalja največja med tema dvema skupinama.

Rezultat analize je tudi jasno pokazal, da fenotipsko mešane populacije niso hibridi, temveč je med njimi in površinskimi populacijami prisoten genski pretok. Druga razdelitev, ki je imela po Evannovi metodi visoko statistiko ΔK , je 3. V tem primeru so se na dva dela razdelili jamski vzorci, a ne vedno enako. Pri višjem številu testiranih skupin so bili manjši vzorci (Logarček, Zelške jame in Čolniči) dodeljeni pri več ponovitvah analize v različne skupine. Pritchard in sod. (2000) menijo, da v kompleksnem naboru podatkov višje število MCMC korakov ne pomaga, temveč se je problema bolje lotiti po kosih, s t.i. hierarhično analizo (Rosenberg in sod., 2001; Vähä in sod., 2007; Palandačić in sod., 2012). Da je struktura bolj kompleksna kot le razdelitev na podzemeljsko in površinsko skupino, nakazuje tudi rezultat analize s programom Flock, ki je že na popolnem naboru genotipiziranih osebkov določila spodnjo mejo ocene skupin $K \geq 5$ (Preglednica 14). Vrednost K je 8, ki ima visoko vrednost ΔK , pri analizi s programom Structure ustreza genetski strukturiranosti, kot jo zaznamo s hierarhično analizo. Kompleksna populacijska struktura, ki jo zasledimo v podzemeljskih vzorcih, se tudi ujema z geografsko razdrobljenim podzemnim habitatom (Slika 8).

Preglednica 14: Število ločenih skupin populacij, določenih s tremi različni pristopi in z različnimi nabori podatkov

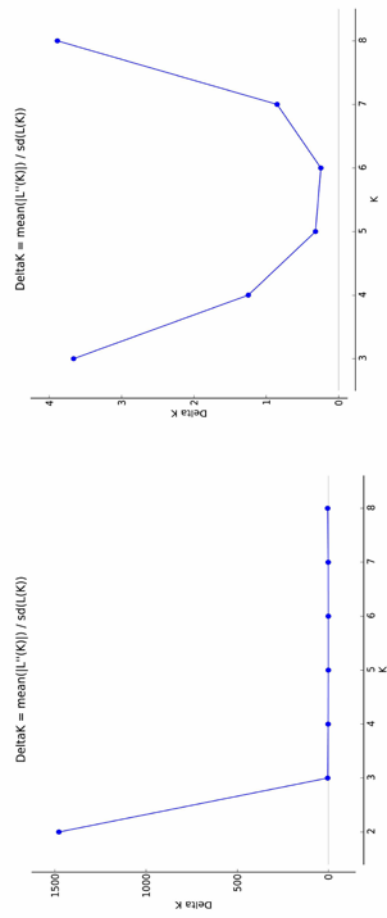
Table 14: Number of separate clusters of populations according to three different algorithms and different datasets

Testirana populacijska struktura	Št. lokusov	Število skupin		
		Structure	FLOCK	Cluster
Vsi vzorci	13	2 in 3 in 8	≥ 5	2
Postojna, Planinsko polje, Pivški rokav, Rakov rokav, Čolniči	13	5	5	5
Postojna, Postojnska jama, Črna jama, Pivka jama, Pivški rokav, Rakov rokav, Rakov Škocjan, Tkalca jama, Planinsko polje	13	2 in 4	/	/
POVRŠINSKI				
Vsi površinski in fenotipsko mešani	13	2	2	/
Rakov Škocjan, Tkalca jama	16	1	1	/
Postojna, Postojnska jama, Črna jama, Pivka jama	13	1	1	
JAMSKI				
Vsi jamski	25	2	≥ 5	/
Pivški rokav, Rakov rokav, Čolniči, Zelške jame, Najdena jama	16 in 25	/	5	/
Pivški rokav, Rakov rokav, Čolniči, Zelške jame, Najdena jama, Logarček	25	4	≥ 5	3
Planinska jama (Pivški rokav, Rakov rokav, Sotočje, Unica)	25	2	2	/
Rakov rokav, Zelške jame	25	2	2	/
Pivški rokav, Najdena jama	25	2	2	/
Najdena jama, Logarček	25	2	2	/



C

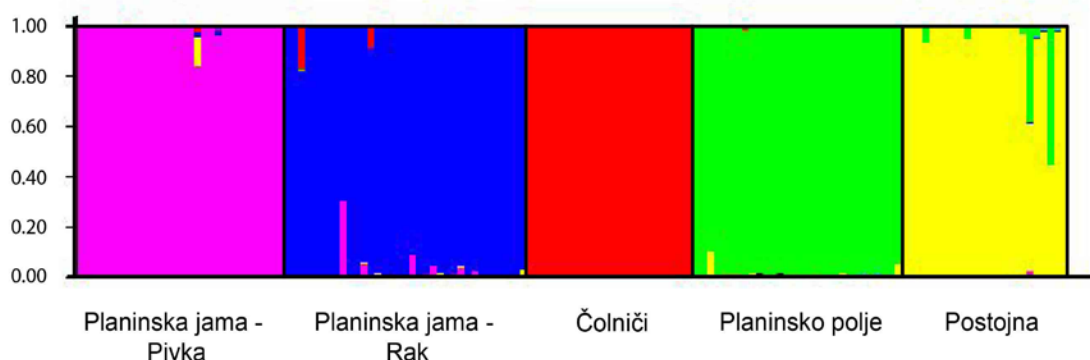
B



Slika 8: Rezultati dodelitvenega testa s Structure, v katerega smo zajeli vse vzorce vodnega oslička iz sistema kraške Ljubljaničnice (A). Analiza zajema 13 mikrosatelitskih lokusov. Vsak stolpec predstavlja en osebek in oceno koeficienta pripadnosti določeni skupini. Z Evannovo metodo smo določili število skupin (B). Analiza vodne osličke razdeli na podzemeljske in površinske ($K = 2$). Če izzvzamemo možnost, da ni strukture (K med 2 in 9), in poiščemo pravo število z Evannovo metodo, izbere tudi razdelitev na 8 skupin. Ta se ujema z hierarhično analizo populacijske strukture (Preglednica 14). Genetska strukturiranost v osem skupin je prikazana na zemljevidu (C)

Figure 8: Assignment scores (Structure) of all samples of *Asellus aquaticus* from Ljubljaničnica river system (A) over 13 loci. Each bar represents one individual. Using Evanno method (B) we estimated the number of clusters. Samples are divided to subterranean and surface ($K = 2$). If we estimate the number of clusters with K ranging from 2 to 9, the result is also 8. That corresponds to hierarchical analysis of population structure (Table 14). Genetic structuring in eight groups is shown on the map of the sampling locations (C)

Sestavili smo tudi poenostavljen nabor genotipov, ki je vključeval po 30 osebkov podzemeljskih vodnih osličkov iz Pivškega rokava, Rakovega rokava in jame Obrh Čolniči ter površinskih vodnih osličkov iz Postojne in Rakovega Škocjana. V tem primeru so vse tri metode nedvoumno prepoznale pet jasno ločenih skupin – populacij (Slika 9).

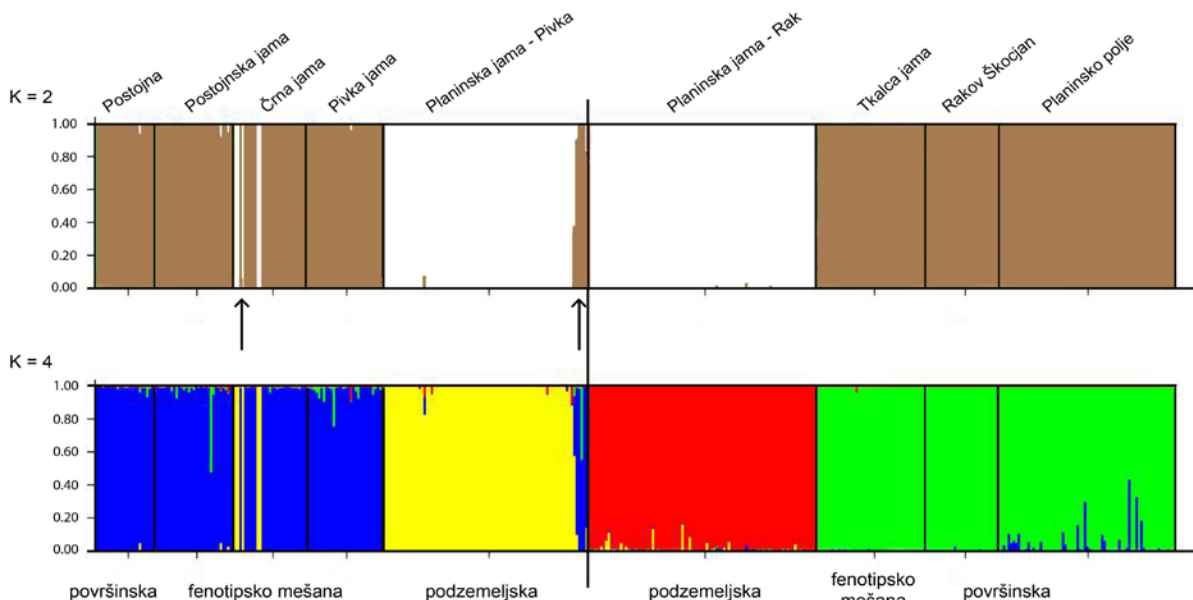


Slika 9: Dodelitveni test (Structure) petih vzorcev vodnega oslička, treh podzemeljskih in dveh površinskih. Analiza zajema 13 mikrosatelitskih lokusov. Vsak stolpec predstavlja en osebek in njegovo oceno koeficienta pripadnosti določeni skupini. Analizirali smo manjše število vzorcev s približno enaki številom genotipiziranih osebkov

Figure 9: Assignment scores (Structure) of five samples of *Asellus aquaticus*, three are from subterranean and two from surface habitat. 13 loci are included in the analysis. Each bar represents one individual. A smaller number of samples with roughly the same number of genotyped individuals were included in the analysis

Še enkrat smo preverili status fenotipsko mešanih populacij in v analizo vzeli le sosednji podzemeljski populaciji. Analiza s programom Structure je najprej jasno ločila podzemeljske populacije od površinskih skupaj s fenotipsko mešanimi (Slika 10). Druga vrednost K je bila 4, kjer sta se med seboj jasno ločili obe podzemeljski populaciji (Pivški in Rakov rokav), kot tudi sosednji površinski populaciji skupaj s fenotipsko mešanimi (Slika 10). Nadaljnja analiza je zajela le površinske in fenotipsko mešane vzorce. Razdelili so se na dva dela, vendar ne po fenotipu, temveč po geografiji (vzhodni in zahodni del

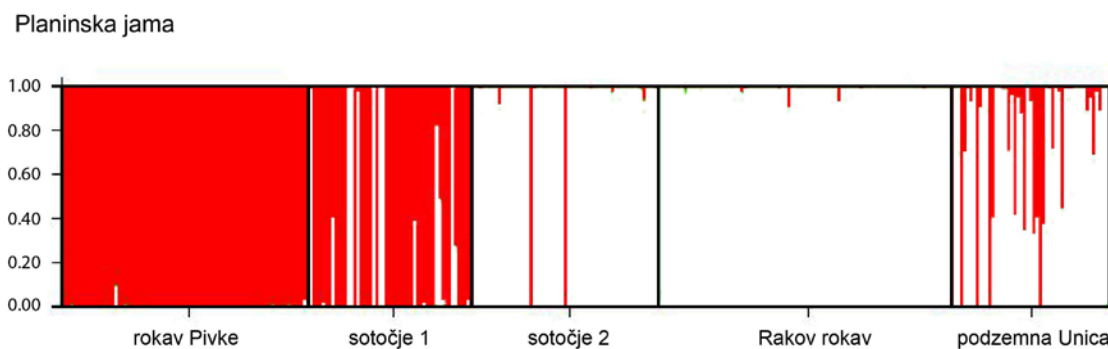
PPJS). Ta delitev površinskih populacij ustreza tudi njihovem taksonomskemu statusu ločenih podvrst (*A. a. aquaticus* in *A. a. carniolicus*). Ločeno smo testirali še skrito genetsko strukturo znotraj podvrst, vendar je nismo našli (Preglednica 14). Do sprememb v fenotipu, ki se kažejo v fenotipsko mešanih populacijah v začetnih delih rek ponikalnic, prihaja v dveh ločenih sistemih.



Slika 10: Dodelitveni test (Structure) vzorcev iz sosednjih si površinskih, fenotipsko mešanih in podzemeljskih populacij vodnega oslička. Analiza zajema 13 mikrosatelitskih lokusov. Vsak stolpec predstavlja en osebek in oceno koeficienta pripadnosti določeni skupini. Puščice označujejo osebkke, ki so priseljenci

Figure 10: Assignment scores (Structure) of samples from adjacent surface, phenotypically mixed and subterranean populations. 13 loci are included in the analysis. Each bar represents one individual. Arrows point to the individuals that are immigrants

Populacijsko strukturo podzemeljskih vzorcev smo testirali z večjim naborom lokusov. Analiza populacijske diferenciacije znotraj Planinske jame je razkrila, da se populaciji iz Pivškega in Rakovega rokava med seboj jasno ločita, kar se sklada tudi z morfologijo. Na sotočju je od 104 analiziranih osebkov le šest takih, ki bi lahko bili potencialni hibridi. Več jih je nižje v toku podzemne Unice, a kljub temu je bila večina osebkov dodeljena k eni od populacij z več kot 90%. Da sotočja ne naseljuje le ena populacija, temveč da smo v skupni vzorec s sotočja zajeli več ločenih populacij (Wahlundov efekt), pa nakazujejo tudi večinski del lokusov v vezavnem neravnovesju in močna odstopanja od Hardy-Weinbergovega ravnovesja (priloga D). Odstopanja pri vzorcu iz Unice so lahko posledica prisotnosti večjega števila hibridov v vzorcu. Tako imamo v Planinski jami opravka z dvema jasno ločenima populacijama podzemeljskih vodnih osličkov in morebitno hibridno cono (Slika 11).



Slika 11: Dodelitveni test vzorcev podzemeljskih vodnih osličkov iz Planinske jame (25 lokusov, $K = 2$). Vsak stolpec predstavlja en osebek in oceno koeficienta pripadnosti določeni skupini. Lokalitete vzorcev so označene na Sliki 1 (sotočje kot ena lokaliteta)

Figure 11: Assignment scores of individuals from subterranean *Asellus aquaticus* in Planina cave (25 loci, $K = 2$). Each bar represents one individual. Sampling localities are shown in Figure 1

Celotni nabor troglomorfnih podzemeljskih vzorcev smo analizirali na 25 lokusih. Rezultat analize s programom Structure sta bili dve skupini: 1) Pivški rokav in vzorci severno od Planinskega polja, 2) Rakov rokav, Zelške jame in Čolniči. Determinističen algoritem implementiran v Flock pa je razkril prisotnost vsaj 5 skupin (Preglednica 14).

Iz nadaljnjih analiz smo izvzeli vzorca s sotočja in Unice iz Planinske jame, z namenom da zmanjšamo nabor podatkov. Genetsko strukturo smo tudi testirali na različnem naboru lokusov (Preglednica 14). Analiza s program Structure jih je razdelila v štiri skupine: 1) Pivški rokav, 2) Rakov rokav in Zelške jame, 3) Najdena jama in Logarček, 4) Čolniči. Na enakem podatkovnem naboru je rezultat analize v programu Flock pet skupin, posebej je vzorec iz Zelških jam. S programom Cluster pa smo podzemeljske vzorce na osnovi genetskih razdalj razdelili v tri skupine: 1) Pivški rokav in populacije severno od Planinskega polja, 2) Rakov rokav in Zelške jame, 3) Čolniči.

Vzorec iz Logarčka je majhen ($N = 13$), kar zna biti težavno pri umestitvi v skupine (Fogelqvist in sod., 2010). Vzorec je bil nabran v majhni kotanji z ujetjo vodo in lahko predstavlja potomce enega para staršev. Tudi pri $K = 2$ ga algoritem implementiran v program Structure ne dodeli popolnoma k eni ali drugi skupini. Pri velikem naboru podatkov je bil tudi problematičen vzorec iz jame Obrh Čolniči, ki je manjši v primerjavi z ostalimi. Ko smo hierarhično testirali še strukturo parov populacij (Rakov rokav in Zelške jame, Pivški rokav in Najdena jama, Najdena jama in Logarček), so se med seboj ločile (Preglednica 14). Populacijsko strukturo, kakršno smo določili s hierarhičnim pristopom, smo zasledili tudi pri analizi celotnega števila genotipiziranih osebkov (Slika 8).

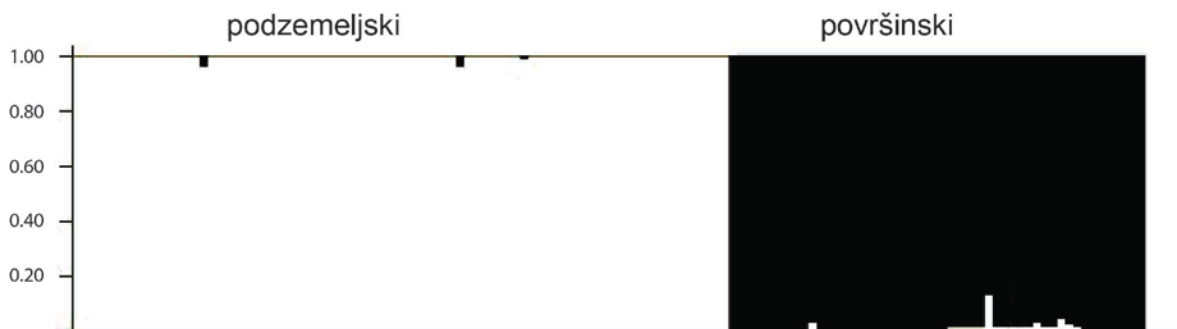
Vzorec iz Katavotrona je del iste populacije kot osebki iz Najdene jame, smo pa pri dveh osebkih našli površinske alele. Šest osebkov, ki smo jih nabrali na vhodu v jamo Škratovko, spada v populacijo Rakovega rokava.

3.3.2 Vzorci, nabrani v različnih časovnih obdobjih

Vzorec iz Rakovega rokava so sestavljali osebkki, ki so bili nabrani v razmaku 10 let, a med seboj niso genetsko diferencirani ($K = 1$). Prav tako so 10 let starejši vzorci iz Pivške jame in Cerkniškega jezera združeni s sveže nabranimi vzorci iz teh lokacij ($K = 1$). Ohranjena je enaka genetska pestrost, ni porušeno vezavno ravnovesje in ni večje razlike v statistiki F_{st} .

3.3.3 Romunski podzemeljski in površinski vodni oslički

Populacijsko strukturo smo testirali tudi na vzorcih iz Romunije. Na podlagi informacij z osmih mikrosatelitskih lokusov smo jih tako s programom Structure, kot tudi s programoma Flock in Cluster, razdelili na dve skupini. Skupini popolnoma odgovarjata habitat in fenotipu osebkov, torej se med seboj jasno ločita podzemeljska in površinska populacija. Z Bayesovim pristopom osebke Structure, z izjemo enega ($q = 0,88$; q je ocena koeficienta pripadnosti skupini), dodeli k eni ali drugi skupini z vrednostjo q preko 0,9. To pomeni, da med njimi ne prihaja do križanja (Beaumont in sod., 2001; Vähä in Primmer, 2006).



Slika 12: Rezultat dodelitvenega testa s Structure vodnih osličkov iz Romunije, kjer se razdelitev v dve skupini popolnoma ujema s habitatom osebkov, kot njihovim fenotipom. Vsak stolpec predstavlja en osebek in oceno koeficienta pripadnosti določeni skupini. V analizo je zajetih 8 lokusov

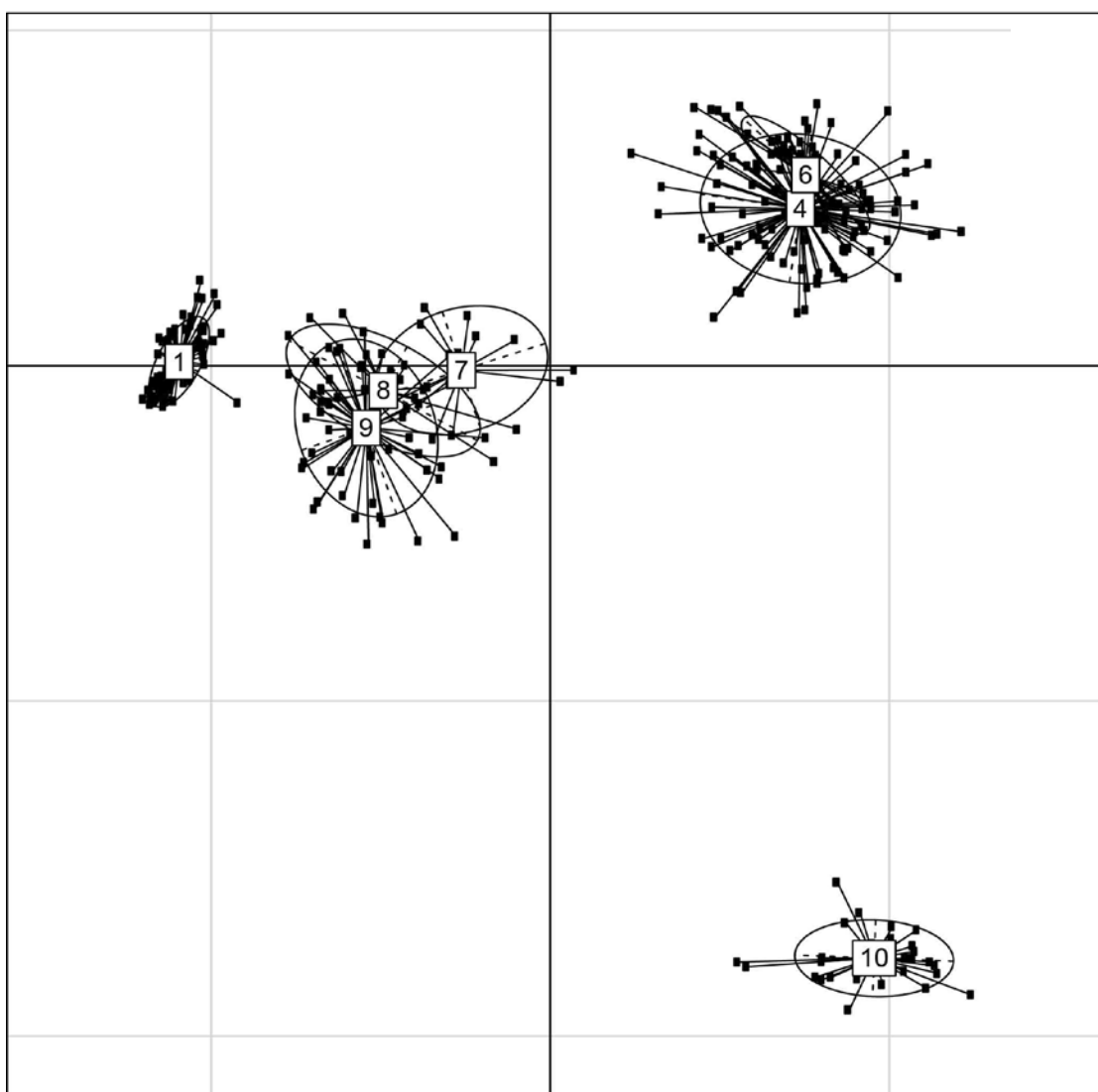
Figure 12: Assignment scores (Structure) of *Asellus aquaticus* from Romania. Two clusters correspond to the habitat and phenotype of sampled individuals. 8 loci are included in the analysis. Each bar represents one individual

3.3.4 Delež skupnih alelov

Populacijo podzemeljskih vodnih osličkov iz Zelških jam od populacije iz podzemnega Raka ločuje površinsko okolje Rakovega Škocjana. Tega naseljujejo površinski osebkki, ki celo naseljujejo začetni del podzemlja v Tkalci jami. Morfološki pregled osebkov iz Zelških je pokazal, da imajo značilnosti osebkov iz Rakovega rokava (pregledala S. Prevorčnik). Analiza deleža skupnih alelov je pokazala, da imajo tudi skupne alele, saj je vzorec iz Zelških jam vgnuzen med Rakove vodne osličke (Slika 13). Se pa populaciji močno razlikujeta v genetski pestrosti in frekvencah alelov, zaradi česar se pokaže

genetska strukturiranost (Slika 8, Preglednica 14). Cluster jih po genetski razdalji ne razdeli (Preglednica 14). Vidimo lahko, da se po deležu skupnih alelov jasno loči populacija iz jame Obrh Čolniči, ki ima tudi kar nekaj svojih alelov in spremenjena robna zaporedja na štirih lokusih. Med seboj sta jasno ločena tudi oba vzorca iz obeh rečnih rokavov Planinske jame. Vzorci severno od Planinskega polja so bližje vzorcem iz Pivškega rokava, a vseeno tvorijo svojo skupino.

Vzorci s sotočja in iz podzemne Unice v Planinski jami imajo deleže skupnih alelov porazdeljene med populaciji iz obeh rečnih rokavov. Od podzemeljskih so jasno ločeni osebki iz površinskih in fenotipsko mešanih populacij (Priloga F).



Slika 13: Delež skupnih alelov (25 lokusov) med vzorci podzemeljskih vodnih osličkov, prikazan z evklidskimi razdaljami. Elipse označujejo 95% interval zaupanja za posamezno populacijo. 1 – Pivški rokav, 4 - Rakov rokav, 6 - Zelške jame, 7 – Logarček, 8 – Katavotron, 9 – Najdena jama, 10 – jama Obrh Čolniči

Figure 13: Proportion of shared alleles (25 loci) between the studied subterranean populations shown as Euclidian distances. Ellipses represent 95% confidence intervals for each population

3.3.5 Statistika Fst

Statistično neznačilno je bil genetsko diferenciaran par podzemeljskih vzorcev iz Rakovega rokava in sotočja 2, kjer se končuje Rakov rokav (Preglednica 15). Analiza s programom Structure je pokazala, da je večina osebkov res del populacije iz Rakovega rokava. Drugi par, ki se med seboj statistično ni razlikoval, je Črna jama in Pivka jama (Preglednica 16). Ta rezultat je še posebej zanimiv, če upoštevamo dejstvo, da sta bila vzorca nabrana v razkoraku 10 let in sta fenotipsko mešana. Prav tu, zaradi različnega časovnega okvira, v katerem sta bila nabrana in hitre evolucije troglomorfni značilnosti, bi razliko pričakovali.

Preglednica 15: Fst vrednosti parov vzorcev podzemeljskih vodnih osličkov iz Planinske jame

Table 15: Pairwise Fst from samples collected in Planina cave

	PR	SOT1	SOT2	RR	PUN
PR					
SOT1	0,08				
SOT2	0,58	0,36			
RR	0,57	0,38	0*		
PUN	0,48	0,25	0,03	0,04	

* ni statistično značilno ($P > 0,05$), test z 10.000 permutacijami

Kljub temu, da so vsi posamezni vzorci med seboj genetsko diferencirani, pa so bile razlike med vrednostmi Fst zelo velike. Fst med vzorci znotraj posameznih skupin, kot smo jih določili z dodelitvenimi testi, ne presegajo vrednosti 0,2. Na primer, vzorci iz Pivškega rokava v primerjavi s sosednjimi površinskimi dosežejo vrednost višjo od 0,7. Ker na vrednost Fst vpliva pestrost alelov, so vrednosti pri parih v katerih je vključena genetsko manj pestra populacija višje, kot pri parih genetsko bolj pestrih populacij (Meirmans in Hedrick, 2011). Visoke vrednosti pomenijo, da so v primerjanih populacijah fiksirani različni aleli, vendar genetski markerji, kot so mikrosateliti, praktično ne morejo doseči vrednosti 1 (Balloux in Lugon-Moulin, 2002).

Preglednica 16: Fst vrednosti parov vzorcev vodnega oslička v sistemu kraške Ljubljanice

Table 16: Pairwise Fst from samples collected in the Ljubljanica river system

	PR	RR	ZJ	LOG	NJ	COL	PP	RS	CRJ	TKJ	POSJ	POSJ	CJ
PR													
RR	0,57												
ZJ	0,83	0,35											
LOG	0,59	0,31	0,54										
NJ	0,36	0,32	0,52	0,16									
COL	0,87	0,52	0,80	0,71	0,64								
PP	0,78	0,52	0,70	0,62	0,61	0,70							
RS	0,86	0,51	0,76	0,66	0,63	0,79	0,10						
CRJ	0,85	0,51	0,75	0,65	0,62	0,76	0,13	0,04					
TKJ	0,84	0,52	0,75	0,66	0,63	0,77	0,11	0,02	0,09				
POS	0,78	0,42	0,63	0,48	0,51	0,66	0,39	0,47	0,46	0,46			
POSJ	0,76	0,42	0,60	0,45	0,50	0,64	0,32	0,37	0,38	0,36	0,05		
CJ	0,78	0,44	0,64	0,50	0,54	0,66	0,37	0,43	0,42	0,42	0,12	0,07	
PJ	0,77	0,42	0,61	0,48	0,52	0,65	0,20	0,36	0,35	0,35	0,11	0,06	0,02*

* ni statistično značilno ($P > 0,05$), test z 10.000 permutacijami

3.4 MIGRANTI PRVE GENERACIJE

Pri analizi s celotnim naborom genotipiziranih vodnih osličkov smo ugotovili, da na treh podzemeljski lokacijah ni priseljencev prve generacije, niti nismo našli migrantov, ki bi izvirali s teh podzemeljskih lokacij na katerikoli drugi vzorčni točki. Te lokacije so: jama Obrh Čolnici, Zelške jame in Logarček.

Analiza površinskih in fenotipsko mešanih populacij z dodano populacijo iz Pivškega rokava, je potrdila rezultate dodelitvenih testov (Sliki 8 in 10). Torej so pigmentirani osebki, nabrani v Pivškem rokavu Planinske jame priseljenci prve generacije (Slika 14) iz gorvodne fenotipsko mešane populacije. Pet jih izhaja iz površinske in fenotipsko mešane populacije podzemne Pivke, torej so pripotovali v smeri vodnega toka. Analiza izvor enega osebka pripiše Planinskemu polju, kar pomeni, da bi moral potovati v nasprotni smeri od vodnega toka. Morfološki pregled teh osebkov je izvor vseh šestih postavil v Postojnsko regijo, vsi osebki imajo namreč na petem pleopodu majhno areo, ki je značilna za podvrsto *A. a. aquaticus* (določila S. Prevorčnik). Rezultat analize, ki postavlja izvor enega osebka na Planinsko polje, je tako vprašljiv. Pet osebkov nabranih v Črni jami, ki imajo izražene troglomorfne lastnosti in genetsko pripadajo podzemeljski populaciji (Slika 10), se je priselilo v Črno jamo iz matične populacije v Pivškem rokavu. Pomikati so se morali proti vodnemu toku. Dokazana je tudi migracija površinskih osebkov iz Postojnske jame preko podzemnega toka Pivke na Planinsko polje (Slika 14).

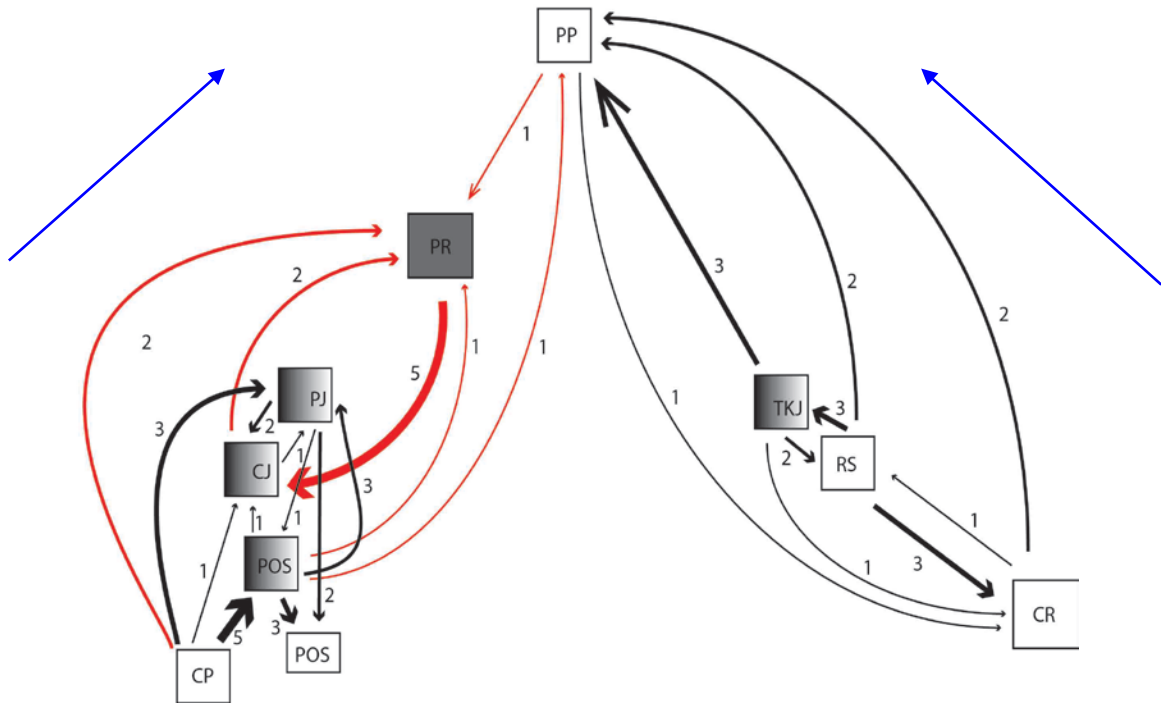
Največ je migracij znotraj populacij, rezultati pa tudi jasno pokažejo, da osebki s površja prihajajo v jame in obratno. V severovzhodnem delu sistema kraške Ljubljanice so migracije prisotne med vsemi vzorčnimi točkami, ki so med seboj precej oddaljene in povezane le s podzemeljskimi vodami. Migracije naj bi celo potekale v obe smeri, z in proti vodnemu toku.

Analiza nakazuje na možnost, da površinski vodni oslički lahko v eni generaciji pridejo celo s Planinskega polja na Cerkniško jezero in obratno. Ta rezultat je malo verjeten in je glede na časovno razliko nabiranja vzorcev (skoraj 10 let) najverjetneje napačen. Če pa upoštevamo, da se v genetski strukturi vzorci med sosednjimi kraškimi polji (Cerkniško jezero, Rakov Škocjan) ne razlikujejo, med njimi mora biti prisoten genski pretok. Zaradi navedenega, je realno, da najdemo domnevne migrante prve generacije med Rakovim Škocjanom in Cerkniškim jezerom.

Osebki, ki so domnevni migranti prve generacije, so obeh spolov. Procentualno je več sicer samcev, vendar je treba upoštevati, da je večina osebkov v analiziranem vzorcu samcev.

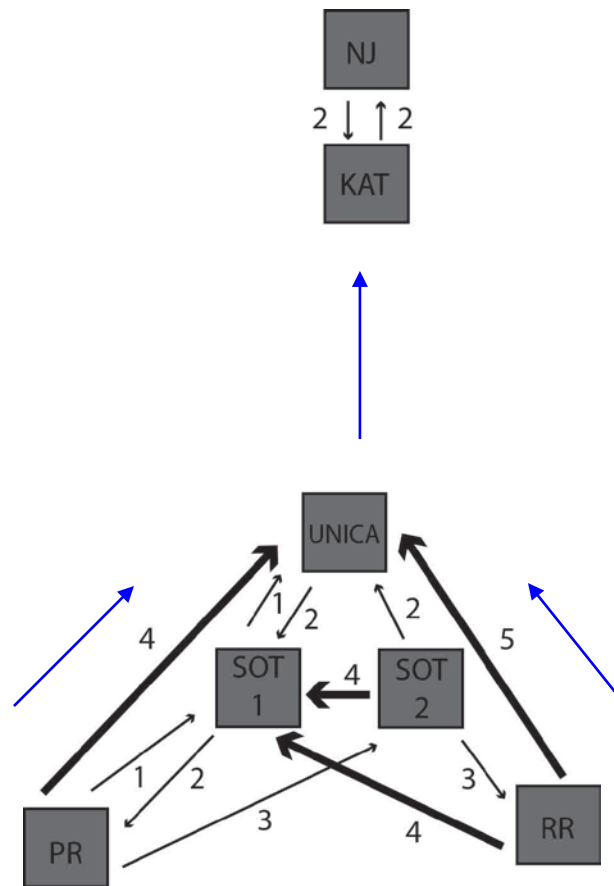
Analiza migracijskih poti podzemeljskih osebkov je pokazala, da naj ne bi prečkali površja (Slika 15). Migracije so prisotne med Katavotronom in Najdeno jamo, kar ustreza tudi analizi populacijske strukture. Osebkke, ki so migrirali po jamskem sistemu, smo našli

predvsem v Planinski jami na območju sotočja in podzemne Unice. Sotočje je edina povezava med Pivškim in Rakovim rokavom, saj direkne migracije med njima nismo zaznali. Identifikacija migrantov se tudi ujema z rezultati dodelitvenih testov (Slika 11).



Slika 14: Poti migracij vodnih osličkov iz površinskih in fenotipsko mešanih populacij ter podzemeljske populacije Pivškega rokava. Določili smo jih z analizo migrantov prve generacije v programu GeneClass2. Puščice prikazujejo smer migracije, številke pa število domnevnih migrantov. Z rdečo barvo so prikazane poti osebkov, ki so migrirali med površinskimi in podzemeljskimi populacijami. Beli kvadrat predstavlja površinsko populacijo, siv podzemeljsko, kvadrat zapoljen z gradientom pa fenotipsko mešano populacijo. Modra puščica označuje smer vodnega toka

Figure 14: Migration routes of *Asellus aquaticus* from surface and phenotypically mixed population as well as subterranean population from Pivka channel. Migration patterns were detected using first generation migrant identification in GeneClass2. Arrows point to direction of migration, numbers represent putative number of migrants. Red colour represent migration between different populations. White squares represent surface samples, grey subterranean and gradient filled phenotypically mixed population. The blue arrow indicates the direction of waterflow



Slika 15: Prikaz poti migracij podzemeljskih vodnih osličkov znotraj Planinske jame in v jamah severno od Planinskega polja. Določili smo jih z analizo migrantov prve generacije v programu GeneClass2. Puščice prikazujejo smer migracije, številke pa število domnevnih migrantov. Modra puščica označuje smer vodnega toka

Figure 14: Migration routes of subterranean *Asellus aquaticus* around Planina cave and in caves north of Planina polje. Migration patterns were detected using first generation migrant identification in GeneClass2. Arrows point to direction of migration, numbers represent putative number of migrants. The blue arrow indicates the direction of waterflow

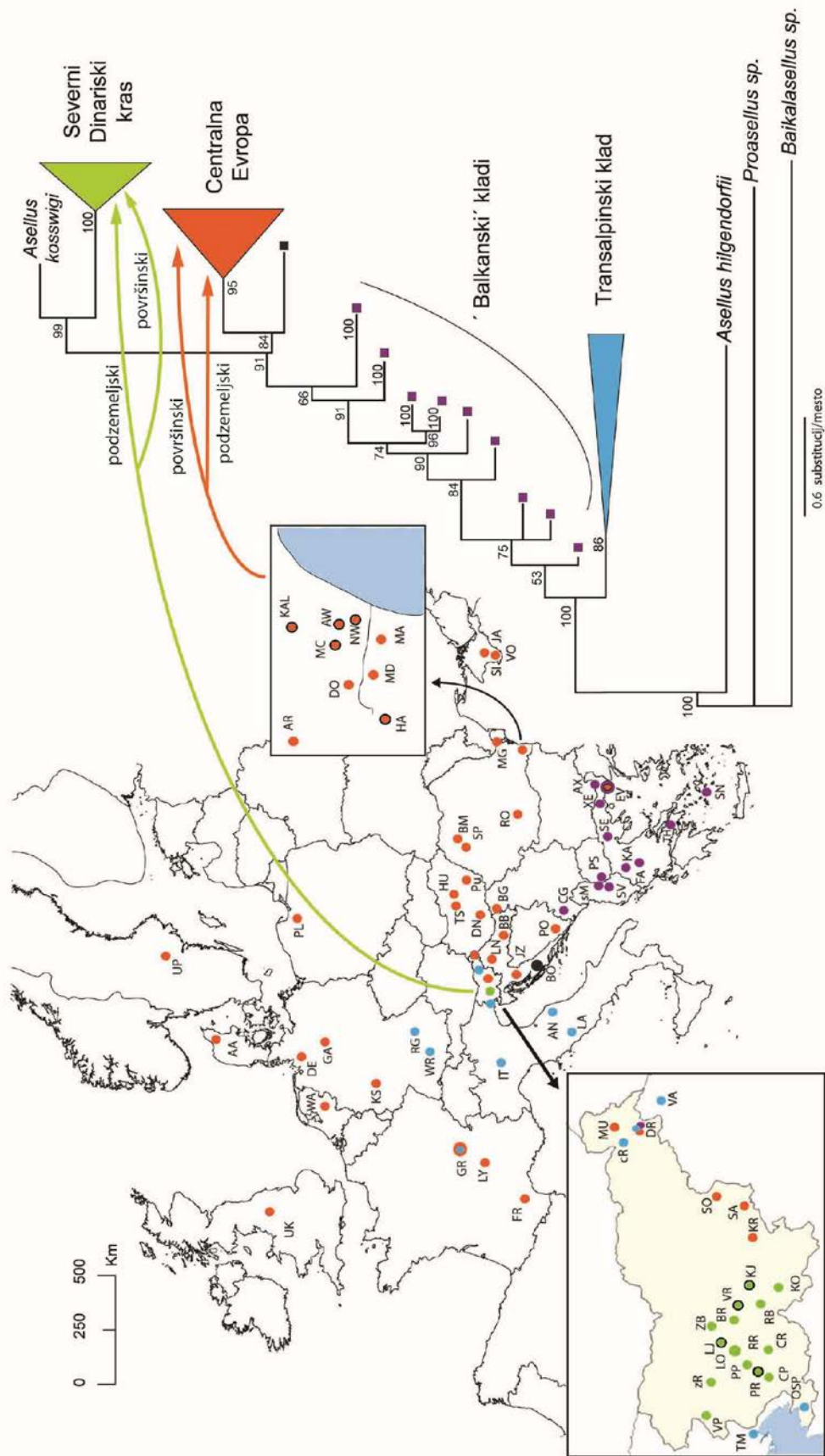
3.5 ANALIZE NA PODLAGI NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA MITOHONDRIJSKEGA IN JEDRNEGA GENA

3.5.1 Filogenetske analize

Vzorci iz Slovenije, tako površinski kot podzemeljski, so del skupine severnega Dinarskega krasa. Površinski vodni oslički iz Romunije so del centralnoevropske skupine, kar ustreza njihovemu geografskemu položaju. Romunski podzemeljski vodni oslički so prav tako del centralnoevropskega klada (Sliki 16 in 17). Podzemeljski vodni oslički iz Romunije in Slovenije tako nimajo najbližjega skupnega prednika. Filogenetska razdalja in zemljepisni položaj govorita v prid ločeni naselitvi in ločeni prilagoditvi na jamsko okolje. V obeh primerih so podzemeljski vodni oslički genetske podskupine lokalnih površinskih populacij in tako mljaši od razhoda glavnih evropskih filogeografskih skupin. Enako sliko pokaže tudi filogenetsko drevo jedrnega gena (Slika 18).

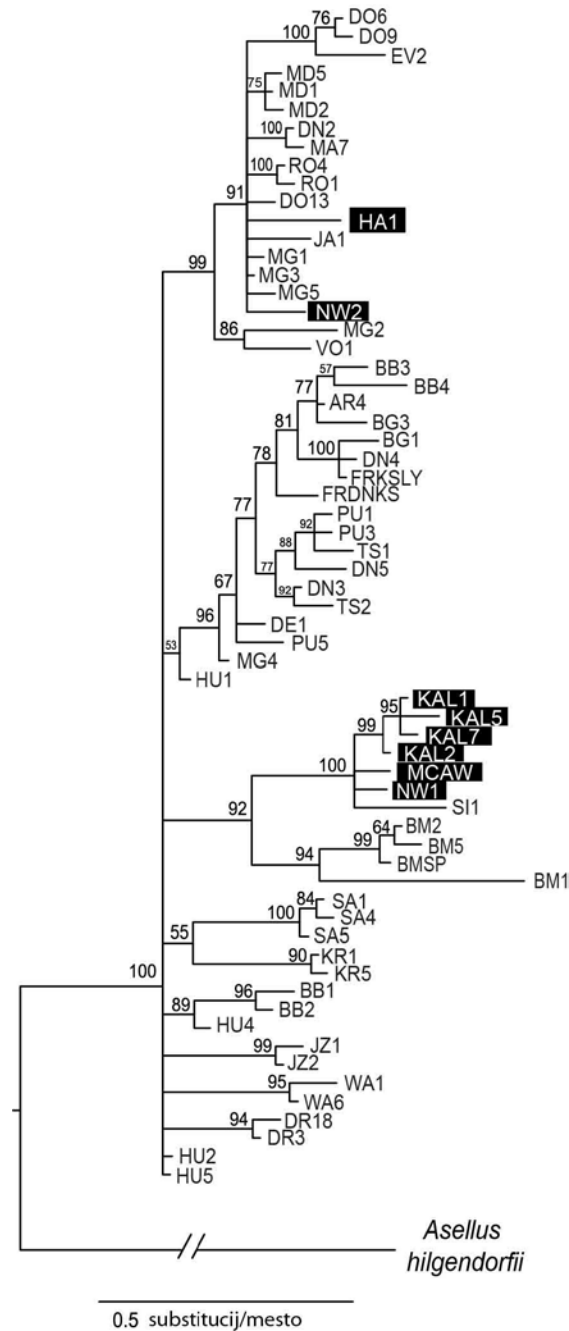
3.5.2 Ocena starosti prehoda v podzemni habitat

Čas, ko je živel zadnji skupni prednik slovenskih podzemnih vodnih osličkov s področja kraške Ljubljaniče, smo s kalibracijo molekulske ure na znano stopnjo mutacije na milijon let, ocenili na interval med 1,3 in 0,2 milijona let. Zadnji skupni prednik romunskih podzemnih osličkov, katerih haplotipi so vgnezdjeni med površinske, je mlajši od 1,5 milijonov let. Minimalne starosti nismo mogli določiti, ker ni znakov izključno podzemeljske radiacije. Ostali haplotipi romunskih podzemeljskih osličkov, ki oblikujejo monofiletsko skupino, pa so si delili skupnega prednika v obdobju med 3,8 in 0,2 milijona let. Ti rezultati nakazujejo, da je vodni osliček naselil podzemlje v Sloveniji in v Romuniji v podnebno turbulentnem obdobju Pleistocena.



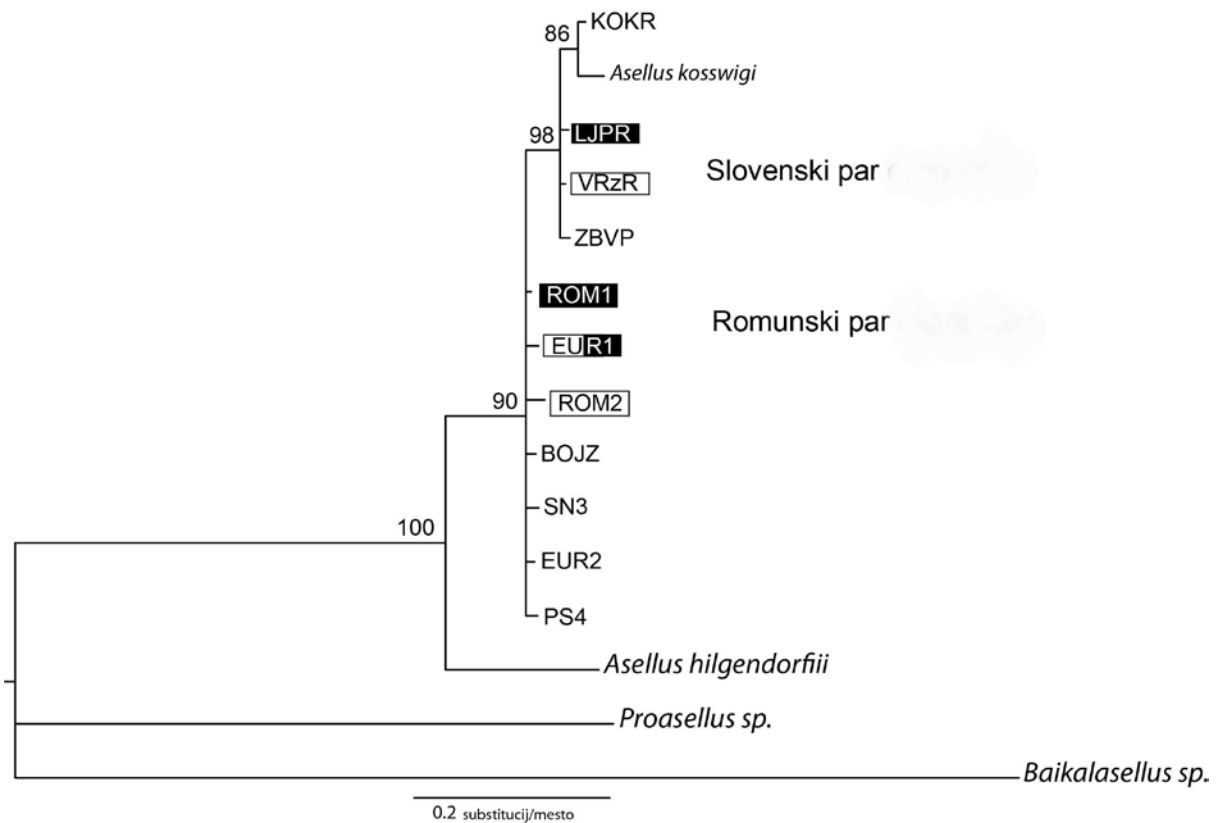
Slika 16: Prikaz vzorčenih lokalitet vodnega oslička in filogenetskega drevesa mitohondrijskega gena COI, narejeno po Bayesovi metodi. Števike predstavljajo vrednosti posteriorne verjetnosti. Točke, obkrožene s črno, ponazarjajo podzemeljske vzorce. Barva točk na zemljevidu se ujema z dodelitvijo haplotipov v velike filogeografske skupine na filogenetskem drevesu. Vidno je, da so vodni oslički podzemlje v Romuniji in Sloveniji naselili neodvisno

Figure 16: Distribution of sampling localities of *Asellus aquaticus* and phylogenetic tree of mitochondrial gene COI (Bayes method). Numbers on the tree represent posterior likelihoods. The colour of sampling locations corresponds to the phylogeographical group of the haplotypes. It is clear that *Asellus aquaticus* colonized subterranean habitat in Romania and Slovenia in two independent colonization events



Slika 17: Filogenetsko drevo mitohondrijskega gena COI, narejeno po Bayesovi metodi, ki vključuje vodne osličke iz centralnoevropske filogeografske skupine, kamor spadajo tudi vzorci iz Romunije. Številke predstavljajo vrednosti posteriorne verjetnosti. Haplotipi podzemeljskih vodnih osličkov so označeni s črno

Figure 17: Phylogenetic tree of mitochondrial gene COI calculated with Bayesian interference. It includes haplotypes from Central European phylogeographical group, where Romanian samples are positioned. Numbers indicate posterior likelihoods. Hyplotypes belonging to subterranean population are marked with black

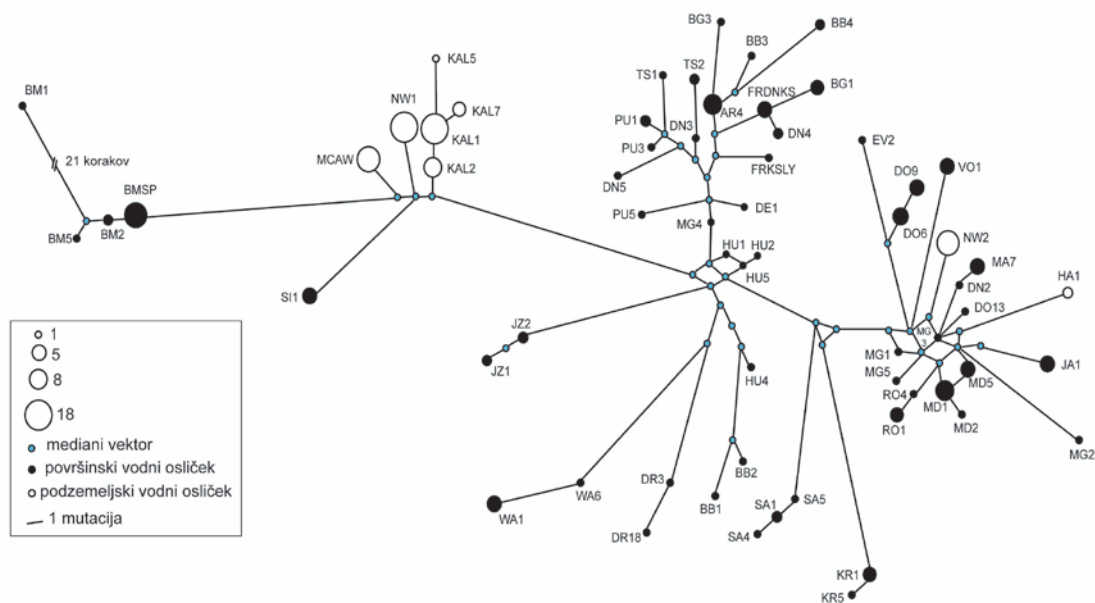


Slika 18: Filogenetsko drevo jedrnega gena za 28S rRNK, narejeno z Bayesovim pristopom. Števike predstavljajo vrednosti posteriorne verjetnosti. Nukleotidna zaporedja, ki smo jih našli v slovenskem in romunskem paru sosednjih površinskih in podzemeljskih populacij so posebej označena: bel kvadrat označuje površinske osebkke, črn podzemeljske, črno-bela kombinacija pa pomeni, da je zaporedje enako pri podzemeljskih in površinskih osebkkih

Figure 18: Phylogenetic tree of nuclear gene 28S rRNA calculated with Bayesian interference. Numbers indicate posterior likelihoods. Sequences found in Slovenian and Romanian adjacent subterranean and surface populations are marked: black represents subterranean, white surface, black/white combination means that the same sequence was found in both populations

3.5.3 Analiza mreže haplotipov

V mreži, sestavljeni iz haplotipov centralnoevropskega klada (Slika 19), so haplotipi podzemeljskih vodnih osličkov v dveh ločenih delih. To nakazuje morebitno (vsaj) dvakratno naselitev podzemlja. Skupini haplotipov sta med seboj ločeni za približno petdeset korakov. Predniški haplotipi manjkajo in so nadomeščeni z medianimi vektorji (hipotetičnimi predniškimi haplotipi). Haplotipa, ki bi bil skupen tako površinskim kot podzemeljskim osebkom, nismo našli.



Slika 19: Mreža haplotipov centralnoevropske skupine vodnega oslička, kamor spadajo vzorci iz Romunije
Figure 19: Haplotype network of the Central European group of *A. aquaticus*, where Romanian samples are placed

Z novimi vzorci iz sistema kraške Ljubljance smo dopolnili mrežo haplotipov, sestavljeno v preteklih raziskavah (Verovnik in sod., 2004). Z dodanimi 144 vzorci smo dobili 21 novih haplotipov, predvsem pa še povečali število že tako najbolj pogostega haplotipa PPJS1, ki ga najdemo na večini vzorčnih mest in je skupen tako površinskim kot podzemeljskim osebkom. Haplotipi s severnega dela Planinskega polja so nadomestili nekaj manjkajočih haplotipov, ki povezujejo skupino podzemeljskih vzorcev severno od Planinskega polja.

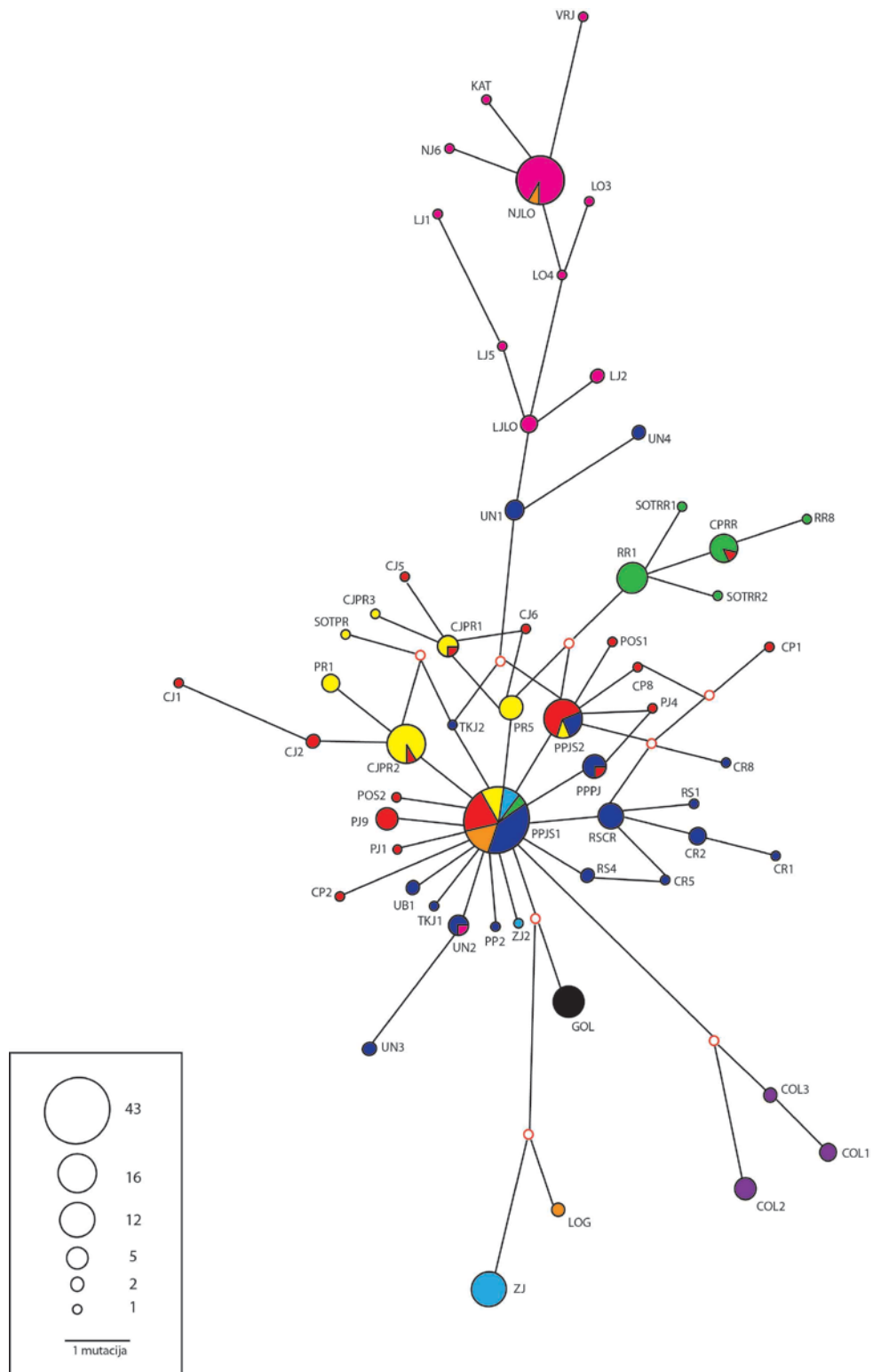
Haplotipi so med seboj oddaljeni le nekaj korakov in večina jih izhaja iz najbolj pogostega centralno pozicioniranega haplotipa, kar nakazuje recentno radiacijo (Avice, 2000).

Pogostejši haplotipi so skupni podzemeljskim in površinskim osebkom, kar tudi nakazuje na nedaven prehod v podzemlje.

Haplotipe v mreži smo pobarvali glede na populacijsko strukturo (Preglednica 14, Slika 8), določeno z mikrosateliti. Jasno diferencirana je populacija iz jame Obrh Čolnici, ki ima tri edinstvene haplotipe, ki so od haplotipa PPJS1 oddaljeni več korakov. Jasno mejo bi lahko postavili še pri skupini haplotipov severno od Plannskega polja, v podzemni Ljubljanici. V vzorcu iz Katavotrona smo našli en haplotip, ki je skupen s površinskimi osebki. Ta osebek je bil pigmentiran, tako da ta ugotovitev, niti ni presenetljiva. Med seboj so bolj oddaljeni tudi haplotipi iz Zelških jam in Rakovega rokava, povezuje ju le vsesplošno razširjen haplotip. V Logarčku smo našli haplotipe iz bližnje podzemne Ljubljanice, haplotip PPJS1 ter haplotip, ki ima hipotetičnega skupnega prednika z vzorcem iz Zelških jam.

Zelo nejasna je situacija v Črni jami, kjer so pomešani haplotipi troglomorfnih osebkov iz Pivškega rokava ter fenotipsko mešane populacije, ki pa jih mikrosateliti jasno ločijo.

V Romuniji skupnih haplotipov površinskih in podzemeljskih osebkov nismo našli in na prekinjen genski pretok kaže tudi analiza z mikrosateliti. V Sloveniji pa so rezultati kontradiktorni: populacije, ki so se pri analizi z mikrosateliti pokazale kot genetsko popolnoma diferencirane, imajo skupne haplotipe.



Slika 20: Mreža haplotipov vodnega oslička iz sistema kraške Ljubljane. Barve označujejo populacijsko strukturo, kot smo jo določili z analizo mikrosatelitov (Preglednica 14 in Slika 8)

Figure 20: Haplotype network of *Asellus aquaticus* samples from the Ljubljana river system. Colours depict population structure that was discerned from microsatellite analysis (Table 14 and Figure 8)

3.5.4 Genetska pestrost mitohondrijske DNK

Nukleotidna pestrost osebkov iz populacije Rakovega rokava Planinske jame je bila najnižja, kar je presentljivo glede na visoko genetsko pestrost mikrosatelitov. V Logarčku smo pomnožili tri zelo raznolike haplotipe, kar se posledično odraža v visoki nuklotidni pestrosti, ki je bila višja kot pri površinski populacijah. Z izjemo Planinske jame, imajo podzemeljske populacije enako ali višjo nuklotidno pestrost kot površinske.

Tako kot ocena genetske pestrosti z mikrosateliti, tudi mitohondrijska DNK kaže na veliko večjo pestrost romunskih vzorcev. Tudi če združimo vse vzorce iz sistema kraške Ljubljanice (Preglednica 17), je nukleotidna pestrost v Romuniji, tako površinske kot podzemeljske populacije, višja.

Preglednica 17: Genetska pestrost mitohondrijskega gena COI pri vodnem osličku v porečju kraške Ljubljanice in Romunije v okolici Mangalije

Table 17: Genetic diversity of mitochondrial gene COI in *Asellus aquaticus* from the Ljubljanica river system and samples from Romania (around Mangalia)

Skupina	Št. hap	π	h	Št. osebkov
kraška Ljubljanica				
Planinska jama - Pivka	8	0,0024	0,725	31
Planinska jama - Rak	6	0,0016	0,671	22
Zelške jame	3	0,0034	0,362	15
Logarček	3	0,0052	0,511	10
Čolničiči	3	0,0033	0,689	10
Ljubljanica (KAT, NJ, VRJ, LO, LJ)	11	0,0031	0,592	36
Cerkniško jezero, Rakov Škocjan, Tkalca jama, Planinsko polje	18	0,0032	0,871	60
Črna jama, Pivka jama, Postojnska jama, Postojna	18	0,0033	0,881	39
Golobina	1	/	/	10
kraška Ljubljanica				
	58	0,0074	0,939	239
Romunija				
podzemeljski	8	0,018	0,834	77
površinski	8	0,017	0,864	39

Št. hap – število haplotipov; π – nukleotidna pestrost; h – pestrost haplotipov

3.5.5 Analiza AMOVA

Pri primerjavi parov podzemeljskih in površinski populacij iz Slovenije in Romunije smo ugotovili, da se v obeh primerih populaciji iz različnih habitatov med seboj močno razlikujeta. Vprašanje je, kolikšen del genetske variabilnosti je posledica divergence med habitatoma in kolikšen del je podedovan od predniške populacije. Analiza molekulske variance je pokazala nasprotujoče si rezultate za slovenski in romunski par. Pri romunskem paru je bila varianca mikrosatelitov in mitohondrijske DNK med populacijama, kot tudi

znotraj populacije razdeljena polovično. V paru iz Slovenije je varianca pri mitohondrijski DNK znotraj populacij višja (78%) kot med populacijama, pri mikrosatelitih pa je ravno obratno (Preglednica 18).

Preglednica 18: Analiza molekulske variance (AMOVA) za haplotipe COI gena in osem mikrosatelitov

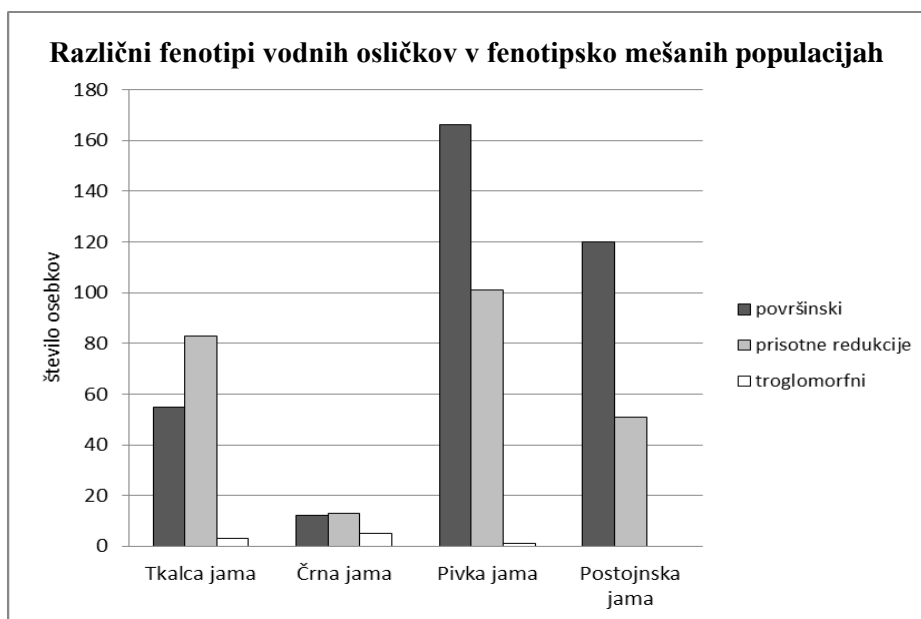
Table 18: Analysis of molecular variance (AMOVA) for haplotypes of COI gene and eighth microsatellite loci

Vir variance	Romunija		Slovenija	
	Delež skupne variance [%]	Fst	Delež skupne variance [%]	Fst
Mitohondrijska DNK (COI)				
Med populacijama (podzemeljska/površinska)	49	0,49*	22	0,22*
Znotraj populacij	51		78	
Mikrosatelitski lokusi				
Med populacijama (podzemeljska/površinska)	40	0,40*	87	0,87*
Znotraj populacij	60		13	

*test z 10.100 permutacijami, statistično značilna razlika med testirano strukturo

3.6 POJAV REDUKCIJ PIGMENTA IN OČI V FENOTIPSKO MEŠANIH POPULACIJAH

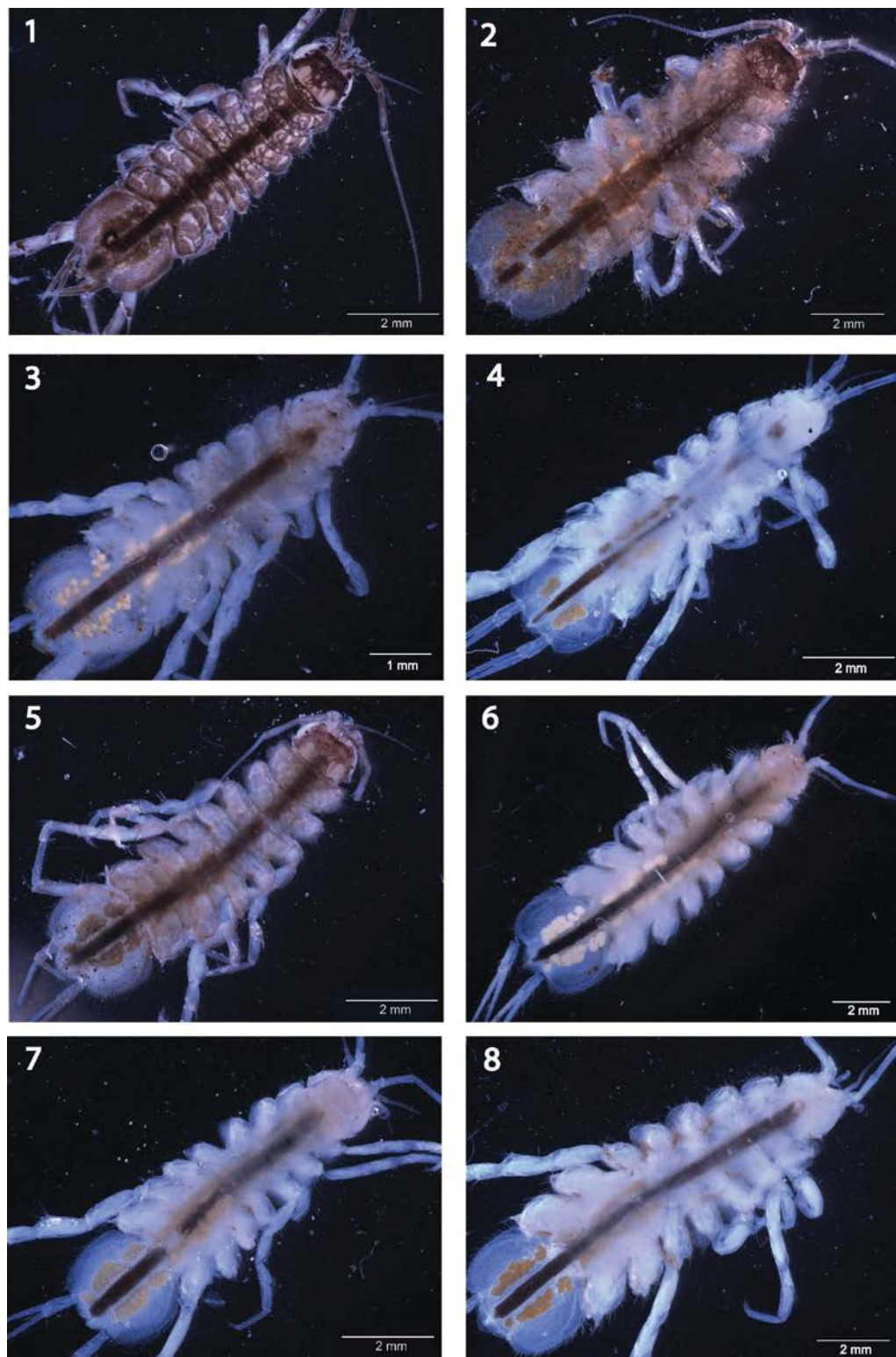
Na površju smo nabrali le osebkke s površinskim fenotipom, podzemeljske populacije pa sestavljajo le osebki, ki imajo izražen troglomorfni fenotip (popolna redukcija pigmenta in oči). V fenotipsko mešanih populacijah najdemo večje število osebkov, kjer se pojavljajo redukcije pigmenta na telesu in očeh. Popolnoma reducirane omatidije imajo le podzemeljski osebki. V vzorcu iz Črne jame, namenjenemu genotipizaciji z mikrosateliti, smo nabrali pet osebkov, ki so bili troglomorfni in pripadajo populaciji podzemeljskih vodnih osličkov iz Pivškega rokava. V Tkalci jami in Pivki jami smo pri dodatnem vzorcu našli še nekaj troglomorfni osebkov, ki jih nismo genotipizirali. Glede na rezultate populacijske strukture in jasno genetsko diferenciacijo podzemeljske in sosednje fenotipsko mešane populacije (tako v Pivki kot Raku) pričakujemo, da so troglomorfni osebki del podzemeljske populacije.



Slika 21: Histogrami prikazujejo število osebkov z različnimi fenotipi (površinski, prisotne redukcije in troglomorfni) v štirih jamah, kjer smo nabrali vzorce fenotipsko mešanih populacij

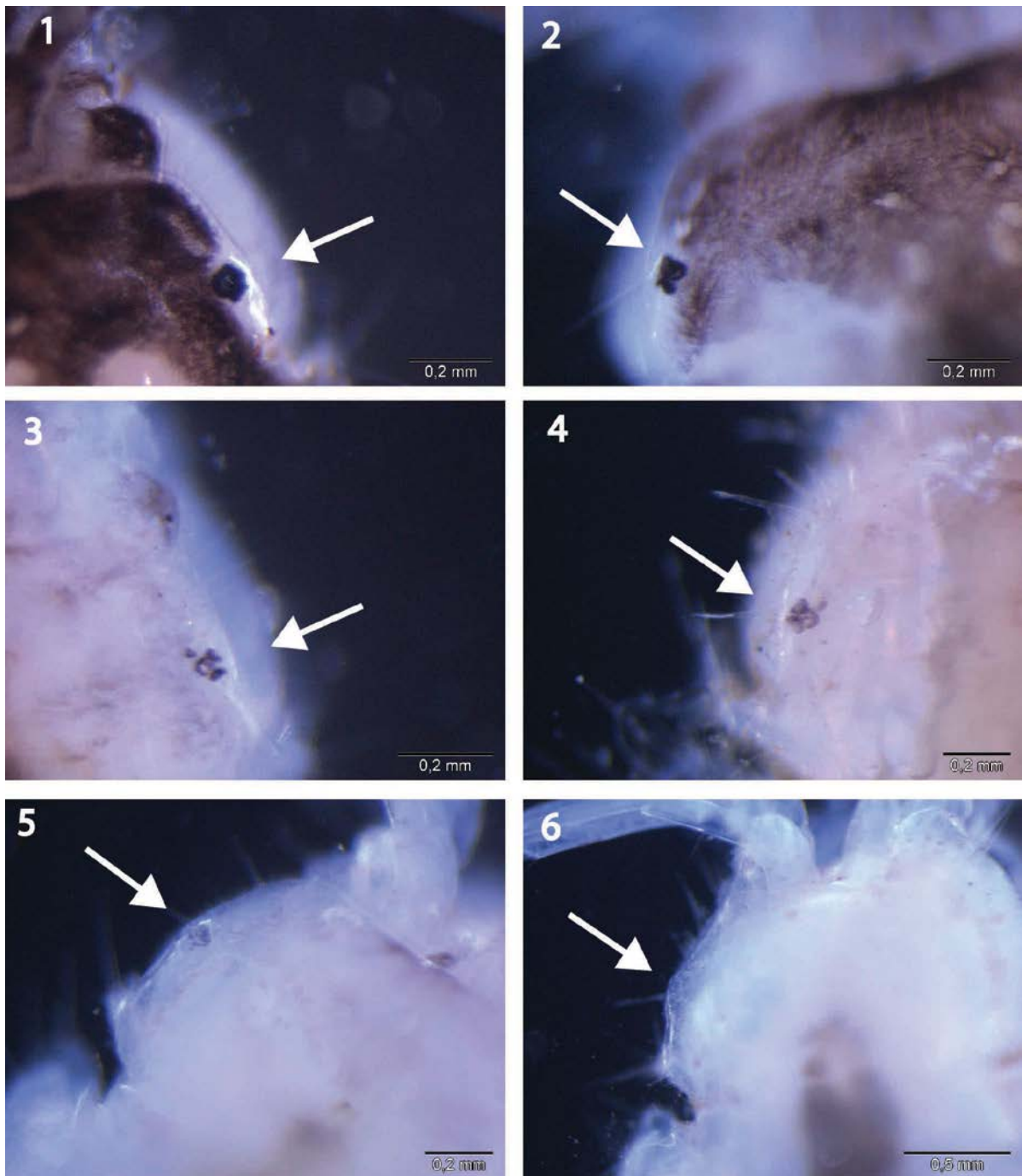
Figure 21: Number of individuals with different phenotypes (surface, reductions present and troglomorphic) from four caves, where we collected samples from phenotypically mixed populations

V Tkalci jami je bil največji delež (59%) osebkov pri katerih smo opazili pojav redukcij pigmenta telesa in oči. Z izjemo fenotipa, kjer je telesni pigment reduciran, oči pa močno pigmentirane, smo našli različne stopnje pigmentacije telesa (Slika 22) in pigmentacije oči (Slika 23). Tudi, če je pigment v očesu popolnoma reduciran, je bila še vedno vidna struktura omatidija (Slika 23-6). V Pivki jami in Postojnski jami je imela večina osebkov površinski fenotip, a je bil delež osebkov s prisotnimi redukcijami kljub temu višji od 30%. V Postojnski jami so med osebki z redukcijami prevladovali samice, v Pivki jami pa v razmerju med spoloma ni večjih razlik. V Tkalci jami smo nabrali več samcev, kar se odraža pri vseh različnih fenotipih (Priloga G).



Slika 22: Redukcija telesnega in očesnega pigmenta pri vodnem osličku v fenotipsko mešani populaciji

Figure 22: Reductions of body and eye pigmentation in *Asellus aquaticus* from phenotypically mixed populations



Slika 23: Redukcija očesnega pigmenta pri vodnem osličku v fenotipsko mešani populaciji

Figure 23: Reductions of eye pigmentation in *Asellus aquaticus* from phenotypically mixed populations

4 RAZPRAVA

4.1 PODZEMLJE RAZKRIVA KOMPLEKSNO POPULACIJSKO STRUKTURO

Analiza z mikrosateliti je potrdila hipotezo, da so površinske in podzemeljske populacije med seboj genetsko jasno diferencirane, kljub temu da živijo parapatrično. Naši rezultati se popolnoma ujemajo z rezultati, ki so jih Verovnik in sod. (2003) pridobili z analizo RAPD in morfometrično analizo (Prevorčnik in sod. 2004).

Potrdili smo neodvisen prehod vodnega oslička v podzemlje v Sloveniji in v Romuniji. Romunske populacije imajo drugačne alele in drugačne frekvence skupnih alelov. Kljub parapatričnemu oziroma simpatričnemu pojavljanju površinskih in podzemeljskih populacij, med njimi ne prihaja do križanja.

Podzemlje kraške Ljubljaničice naseljujejo vsaj tri populacije vodnega oslička, ki so med seboj genetsko jasno diferencirane: Pivški rokav, Rakov rokav in jama Obrh Čolniči. Pri njih so prisotne tudi razlike v morfologiji, na podlagi katerih jih lahko med seboj ločimo (Prevorčnik in sod., 2004; Lasnik, 2012; Prevorčnik osebni vir).

Osebki iz fenotipsko mešanih populacij, ki smo jih nabrali v jamskem okolju, so del površinske populacije, sintopo pa se pojavljajo z osebki iz podzemeljske populacije. Sklepamo, da so površinske in podzemeljske populacije v naravi med seboj reproduktivno izolirane, čeprav so jih v laboratoriju uspešno križali (Protas in sod., 2011; Žiga Fišer, osebni vir).

Površinski osebki se razdelijo v dve skupini, kar ustreza njihovim morfološkim značilnostim in taksonomskemu statusu (Prevorčnik in sod., 2004, 2009), so pa tudi geografsko ločeni. Znotraj teh dveh skupin nismo našli dodatne strukturiranosti. Dopuščamo pa možnost, da bi drugačen nabor mikrosatelitskih markerjev, ki bi bil razvit na površinskih osebkih, dal drugačne rezultate, saj kljub manjšemu izboru lokusov, ti pri njih kažejo znake prisotnosti ničnih alelov.

4.2 PLANINSKA JAMA EDINSTVENA NE SAMO ZARADI SOTOČJA DVEH REK TEMVEČ TUDI »SOTOČJA« DVEH PODZEMELJSKIH POPULACIJ

Imeli smo priložnost izkoristiti naravno danost edinstvene hidrološke situacije v Planinski jami in preveriti, kaj se v naravi dogaja na mestu, kjer osebki obeh jamskih populacij vodnega oslička pridejo v kontakt. Na sotočju se je pokazalo, da se osebki, ki pripadajo populaciji iz Pivškega rokava v večini nahajajo na Pivškem delu sotočja, enako velja za osebke iz populacije Rakovega rokava. Le nekaj samcev je migriralo med obema vzorčnima točkama. Ko smo nabirali vzorec z Rakove strani sotočja, smo bili še posebej pozorni na parčke (prekopule). En parček sta res sestavljala osebka iz različnih populacij, našli pa smo tudi 6 potencialnih hibridov. Natančna morfološka analiza (Lasnik, 2012) je

potrdila, da se tudi osebkki na sotočju med seboj ločijo v dve diskretni skupini (tako samci kot samice). Potencialni hibridni osebkki so bili žal precej poškodovani, zato je bila morfološka uvrstitev težavna. Dejstvo je, da je osebkkov, ki kažejo sledi mešanega izvora na sotočju, izredno malo. Vsa odstopanja od Hardy-Weinbergovega ravnovesja in vezavnega ravnovesja v vzorcu s sotočja pojasni Wahlundov efekt (Salkoe in Tonen, 2006). Na sotočju smo zajeli osebkke, ki pripadajo dvema različnima populacijama ter jih obravnavali kot eno. Če bi se obe populaciji med seboj pogosto križali, bi moral biti delež hibridnih osebkkov občutno višji, sledi genskega pretoka pa bi bile vidne tudi med osebkki, ki živijo globlje v jami.

Od sotočja naprej, kjer bi se tekom podzemne Unice populaciji med seboj lahko pomešali, je tudi večina osebkkov pripadala eni od populacij (Rakov rokav). Glede na spremenljivost vodnega režima in dejstvo, da živali nismo našli pri vsakem vzorčenju, je vprašanje, ali je v tem delu jame sploh stalno prisotna populacija jamskih vodnih osličkov. Večji delež vodnih osličkov iz Rakovega rokava nakazuje na možnost, da je bil glavni dotok vode pred vzorčenjem s strani Raka. Analiza migracij je pokazala, da je kar četrtina osebkkov nabranih v podzemni Unici priseljencev prve generacije. Veliko je bilo juvenilnih osebkkov, ki bi jih sem lahko zanesla tudi voda. Smo pa našli kar 11 osebkkov, ki so najverjetneje hibridi (petina vzorca). V tem kratkem delu podzemnega toka tako lahko govorimo o hibridni coni. Ker v obeh rokavih nismo našli sledi mešanja populacij, sklepamo, da je šibak genski pretok med obema podzemeljskima populacijama omejen le na del med sotočjem in izhodom iz jame. Možen mehanizem, ki omejuje križanje, je enostavno fizična ločenost podvodnih sistemov. Ob nizkih vodah Rak teče le v Malenščico in se popolnoma ogne Planinski jami, v tem času pa Unica dobiva vodo le iz Pivke (Gams, 2004). Razmere so lahko tudi obratne, in sicer slednje opazimo kot močan vodni tok iz enega od obeh rokavov. To pomeni, da se na sotočju zadržujejo le osebkki iz enega jamskega rokava in niti nimajo veliko možnost za medsebojno parjenje. Genski pretok je tako premajhen, da bi se populaciji med seboj zlili. Več odgovorov lahko dobimo s poskusi križanja.

4.3 GENETSKA PESTROST JE ZELO RAZNOLIKA TAKO NA POVRŠJU KOT V PODZEMLJU, ODRAŽA PA SE POVEZAVA Z GEOGRAFIJO

Vodni oslički iz Romunije so genetsko bolj pestri kot vodni oslički iz porečja kraške Ljubljani. Vsevropska filogeografska analiza je pokazala, da je pestrost največja v tokovih velikih rek (Verovnik in sod., 2005). V Črno morje se izliva Donava in sama geografska lega ter večja razširjenost centralnoevropskega klada lahko razloži visoko genetsko pestrost romunskih vzorcev. Geografsko gledano je klad severno Dinarskega krasa omejen na majhno območje. Na krasu so površinske populacije med seboj bolj izolirane, saj kraška polja povezujejo le podzemne poti (Verovnik in sod., 2003; Palandačić in sod., 2012), populacije pa so tudi pod vplivom močnih nihanj vode (Stepišnik in sod., 2012). Ta specifika površinskega habitata lahko razloži nižjo genetsko

pestrost slovenskih površinskih populacij, tako pri mitohondrijski DNK kot pri mikrosatelitskih lokusih.

Podzemeljske populacije so pogosto genetsko manj pestre (Borowsky and Vidthayanon, 2001; Strecker in sod., 2003; Carlini in sod., 2009; Bradic in sod., 2012). Na dejstvo, da stopnji polimorfizma in heterozigotnosti lahko odstopata med različnimi površinskimi in podzemeljskimi populacijami, kot tudi med različnimi jamskimi vrstami je opozoril že Culver (1982). To smo opazili tudi pri vodnem osličku v sistemu kraške Ljubljani. Nekatere podzemeljske populacije so genetsko celo bolj pestre kot sosednje površinske. Enak vzorec se je pokazal že pri RAPD markerjih (Verovnik in sod., 2003).

Verovnik in sod. (2003) so nizko genetsko pestrost povezali s pojavom ozkega grla zaradi onesnaženja reke Pivke (Sket, 1981). Prav v populaciji Pivškega rokava je ozko grlo potrdila tudi naša analiza. V Malnih, kjer na Planinsko polje priteče voda iz Raka, je postavljeno črpališče pitne vode (Gams, 2004), kar pomeni da mora biti voda v tem delu podzemlja veliko kvalitetnejša. Populaciji iz Zelških jam in jame Obrh Čolnici imata sicer zelo nizko heterozigotnost, vendar tam ni prišlo do pojava ozkega grla.

Pogosto nizko genetsko pestrost jamski živali razlagajo kot posledico peridodnih pojavov ozkega grla zaradi pomanjkanja hrane in nihanja nivoja vode (Strecker in sod., 2003; Carlini in sod., 2009). V podzemeljskem habitatu v Romuniji, kjer so vodni oslički del kompleksnega kemoavtotrofnega ekosistema, hranil ne primanjkuje, prav tako ni večjih vodnih nihanj (Sarbu, 2000). V jamah s sulfidno vodo je presenetljivo visoka biodiverziteteta (Culver in Sket, 2000; Flot in sod., 2010), ki jo pripisujejo prav kompleksnim prehranjevalnim spletom (Sarbu in sod., 1996; Engel, 2007). Kljub temu je biodiverziteteta tam bistveno nižja kot v kraški Ljubljani (Culver in Sket, 2000). Čeprav se zdi, da v jami Movile ni pomanjkanja hrane, je hranilnih snovi v površinskih vodah več. Ta razlika je lahko razlog za opaženo nižjo genetsko pestrost podzemeljske populacije vodnega oslička. Na visoko nukleotidno pestrost romunskih podzemeljski populaciji pa vpliva dejstvo, da so si haplotipi med seboj zelo različni. Visoka pestrost je lahko rezultat večkratne vsetitve v podzemlje, tak vzorec je Sket (1997) predlagal tudi za človeško ribico.

4.4 VELIKA SPOSOBNOST MIGRACIJE POVRŠINSKIH OSEBKOV IN OMEJENOST PODZEMELJSKIH POPULACIJ NA PODZEMELJSKI HABITAT

Analiza z genetskimi markerji RAPD (Verovnik in sod., 2003) je zavrnila hipotezo o modelu stopnjevitih migracij ter pokazala, da je v Postojnsko-Planinskem jamskem sistemu prisoten kompleksen vzorec migracij. Te rezultate smo potrdili z analizo z mikrosateliti. V sistemu kraške Ljubljani sta prisotni dve površinski populaciji, ki sta genetsko diferencirani, vendar prideta v stik na Planinskem polju, kamor migrirajo osebki iz Postojnske kotline in začetnih delov podzemne Pivke. To pomeni, da površinski vodni oslički lahko preživijo migracijo preko 10 km podzemeljskega habitata.

Čeprav se kraška polja, ki so med seboj povezana le z odseki podzemeljskega toka, obnašajo kot nekakšni otoki (Sket, 1969), je genski pretok med Cerkniškim jezerom, Rakovim Škocjanom in Planinskim poljem dovolj velik, da nismo opazili genetske strukturiranosti. Z identifikacijo migrantov prve generacije smo pokazali, da površinski osebki lahko prečijo podzemne odseke. Lahko se držijo glavnih vodotokov, katerim sledimo v jamah, lahko pa obstajajo še druge podzemne povezave, do katerih nimamo dostopa, saj npr. vsa voda s Cerkniškega jezera ne odteče preko Rakovega Škocjana (Gams, 2004). Migracije v smeri vodnega toka so lahko pasivne, ko močan vodni tok živali odnese s seboj. Težko pa to razloži migriranje v nasprotni smeri vodnega toka. Aktivno migracijo skozi podzemlje so dokazali pri ribah gaovicah (Palandačič in sod., 2012), ki se v času suše zatečejo v podzemlje in lahko dosežejo tudi oddaljena kraška polja. Vzorci migracij so bili drugačni pri mehiških molijih (*Poecilia mexicana*), kjer površinski osebki ne migrirajo v jame. Znotraj jame pa kljub preprekam (1,5 m visok slap) prihaja do migracij v obeh smereh, saj občasne visoke vode to prepreko zabrišejo (Plath in sod., 2007). Površinski vodni oslički migrirajo v obe smeri, tudi v in izven jam. Na ta pojav verjetno vpliva tudi hidrodinamika (poplave in suše) površinskega habitata.

Podzemeljski osebki migrirajo le znotraj podzemlja. Našli nismo nobenega migranta prve generacije, ki bi prečkal površje. Vodne osličke iz jame Škratovke smo sicer nabrali tik na vhodu v jamo, tako da so bili praktično na površju. Voda jih vsekakor lahko zanese izven jam, vendar v površinskem habitatu najverjetneje ne morejo preživeti. Možni razlogi so kompeticija in predacija (Aljančič in Năpăruș, 2012; Eroukhmanoff in sod., 2009). Znotraj jam se lahko preseljujejo v obeh smereh, kar je najverjetneje pogojeno s spremenljivimi vodnimi razmerami. V času suše, ko vode v Rakovem rokavu sploh ni bilo, nismo našli nobenih znakov poginulih živali. To pomeni, da so se že prej aktivno umaknile v dele, kjer se zadržuje voda. Migracije med Pivškim in Rakovim rokavom so možne le preko sotočja v Planinski jami.

Populaciji iz Rakovega rokava in Zelških jam imata večino alelov skupnih, kar pomeni da med seboj ne morata biti popolnoma izolirani. Razlika med njima je v frekvencah alelov in v genetski pestrosti, kar pomeni da je vpliv genetskega drifta (razhajanje populacij) večji kot vpliv migracij (poenotenje populacij) (Freeland, 2005). Populaciji ločuje, sicer kratek, površinski habitat, kjer je velika možnost predacije s strani površinskih organizmov. Ne smemo pa pozabiti niti tega, da ta habitat naseljujejo površinski osebki, katerih življenjski prostor se razteza še naprej v Tkalco jamo in ki lahko predstavljajo kompeticijo. Ne moremo tudi izključiti manjših podzemnih povezav obeh jamskih habitatov, ki bi predstavljale migracijske poti za podzemeljske osebke. Razlog, da nismo našli nobenega priseljence prve generacije, je lahko tudi v tem, da je vzorčna točka populacije v Rakovem rokavu na povsem drugem koncu vodnega toka (Rakov rokav blizu sotočja v Planinski jami) in, zaradi bolj ustreznih življenjskih pogojev, globlje v jamskem sistemu, kjer je voda prisotna skozi celo leto (Skrivnostno jezero in nedostopne povezave do izvira Malenščice), zato niti ni potrebe da bi osebki odšli tako daleč. Najdba vodnih

osličkov iz populacije Rakovega rokava v jami Škratovki kaže na to, da naseljujejo še ves nam nedostopni del podzemnega Raka.

4.5 NASPROTUJOČI SI SIGNALI RAZLIČNIH GENETSKIH MARKERJEV

Mikrosatelitski lokusi podpirajo jasno diferenciacijo podzemeljskih in površinskih populacij, tako v sistemu kraške Ljubljanice kot v Romuniji. Analiza mitohondrijske DNK pa prikaže drugačno sliko.

Mikrosatelitski genetski markerji opisujejo trenutno stanje populacijske strukture in nam ne povedo veliko o preteklih procesih ter strukturi populacij v preteklosti. V ta namen moramo uporabiti drugačne genetske markerje (npr. mitohondrijsko DNK), ki se razvijajo počasneje in pokažejo znake časovno bolj oddaljenih dogodkov. Velikokrat pride do nasprotujočih si ugotovitev, zato je pomembno, da upoštevamo čim več različnih informacij in smo pozorni, kakšno časovno obdobje določen genetski marker lahko pokriva (Freeland, 2005; Sala-Bozano in sod., 2009; Toews and Brelsford, 2012).

V literaturi najdemo primere, kjer analiza z mikrosateliti pokaže popolno genetsko diferenciacijo in prekinitev genskega pretoka, hkrati pa najdemo skupne mitohondrijske haplotipe. Tak vzorec srečamo pri različnih habitatnih tipih (ekomorfih), ki so ozko sorodni in so se ločili šele nedolgo nazaj (Barluenga in sod., 2006; Tobler in sod., 2008). Takšna je tudi situacija med podzemeljskimi in površinskimi populacijami v sistemu kraške Ljubljanice.

Lahko pa srečamo tudi obratno situacijo. Na takšno smo naleteli na vzorcu podzemeljskih vodnih osličkov, nabranih v vodnjaku z ulice Nețoi v Mangaliji. Vzorec je popolnoma homogen pri analizi z mikrosateliti, vsebuje pa dva zelo različna mitohondrijska haplotipa. To lahko razložimo kot ločeno naselitev istega habitata (Hausdorf in sod., 2011; Strecker in sod., 2012).

4.6 USMERJENA SELEKCIJA PODZEMNEGA OKOLJA DELUJE NAVKLJUB NEPREKINJENEMU GENSKEMU PRETOKU

Fenotipsko mešane populacije v začetnih delih jam so nedvomno del sosednje površinske populacije in niso križanci. Kljub razlikam v fenotipu, je genski pretok s površjem dovolj močan, da ne prihaja do razhajanja populacij. Genetska pestrost fenotipsko mešane populacije je enaka kot pri površinski in se v desetih letih celo ni spremenila. Situacija je enaka v zahodnem in v vzhodnem delu Postojško-Planinskega jamskega sistema, kar kaže na konvergentno evolucijo redukcije pigmenta. Do popolne redukcije omatidijev je prišlo le v popolnoma izoliranih podzemeljskih populacijah.

V površinskih populacijah mora biti stalno prisotna visoka genetska variabilnost (Schluter, 2009) genov, ki so vpleteni v pigmentacijo. Depigmentiran fenotip se lahko izrazi z

različnimi kombinacijami alelov (Protas in sod., 2011), kar govori v prid veliki variabilnosti teh genov. Navkljub temu pa se za polovico nižja heterozigotnost populacij iz Rakovega Škocjana in Tkalce jame ne odraža v pestrosti fenotipov. V Tkalci jami je celo več osebkov, pri katerih je prišlo do redukcij pigmenta na telesu in v očeh. Da evlucijski potencial troglomorfni lastnosti ni povezan z genetsko pestrostjo mikrosatelitskih lokusov, se je pokazalo tudi pri drugih lastnostih (Konec in sod., 2015).

Depigmentirani fenotip podzemeljskih osebkov je recesivna lastnost (Protas in sod., 2011), močan selekcijski pritisk jamskega okolja pa lahko vpliva na povišano frekvenco recesivnih alelov v populaciji. Nedavno so Klaus in sod. (2013) pokazali, da so regresivne troglomorfne lastnosti pod vplivom usmerjene naravne selekcije in niso posledica nevtralnih mutacij in sproščene selekcije. Dodaten faktor, ki vpliva na frekvenco pojave redukcij, bi lahko predstavljala tudi fotofobnost svetlejših osebkov, ki se aktivno zatekajo v temno okolje jam (ali drugih temnih prostorov, kot so cevi in vodnjaki) (Janzer in Ludwig, 1952). Fotofobnost bi lahko bila preadaptacija za popolno izgubo pigmenta, saj so verjetno v teh osebkih prisotni recesivni aleli, katerih frekvenca bi se na ta način hitreje povečala in s časom fiksirala.

Degeneracija in izguba oči sta tesno povezani z izgubo pigmenta. Kvantitativni lokusi povezani z izgubo pigmenta in oči, so v isti vezavni skupini. Do degeneracije oči lahko pride na več načinov, fenotip s popolnoma reduciranimi očmi pa je vezan na en sam gen (Protas in sod., 2011). Med različnimi kombinacijami redukcije pigmenta po telesu in v očeh, ki se ujemajo s fenotipi, pridobljenimi s križanjem (Protas in sod., 2011), nismo nikoli našli močno pigmentiranega osebkov, ki bi imel svetle oči. Popolna degeneracija oči je vedno povezana s popolno izgubo pigmenta.

Visok delež osebkov v fenotipsko mešani populaciji, pri katerih smo opazili redukcije, je pri stalnem genskem pretoku s površjem možen le pod vplivom močne usmerjene naravne selekcije.

4.7 DRUGAČNO OKOLJE JE VZROK ZA DIVERGENTNO SELEKCIJO, KAJ BI LAHKO BILA REPRODUKCIJSKA BARIERA?

Diferenciacija populacij vodnega oslička se ujema z diferenciacijo okolja v katerem živijo, torej je divergentna selekcija vzrok za razhajanje. Paralelni primeri, ki kažejo popolnoma enako sliko še potrjujejo dejstvo, da je prehod v novo (enako) okolje razlog za speciacijo, torej gre za proces ekološke speciacije (Nosil, 2012).

Konvergentne lastnosti podzemeljski populacij so lahko le posledica močne naravne selekcije jamskega okolja. Morfološka primerjava dveh parov populacij, kjer je do prehoda v podzemlje prišlo neodvisno (Romunija in Pivški rokav v Sloveniji), je identificirala številne konvergentne značilnosti, ki morajo biti posledica adaptacije na skupne značilnosti okolja in selekcijski pritisk v njem (Turk-Prevorčnik in sod., 1996; Konec in sod., 2015).

Natančnejša primerjava podzemnega okolja v Romuniji in Sloveniji razkrije marsikatero razliko, glavna skupna lastnost pa je odsotnost svetlobe. To kaže, da je stalna tema glavni selekcijski pritisk v jamskem okolju (Culver in Pipan, 2012; Konec in sod., 2015).

Konvergenca je očitna predvsem pri izgubi pigmenta, saj fenotipsko mešane populacije v začetnih delih jamskih sistemov že kažejo odziv na odsotnost svetlobe. Hrane v začetnih delih ponikalnic ne primankuje, tako da pomanjkanje hrane ne more biti razlog za izgubo pigmenta. Globlje v podzemlje kot gremo, manj je na voljo organskega materiala, ki ga s seboj prinese reka. Tu bi lahko že bile v prednosti podzemeljske populacije in bi se povečala kompeticija med njimi. Neviabilnost priseljencev iz drugačnega okolja (Hendry, 2004; Nosil in sod., 2009; Tobler in sod., 2009) je lahko eden od možnih mehanizmov ekološke speciacije. Dominantnost površinskega fenotipa (Protas in sod., 2011) pa pomeni, da bi bili hibridi manj prilagojeni na podzemeljsko okolje. Na začetku speciacije so predvsem pomembni ekološki vzroki (Nosil, 2012), kot sta poleg neviabilnosti imigrantov, še različna izbira habitatov in nizek fitnes hibridov. Kasneje se lahko razvijejo še neekološki mehanizmi reproduktivne izolacije, kot sta predzigotna izolacija (različno vedenje in izbiranje partnerjev) in postzigotna izolacija, kjer pride do velikih razvojnih napak (nekompatibilnost lokusov) (Schluter, 2009; Nosil, 2012). Pri romunskih podzemeljskih in površinskih vodnih osličkih so opazili tako drugačno vedenje (kako iščejo hrano) kot fiziologijo (Mösslacher in Creuzé des Châtelliers, 1996). Pri slovenskih vodnih osličkih so vedenjski poskusi načrtovani. Križanja površinskih in podzemeljskih vodnih osličkov iz Planinskega polja in Pivškega rokava Planinske jame so bila sicer uspešna, močna zgoščenost lokusov pri povratnih križancih pa lahko nakazuje, da je med njimi že prisotna genomska inkompatibilnost in se te regije genoma v naravi zelo redko rekombinirajo (Protas in sod., 2011).

4.7.1 Ali gre za pojav paralelne speciacije?

Do križanja obeh podzemeljskih populacij v Planinski jami prihaja, sicer redko, na sotočju, kjer smo našli mešano prekopulo in nekaj osebkov mešanega izvora. V podzemni Unici pa smo nabrali več domnevnih hibridov in domnevamo, da bi tu lahko obstajala hibridna cona. Predzigotska reprodukcijska bariera med podzemeljskimi vodnimi oslički torej ni razvita. Analiza mitohondrijske DNK kaže na ločen izvor obeh populacij (Verovnik in sod., 2004). Obe sta tudi reproduktivno ločeni od predniških površinskih populacij, kar pomeni, da ustrežata kriterijem ekološke paralelne speciacije. Da to lahko preverimo v naravi, je edinstvena priložnost. Vsi primeri, kjer so testirali paralelno speciacijo, so vzeti iz prostorsko ločenih območij (npr. različnih jezer) (Rundle in sod., 2000; Langerhans in sod., 2007), tako da v naravi do parjenja med novonastalimi populacijami sploh ne more priti.

Ali bi prišlo do parjenja med podzemeljskimi populacijami iz Planinske jame in jame Obrh Čolniči ter jam severno od Planinskega polja, lahko izvemo le s poskusi v laboratoriju. Vse

so neodvisno prešle v podzemlje iz lokalne površinske populacije in se prilagodile na enako okolje. Glede na majhno razdaljo med jamami ekološki pogoji med njimi ne morejo biti tako različni, da bi onemogočili preživetje druge podzemeljske populacije. Tega pa ne moremo trditi za romunsko podzemeljsko populacijo, ki se je prilagodila še na življenje v termalni sulfidni vodi. Mösslacher in Creuzé des Châtelliers (1996) sta žive osebkke iz jame Movile uspešno transportirala na Dunaj, kjer so izvedli fiziološke in vedenjske poskuse. Navedli so, da so jih hranili v navadni sladki vodi, torej lahko preživijo v vodi, ki nima enakih kemijskih lastnosti kot voda v njihovem domačem okolju. Vprašanje je, ali bi podzemeljski vodni oslički iz Slovenije lahko preživeli v toksični termalni vodi. Poskusi na mehiških molijih (*Poecilla mexicana*) kažejo, da je sulfidnost vode eden glavnih dejavnikov pri strukturiranosti populacij, ki živijo v sladki in sulfidni vodi (Tobler in sod., 2011, Plath in sod., 2013). Ker površinskih osebkov v Romuniji nikoli niso našli v sulfidni vodi, je tudi tu kemijska sestava vode pomemben dejavnik in najverjetneje toksična za ostale podzemeljske vodne osličke.

4.7.2 Paralelna speciacija znotraj ene populacije?

Pri podzemeljskem vodnem osličku v Romuniji smo našli sledi večkratne vselitve v podzemlje (mitohondrijska DNK) in popolno enotnost populacije (mikrosateliti). Enako situacijo so opisali Strecker in sod. (2012) na primeru jamske ribe *Astyanax* v Mehiki. To bi si lahko zamislili kot idealen test paralelne speciacije v naravi (Schluter 1995; Rundle in sod., 2000), vendar imamo opravka samo z eno populacijo. Zaradi tega se ne zdi smiselno, da populacijo, ki ima za seboj dinamično zgodovino stika s predniško populacijo, opisujemo kot primer paralelne speciacije. Kljub temu takih primerov v naravi ni veliko, nam pa lahko veliko povedo o postopnosti prilagajanja na novo okolje in stabilnosti delne reprodukcijske izolacije ter o tem, kateri dejavniki vplivajo na dokončno ločitev vrst (Nosil, 2012).

4.8 VPRAŠANJE STATUSA VRST IN ENOT VARSTVENEGA UPRAVLJANJA

Genetska diferenciacija, predvsem grupiranje genotipov, med podzemeljskimi in površinskimi populacijami je tako izrazito, da kaže na prekinjen genski pretok v naravi, kar pomeni, da so lahko te populacije obravnavamo kot ločene vrste tudi po biološkemu konceptu. Tudi v sistemu kraške Ljubljance je genetska diferenciranost podzemeljskih in površinskih vodnih osličkov kljub para- in simpatričnemu pojavljanju tako velika, da bi ju morali ločiti kot samostojni vrsti. To pomeni, da v Evropi živijo najmanj tri podzemeljske vrste vodnih osličkov, dve od njih na severnem Dinarskem krasu.

V sistemu kraške Ljubljance imamo opravka z več genetsko močno strukturiranimi skupinami vodnih osličkov. Med populacijama iz obeh rokavov Planinske jame je prisotnih veliko genetskih in morfoloških razlik, ki se ohranjajo kljub dejstvu, da deloma živijo sintono. Ločeni populaciji ustrezata filogenetskemu konceptu vrste. Odkritje potencialne

hibridne cone v kratkem delu podzemne Unice kaže, da med njima lahko prihaja do parjenja. Ali ustrežata biološkemu konceptu vrste, pa je odvisno od viabilnosti hibridov. Trenutno obe pripadata podvrsti *Asellus aquaticus cavernicolus* (Racovitza 1925), tipška lokaliteta pa je nesrečno ravno v Črni jami, kjer danes prevladuje druga podvrsta. Populacijo iz Zelških jam lahko vključimo v populacijo iz Rakovega rokava, seveda pa se zavedamo, da med njima obstaja določena genetska strukturiranost. Za določitev taksonomskega statusa populacij severno od Planinskega polja so potrebne še analize morfologije, da bi določili, ali morda vseeno pripadajo h podzemeljskim vodnim osličkom iz Pivškega rokava, definitivno pa so jamski kot samostojna vrsta ločeni od površinskih. Za opis podzemeljskega vodnega oslička, ki naseljuje jamo Obrh Čolnici je potrebno narediti še natančnejšo morfološko analizo. Ne glede na taksonomski status podzemeljskih vodnih osličkov pa si edinstvena situacija (večkratni neodvisni prehod v podzemlje, močna genetska strukturiranost, potencialna hibridna cona) skozi prizmo evolucionarne biologije zasluži našo pozornost in prizadevanje za ohranitev pestrosti podzemeljskih populacij vodnega oslička.

V naravovarstvu je enota varstvenega upravljanja tradicionalno vrsta, a v zadnjem času dobiva večji pomen tudi filogenetska diverziteteta (Winter in sod., 2013). Naša analiza je pokazala, da majhno območje naseljuje endemna vrsta podzemeljskih vodnih osličkov. Vredno pa bi bilo upoštevati strukturiranost populacij, ne glede na njihov taksonomski status. Onesnaženost rek je za podzemeljske vodne osličke morda lahko problematična (ozko grlo v Pivškem rokavu), zato bi z varovanjem visoke genetske pestrosti zagotovili ne samo ohranjanje visoke biodiverzitete slovenskega kraškega podzemlja, pač pa tudi čisto pitno vodo za ljudi.

5 POVZETEK (SUMMARY)

5.1 POVZETEK

Uspešno smo razvili nabor 25 mikrosatelitskih lokusov, ki so na voljo za genetske raziskave podzemeljskih vodnih osličkov. Pri površinskih vodnih osličkih lahko uporabimo le manjši nabor lokusov (16 ali 13), saj ne pride do vezave začetnih oligonukleotidov.

V sistemu kraške Ljubljanice so populacije površinskih in podzemeljskih vodnih osličkov genetsko popolnoma diferencirane. Fenotipsko mešane populacije, ki smo jih našli v začetnih delih jam, kjer reka ponikne, so del površinske populacije. Genski pretok med površinskimi in fenotipsko mešanimi populacijami ni okrnjen. Površinske živali aktivno migrirajo v jamo in ven. Popolnoma troglomorfnih osebkov, ki smo jih nabrali v fenotipsko mešani populaciji, so prispeli iz sosednje podzemeljske populacije. Med površinskimi in podzemeljskimi vodnimi oslički mora v naravi obstajati reproduktivna bariera, in lahko trdimo, da pripadata ločenim vrstam. Enako velja tudi za par sosednjih si populacij podzemeljskih in površinskih vodnih osličkov iz Romunije.

Pojav redukcij pigmenta v fenotipsko mešanih populacijah kaže na močan vpliv naravne selekcije v jamah, saj kljub neprekinjenemu genskemu pretoku prihaja do konvergentne izgube pigmenta. Analiza mitohondrijske DNK je pokazala, da so vodni oslički v različnih delih Evrope, kot tudi znotraj sistema kraške Ljubljanice, v podzemlje prešli neodvisno. Pojav konvergentnih lastnosti (Konec in sod., 2015) je najverjetneje odraz skupnih značilnosti podzemnega okolja. Najbolj očitna skupna lastnost obeh jamskih sistemov, pa je odsotnost svetlobe.

Proces v ozadju nastanka novih vrst podzemeljskih vodnih osličkov je ekološka speciacija. Edinstvena hidrološka situacija v Planinski jami omogoča, da se dve neodvisno nastali populaciji podzemeljskih vodnih osličkov, ki sta med seboj sicer genetsko in morfološko jasno diferencirani, spet srečata. Odkritje domnevnih križancev in morebitne hibridne cone zadostita vsem pogojem paralelne ekološke speciacije.

Podzemeljski vodni oslički so močno genetsko strukturirani. Strukturiranost populacij se ujema s prostorsko komponento, med seboj jih ločuje površje, preko katerega ne migrirajo. Genetska pestrost je pri nekaterih populacijah precej visoka (celo višja kot pri površinskih), ponekod nižja, pri populaciji iz Pivškega rokava pa so vidne sledi ozkega grla. Onesnaženje rek tako lahko postane problem, ki ogroža populacije, ki naseljujejo majhno območje.

5.2 SUMMARY

We developed a set of 25 microsatellite loci that can be used for genetic analysis of subterranean *Asellus aquaticus*. In surface *Asellus aquaticus* only a smaller set of loci (16 or 13) amplifies successfully.

In the Ljubljanica River system populations of surface and subterranean *Asellus aquaticus* are genetically completely differentiated. In the beginning of the underground river flow we found phenotypically mixed populations. Genetically they are part of adjacent surface population with present ongoing gene flow. Individuals from surface actively migrate in and out of caves. Troglomorphic individuals collected in phenotypically mixed population are first generation migrants from adjacent subterranean populations. Surface and subterranean populations are separated by a reproductive barrier and therefore two separate species. The same is true for the adjacent subterranean and surface population in Romania.

Pigment reductions in phenotypically mixed populations point to strong selection pressure in cave environment, because pigment loss is present despite ongoing gene flow. Analysis of mitochondrial DNA showed independent colonization events of subterranean habitats in different parts of Europe, as well as in the same river system. The presence of convergent traits (Konec et al., 2015) must have resulted from adaptation to the environmental conditions common to all caves. The most obvious common ecological condition is the absence of light.

The process behind the formation of new subterranean species of *Asellus aquaticus* is ecological speciation. A unique hydrological setting in Planina cave enables two independently evolved subterranean populations, which differ genetically as well as morphologically, to come in contact. The discovery of few putative hybrids and a potential hybrid zone satisfies all requirements for parallel ecological speciation.

Subterranean populations of *Asellus aquaticus* are genetically highly structured. Population structure reflects the boundary between surface and subterranean environment that the animals mostly do not cross. Genetic diversity in some population is relatively high (even higher than in surface populations) and in others low. In the population from the Pivka channel there are signs of a past bottleneck event. Pollution can be a huge problem that threatens populations inhabiting this very fragmented habitat.

6 VIRI

- Aljančič G., Năpăruș M. 2012. Stygobionts washed out to surface: a case of *Proteus anguinus*. V: 21st International Conference on Subterranean Biology, 2.-7. September, 2012, Košice, Slovaška. Kováč L., Uhrin M., Mock A., Ľuptáčik P. (ur.). Košice, Pavol Šafárik University in Košice: 22–23
- Arendt J., Reznick D. 2008. Convergence and parallelism reconsidered: what have we learned about the genetics of adaptation? *Trends in Ecology and Evolution*, 23: 26–32
- Avise J.C. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Cambridge, Massachusetts, Harvard University Press: 464 str.
- Balloux F., Lugon-Moulin N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 11: 155–65
- Bandelj D., Jakše J., Javornik B. 2004. Amplification of fluorescent-labelled microsatellite markers in olives by a novel, economic method. *Acta Agriculturae Slovenica*, 83: 323–329
- Bandelt H.J., Forster P., Rohl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 37–48
- Barluenga M., Stölting K.N., Salzburger W., Muschick M., Meyer A. 2006. Sympatric speciation in Nicaraguan crater lake cichlid fish. *Nature*, 439: 719–723
- Beaumont M.A., Nichols R.A. 1996. Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. *Proceedings of Royal Society London B*, 263: 1619–1626
- Beaumont M., Barratt E.M., Gottelli D., Kitchener A.C., Daniels M.J., Pritchard J.K., Bruford M.W. 2001. Genetic diversity and introgression in the Scottish wildcat. *Molecular Ecology*, 10: 319–336
- Beebee T., Rowe G. 2008. *An introduction to molecular ecology*. New York, Oxford University press: 384 str.
- Bloor M.C. 2010. Animal standardisation for mixed species ecotoxicological studies: Establishing a laboratory breeding programme for *Gammarus pulex* and *Asellus aquaticus*. *Zoologica Baetica*, 21: 179–190
- Borghenzan R., Cordeiro-Borghezán L.M., Trajano E. 2012. Population data on two syntopic troglobitic catfishes from Fidas cave system, Bodoquena karst area, southwestern Brazil. V: 21st International Conference on Subterranean Biology, 2.-7. September, 2012, Košice, Slovaška. Kováč L., Uhrin M., Mock A., Ľuptáčik P. (ur.). Košice, Pavol Šafárik University in Košice: 30
- Borowsky R.L., Vidthayanon C. 2001. Nucleotide diversity in populations of balitorid cave fishes from Thailand. *Molecular Ecology*, 10: 2799–2805
- Bradic M., Beerli P., Garcia-de Leon F.J., Esquivel-Bobadilla S., Borowsky R.L. 2012. Gene flow and population structure in the Mexican blind cavefish complex *Astyanax mexicanus*. *BMC Evolutionary Biology*, 12, doi:10.1186/1471-2148-12-9: 17 str.
- Caccone A., Sbordoni V. 1987. Molecular evolutionary divergence among North American cave crickets. I. allozyme variation. *Evolution*, 41: 1198–1214

- Cailliez F. 1983. The analytical solution of the additive constant problem. *Psychometrika*, 48: 305–310
- Carlini D.B., Manning J., Sullivan P.G., Fong D.W. 2009. Molecular genetic variation and population structure in morphologically differentiated cave and surface populations of the freshwater amphipod *Gammarus minus*. *Molecular Ecology*, 18: 1932–1945
- Cesaroni D., Allegrucci G., Sbordoni V. 1992. A narrow hybrid zone between two crayfish species from a Mexican cave. *Journal of Evolutionary Biology*, 5: 643–659
- Chistiakov D., Hellems B., Volckaert F.A.M. 2006. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*, 255: 1–29
- Christiansen K. 2012. Morphological adaptations. V: *Encyclopedia of Caves*, 2nd ed. Culver D. C., White W. B. (eds). Amsterdam, Elsevier Academic Press: 517–528
- Cobolli-Sbordoni M., Mattoccia M., La Rosa G., De Matthaes E., Sbordoni V. 1990. Secondary sympatric occurrence of sibling species of subterranean shrimps in the Karst. *International Journal of Speleology*, 19: 9–27
- Culver D.C. 1982. *Cave Life*. London, Harvard University Press: 200 str.
- Culver D.C., Kane T.C., Fong D.W. 1995. *Adaptation and Natural Selection in Caves: The Evolution of Gammarus minus*. London, Harvard University Press: 240 str.
- Culver D.C., Sket B. 2000. Hotspots of subterranean biodiversity in caves and wells. *Journal of Cave and Karst Studies*, 62: 11–17
- Darwin C. 1859. *On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle of life*. London, John Murray: 282 str.
- De Fonzo V., Alluffi-Pentini F., Parisi V. 2008. JSTRING: A novel Java nandem repeats searcher in genomic sequences with a an interactive graphic output. *The Open Applied Informatics Journal*, 2: 14–17
- Dhuyvetter H., Hendrickx F., Gaublomme E., Desender K. 2007. Differentiation between two salt marsh beetle ecotypes: evidence for ongoing speciation. *Evolution*, 61: 184–193
- Dray S., Dufour A.B. 2007. The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software*. 224: 1–20
- Drummond A.J., Ho S., Phillips M.J., Rambaut A. 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology*, 6, doi: 10.1371/journal.pbio.0040088: 12 str.
- Drummond A.J., Rambaut A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7, doi:10.1186/1471-2148-7-214: 8 str.
- Duchesne P., Turgon J. FLOCK provides reliable solutions to the number of populations problem. *Journal of Heredity*, 103: 734–743
- Earl D.A., vonHoldt B.M. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4: 359–361

- Elmer K.R., Meyer A. 2011. Adaptation in the age of ecological genomics: insights from parallelism and convergence. *Trends in Ecology and Evolution*, 26: 298–306
- Engel A.S. 2007. Observations on the biodiversity of sulfidic karst habitats. *Journal of Cave and Karst Studies*, 69: 187–206
- Eroukhmanoff F., Hargeby A., Arnberg N.N., Hellgren O., Bensch S., Svensson E.I. 2009. Parallelism and historical contingency during rapid ecotype divergence in an isopod. *Journal of Evolutionary Biology*, 22: 1098–1110
- Eroukhmanoff F., Svensson E.I. 2009. Contemporary parallel diversification, antipredator adaptations and phenotypic integration in an aquatic isopod. *PLoS ONE*, 4, doi: 10.1371/journal.pone.0006173: 11 str.
- Eroukhmanoff F., Hargeby A., Svensson E.I. 2011. The role of different reproductive barriers during phenotypic divergence of isopod ecotypes. *Evolution*, 65: 2631–2640
- Espinasa L., Borowsky R.L. 2000. Eyed cave fish in a karst window. *Journal of Cave and Karst Studies*, 623: 180–183
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611–2620
- Excoffier L., Estoup A., Cornuet J.M. 2005. Bayesian analysis of an admixture model with mutations and arbitrarily linked markers. *Genetics*, 169:1727–1738
- Excoffier L., Lischer H.E.L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10: 564–567
- Fišer C., Sket B., Trontelj P. 2008. A phylogenetic perspective on 160 years of troubled taxonomy of *Niphargus* Crustacea: Amphipoda. *Zoologica Scripta*, 37: 665–680
- Fišer C., Blejcek A., Trontelj P. 2012. Niche-based mechanisms operating within extreme habitats: a case study of subterranean amphipod communities. *Biology Letters*, 8: 578–581
- Fišer C., Blejcek A., Trontelj P. 2012. Cave amphipods as Antillean lizards: *Niphargus* ecomorph classes expose a new aspect of morphological diversity in caves. V: 21st International Conference on Subterranean Biology, 2.-7. September, 2012, Košice, Slovaška. Kováč L., Uhrin M., Mock A., Ľuptáček P. (ur.). Košice, Pavol Šafárik University in Košice: 47
- Flot J.F., Wörheide G., Dattagupta S. 2010. Unsuspected diversity of *Niphargus* amphipods in the chemoautotrophic cave ecosystem of Frasassi, central Italy. *BMC Evolutionary Biology*, 10, doi:10.1186/1471-2148-10-171: 13 str.
- Fogelqvist J., Niittyvuopio A., Gren J.A., Savolainen O., Lascoux M. 2010. Cryptic population genetic structure: the number of inferred clusters depends on sample size. *Molecular Ecology Resources*, 10: 314–323
- Fong W.D. 2012. *Gammarus minus*: a model system for the study of adaptation to the cave environment. V: *Encyclopedia of Caves*, 2nd ed. Culver D. C., White W. B. (eds). Elsevier Academic Press, Amsterdam: 341–348

- Freeland J.R. 2005. *Molecular Ecology*. Chichester, John Wiley & Sons: 403 str.
- Funk D., Nosil P., Etges W.J. 2006. Ecological divergence exhibits consistently positive associations with reproductive isolation across disparate taxa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 3209–3213
- Gabrovšek F., Kogovšek J., Kovačič G., Petrič M., Ravbar N., Turk J. 2010. Recent results of tracer tests in the catchment of the Unica river SW Slovenia. *Acta Carsologica*, 39: 27–37
- Gams I. 2004. *Kras v Sloveniji v prostoru in času*. Ljubljana, Založba ZRC: 518 str.
- Garza J.C., Williamson E.G. 2001. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology*, 10: 305–318
- Glaubitz J.C. 2004. Convert: a user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Molecular Ecology Notes*, 4: 309–310
- Goudet J. 2002. FSTAT, Version 2.9.3.2. Lausanne, Institute for Ecology, University of Lausanne. Available at:
<http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>
- Grant P.R., Grant B.R. 2002. Unpredictable evolution in a 30-year study of Darwin's finches. *Science*, 296: 707–711
- Gross J.B., Furterer A., Carlson B.M., Stahl B.A. 2013. An integrated transcriptome-wide analysis of cave and surface dwelling *Astyanax mexicanus*. *PLoS ONE* 8, doi: 10.1371/journal.pone.0055659: 14 str.
- Guichoux E., Lagache L., Wagner S., Chaumeil P., Leger P., Lepais O., Lepoittevin C., Malausa T., Revardel E., Salin F., Petit R.J. 2011. Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources*, 11: 591–611
- Hargeby A., Johansson J., Ahnesjö J. 2004. Habitat-specific pigmentation in a freshwater isopod: adaptive evolution over a small spatiotemporal scale. *Evolution*, 58: 81–94
- Hausdorf B., Wilkens H., Strecker U. 2011. Population genetic patterns revealed by microsatellite data challenge the mitochondrial DNA based taxonomy of *Astyanax* in Mexico Characidae, Teleostei. *Molecular Phylogenetics and eEvolution*, 60: 89–97
- Hendry A.P. 2004. Selection against migrants contributes to the rapid evolution of ecologically dependent reproductive isolation. *Evolutionary Ecology Research*, 6: 1219–1236
- Hendry A.P., Nosil P., Rieseberg L.H. 2007. The speed of ecological speciation. *Functional Ecology*, 21: 455–464
- Howarth F.G. 1987. Evolutionary ecology of aeolian and subterranean habitats in Hawaii. *Current Biology*, 18: 295–396
- Holm S. 1979. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics*, 6: 65–70
- Holsinger J.R. 2000. Ecological derivation, colonization and speciation. V: *Subterranean Ecosystems*. Wilkens H, Culver D, Humphreys W. (eds.). Elsevier, Amsterdam: 399–415

- Hubisz M.J., Falush D., Stephens M., Pritchard J.K. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*, 9: 1322–1332
- Huelsenbeck J.P., Ronquist F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, 17: 754–755
- Janzer W., Ludwig W. 1952. Versuche zur evolutorischen Entstehung der Hohlentiermerkmale. *Zeitschrift Inductive Abstammung Vererbungslehre*, 84: 462–479
- Johannesson K. 2001. Parallel speciation: a key to sympatric divergence. *Trends in Ecology and Evolution*, 16: 148–153
- Johannesson K., Panova M., Kemppainen P., André C., Rolan-Alvarez E., Butlin R.K. 2010. Repeated evolution of reproductive isolation in a marine snail: unveiling mechanisms of speciation. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 365: 1735–1747
- Jombart, T. 2008. ADEGENET: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24: 1403–1405
- Jombart T., Ahmed I. 2011. ADEGENET 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics*, 27: 3070–3071
- Jones R., Culver D.C., Kane T.C. 1992. Are parallel morphologies of cave organisms the result of similar selection pressures? *Evolution*, 46: 353–365
- Juan C., Guzik M.T., Jaume D., Cooper S.J.B. 2010. Evolution in caves: Darwin's 'wrecks of ancient life' in the molecular era. *Molecular Ecology*, 19: 3865–3880
- Kaeuffer R., Peichel C.L., Bolnick D.I., Hendry A.P. 2012. Parallel and nonparallel aspects of ecological, phenotypic and genetic divergence across replicate population pairs of lake and stream stickleback. *Evolution*, 66: 402–418
- Kelley J.L., Passow C.N., Plath M., Rodriguez L.A., Yee M.C., Tobler M. 2012. Genomic resources for a model in adaptation and speciation research: characterization of the *Poecilia mexicana* transcriptome. *BMC Genomics*, 13, doi:10.1186/1471-2164-13-652: 13 str.
- Ketmaier V., Argano R., Caccone A. 2003. Phylogeography and molecular rates of subterranean aquatic Stenasellid Isopods with a peri-Tyrrhenian distribution. *Molecular Ecology*, 12: 547–555
- Kirchman J.J. 2009. Genetic tests of rapid parallel speciation in flightless birds from extant volant ancestor. *Biological Journal of Linnean Society*, 96: 601–616
- Klaus S., Mendoza J.C.E., Liew J.H., Plath M., Meier R., Yeo D.C.J. 2013. Rapid evolution of troglomorphic characters suggests selection rather than neutral mutation as a driver of eye reduction in cave crabs. *Biology letters*, 9: 5 str.
- Konec M., Prevorčnik S., Sarbu S., Verovnik R., Trontelj P. 2015. Parallels between two geographically and ecologically disparate cave invasions by the same species, *Asellus aquaticus* (Isopoda, Crustacea). *Journal of Evolutionary Biology*, doi:10.1111/jeb.12610, 12 str.

- Kosswig C., Kosswig L. 1940. Die Variabilität bei *Asellus aquaticus*, unter besonderer Berücksichtigung der Variabilität in isolierten unter- und oberirdischen Populationen. *Revue de Facultie des Sciences Istanbul*, B5: 1–55
- Krukenhauser L., Haring E., Seemann R., Sattmann H. 2011. Genetic differentiation between cave and surface-dwelling populations of *Garra barreimiae* (Cyprinidae) in Oman. *BMC Evolutionary Biology*, 11, doi:10.1186/1471-2148-11-172: 15 str.
- Langerhans R.B., Dewitt T.J. 2004. Shared and unique features of evolutionary diversification. *The American Naturalist*, 164: 335–349
- Langerhans, R., Knouft, J.H. & Losos, J.B. 2006. Shared and unique features of diversification in greater Antillean Anolis ecomorphs. *Evolution* 60: 362–369
- Langerhans R.B., Gifford M.E., Joseph E.O. 2007. Ecological speciation in *Gambusia* fishes. *Evolution*, 61: 2056–2074
- Langerhans R.B., Riesch R. 2013. Speciation by selection: a framework for understanding ecology's role in speciation. *Current Zoology*, 59: 31–52
- Lascu C., Popa R., Sarbu S.M. 1995. Le karst de Movile (Dobrogea de Sud) (II). *Revue Roumaine de Geografie*, 39: 31–40
- Lasnik K. 2012. Morfološka raznolikost jamskega vodnega oslička v Planinski jami. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo. 44 str.
- Lefébure T., Douady C.J., Gouy M., Trontelj P., Briolay J., Gibert J. 2006. Phylogeography of a subterranean amphipod reveals cryptic diversity and dynamic evolution in extreme environments. *Molecular Ecology*, 15: 1797–1806
- Librado P., Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451–1452
- Losos J.B., Jackman T.R., Larson A., de Queiroz K., Rodríguez-Schettino L. 1998. Contingency and determinism in replicated adaptive radiations of island lizards. *Science*, 279: 2115–2118
- Luikart G., Allendorf F.W., Cornuet J.M., Sherwin W.B. 1997. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *Journal of Heredity*, 89: 238–247
- Lukančič S., Žibrat U., Mezek T., Jerebic A., Simčič T., Brancelj A. 2010. Effects of exposing two non-target Crustacean species, *Asellus aquaticus* L., and *Gammarus fossarum* Koch., to Atrazine and Imidacloprid. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 84: 85–90
- Macdonald III K.S., Yampolsky L., Duffy J.E. 2005. Molecular and morphological evolution of the amphipod radiation of Lake Baikal. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 35: 323–343
- Manel S., Gaggiotti O.E., Waples R.S. 2005. Assignment methods: matching biological questions with appropriate techniques. *Trends in Ecology and Evolution*, 20: 136–142

- Mckinnon J.S. , Mori S., Blackman B.K., David L., Kingsley D.M., Jamieson L., Chou J., Schluter D. 2004. Evidence for ecology's role in speciation. *Nature*, 429: 294–298
- Megléc 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: 403–404
- Megléc E., Nève G., Biffin E., Gardner M.G. 2012. Breakdown of phylogenetic signal: a survey of microsatellite densities in 454 shotgun sequences from 154 non model eukaryote species. *PLoS ONE*, 7, doi: 10.1371/journal.pone.0040861: 15 str.
- Meirmans P.G., Hedrick P.W. 2011. Assessing population structure: F_{ST} and related measures. *Molecular Ecology Resources*, 11: 5–18
- Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium, Austin J. D., Bertin A., Bórquez J. P., Cárdenas L., Cardoza T. B., Chapman F., De Sousa A. C. B., De Souza A. P., Douglas K. C., Ellwood S. R., Ferriol M., Garmendia A., Gouin N., Hargrove J., Jasti M., Keränen I., Knott K. E., Konec M., Kuitunen K., Lima M. P., Linde C. C., Merle H., Oliva M. E., Pérez M., Saarinen E., Samollow P. B., Scarpassa V. M., Segura I., Smith L., Trontelj P., Valdivia I. M., Wallwork H., Wellenreuther M. 2011. Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 February 2011–31 March 2011. *Molecular Ecology Resources*, 11: 757–758
- Mösslacher F., Creuzé des Châtelliers M. 1996. Physiological and behavioral adaptations of an epigeal and hypogean dwelling population of *Asellus aquaticus* L. Crustacea, Isopoda. *Archiv für Hydrobiologie*, 138: 187–198.
- Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York, Columbia University Press: 512 str.
- Nosil P., Sandoval C.P. 2008. Ecological niche dimensionality and the evolutionary diversification of stick insects. *PLoS ONE*, 3, doi: 10.1371/journal.pone.0001907: 11 str.
- Nosil P., Harmon L.J., Seehausen O. 2009. Ecological explanations for incomplete speciation. *Trends in Ecology and Evolution*, 24: 145–156
- Nosil P. 2012. *Ecological speciation*. Oxford Series in Ecology and Evolution, New York, Oxford University Press: 280 str.
- Palandačić A., Matschiner M., Zupančič P., Snoj A. 2012. Fish migrate underground: the example of *Delminichthys adspersus* Cyprinidae. *Molecular Ecology*, 21: 1658–1671
- Palmer A.N., 1991. Origin and morphology of limestone caves. *Geological Society of America Bulletin*, 103: 1–21
- Parisi V., De Fonzo V., Allufi-Pentini F. 2003. STRING: finding tandem repeats in DNA sequences. *Bioinformatics*, 19: 1733–1738
- Petkau D., Calvert W., Sterling I., Strobeck C. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology*, 4: 347–354

- Paetkau D., Slade R., Burden M., Estoup A. 2004. Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Molecular Ecology*, 13: 55–65
- Pipan T., Culver D.C. 2012. Convergence and divergence in the subterranean realm: a reassessment. *Biological Journal of the Linnean Society*, 107: 1–14
- Piry S., Luikart G., Cornuet J.M. 1999. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity*, 86: 502–503
- Piry S., Alapetite A., Cornuet J.M., Peatkau D., Baudouin L., Estoup A. 2004. GeneClass2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity*, 95: 536–539
- Plath M., Hauswaldt J.S., Moll K., Tobler M., García de León F.J., Schlupp I., Tiedemann R. 2007. Local adaptation and pronounced genetic differentiation in an extremophile fish, *Poecilia mexicana*, inhabiting a Mexican cave with toxic hydrogen sulphide. *Molecular Ecology*, 16: 967–976.
- Plath M., Hermann B., Schröder C., Riesch R., Tobler M., García de León F.J., Schlupp I., Tiedemann R. 2010. Locally adapted fish populations maintain small-scale genetic differentiation despite perturbation by a catastrophic flood event. *BMC Evolutionary Biology*, 10, doi:10.1186/1471-2148-10-256: 19 str.
- Plath M., Pfenninger M., Lerp H., Riesch R., Eschenbrenner C., Slattery P.A., Bierbach D., Herrmann N., Schulte M., Arias-Rodríguez L., Rimber Indy J., Passow C., Tobler M. 2013. Genetic differentiation and selection against migrants in evolutionarily replicated extreme environments. *Evolution*, 67: 2647–2661
- Porter M. 2007. Subterranean biogeography: what have we learned from molecular techniques? *Journal of Cave and Karst Studies*, 69: 179–186
- Posada D., Crandall K. 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology and Evolution*, 16: 37–45
- Posada D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25: 1253–1256
- Poulson T.L., White W.B. 1969. The cave environment. *Science*, 165: 971–981
- Prelovšek M., Kržič M. 2012. Čolnici – jama podzemnega Cemuna. Predavanje v okviru Društva za raziskovanje jam Slovenija. 8.11.2011. Ljubljana
- Prevorčnik S., Blejec A., Sket B. 2004. Racial differentiation in *Asellus aquaticus* L. Crustacea: Isopoda: Asellidae. *Archiv für Hydrobiologie*, 160: 193–214
- Prevorčnik S., Jugovic J., Sket B. 2009. Geography of morphological differentiation in *Asellus aquaticus* Crustacea: Isopoda: Asellidae. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 47: 124–131
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945–959
- Pritchard J.K., Wen X., Falush D. 2010. Documentation for structure software: Version 2.3, 38 str.

- Protas M.E., Trontelj P., Patel N.H. 2011. Genetic basis of eye and pigment loss in the cave crustacean, *Asellus aquaticus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 14: 5702–5707
- Protas M., Jeffery W.R. 2012. Evolution and development in cave animals: from fish to crustaceans. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 1: 6
- Racovitza E.G. 1925. Notes sur les Isopodes: morphologie at phylogenie des Antennes II. Le fouet. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale*, 63: 533–622
- Rambaut A., Drummond A.J. 2007. Tracer v1.4, Available:
<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Rannala B., Mountain J.L. 1997. Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94: 9197–9221
- Ravbar N., Petrič M., Kogovšek J. 2010. The characteristics of groundwater flow in Karst aquifers during long lasting low flow conditions, example from SW Slovenia. V: *Advances in Research in Karst Media*. Andreo B., Carrasco F., Durán J.J., LaMoreaux J.W. (eds). Berlin, Springer: 131–136
- Richmond J.Q., Reeder T.W. 2002. Evidence for parallel ecological speciation in Scincid lizards of the *Eumeces Skiltonianus* species group Squamata: Scincidae. *Evolution*, 56: 1498–1513
- Riesch R., Plath M., Schlupp I. 2011. Speciation in caves: experimental evidence that permanent darkness promotes reproductive isolation. *Biology letters*, 7: 909–912
- Riess W., Giere O., Kohls O., Sarbu S.M. 1999. Anoxic thermomineral cave waters and bacterial mats as habitat for freshwater nematodes. *Aquatic Microbial Ecology*, 18: 157–164
- Rivera M.A.J., Howarth F.G., Taiti S., Roderick G.K. 2002. Evolution in Hawaiian cave-adapted isopods Oniscidea: Philosciidae: vicariant speciation or adaptive shifts? *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 25: 1–9
- Rodríguez-Ramilo S.T., Toro M.A., Fernández J. 2009. Assessing population genetic structure via the maximisation of genetic distance. *Genetics, Selection, Evolution*, 41: 49
- Ronquist F., Teslenko M., Van Der Mark P., Ayres D.L., Darling A., Höhna S., Larget B., Liu L., Suchard M.A., Huelsenbeck J.P. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology*, 61: 539–542
- Rosenberg N.A., Burke T., Elo K., Feldman M.W., Fredlin P.J., Groenen M.A.M., Hillel J., Maki-Tanila A., Tixier-Boichard M., Vignal A. 2001. Empirical evaluation of genetic clustering methods using multilocus genotypes from 20 chicken breeds. *Genetics*, 159: 699–713
- Rosenblum E.B., Harmon L.J. 2010. "Same same but different": replicated ecological speciation at white sands. *Evolution*, 65: 946–960

- Rundle H.D., Nagel L., Boughman J.W., Schluter D. 2000. Natural selection and parallel speciation in sympatric sticklebacks. *Science*, 278: 306–307
- Rundle H.D., Nosil P. 2005. Ecological speciation. *Ecology Letters*, 8: 336–352
- Sala-Bozano M., Ketmaier V., Mariani S. 2009. Contrasting signals from multiple markers illuminate population connectivity in a marine fish. *Molecular Ecology*, 18: 4811–4826
- Sarbu S. 2000. Mobile cave: a chemoautotrophically based groundwater ecosystem. V: *Subterranean Ecosystems*. Wilkens H., Culver D., Humphreys W. (eds.). Amsterdam, Elsevier: 319–344
- Sarbu S., Popa R., Konkle B.K. 1996. A chemoautotrophically based ecosystem. *Science*, 271: 1953–1955
- Sbordoni V., Allegrucci G., Cesaroni D. 2000. Population genetic structure, speciation and evolutionary rates in cave-dwelling organisms. V: *Subterranean Ecosystems*. Wilkens H., Culver D., Humphreys W., (eds.). Amsterdam, Elsevier: 453–477
- Schilthuizen M., Cabanban A. S., Haase M. 2005. Possible speciation with gene flow in tropical cave snails. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 43: 133–138
- Schluter D., Nagel L. 1995. Parallel speciation by natural selection. *The American Naturalist*, 146: 292–301
- Schluter D. 2001. Ecology and the origin of species. *Trends in Ecology and Evolution*, 16: 372–380
- Schluter D. 2009. Evidence for ecological speciation and its alternative. *Science*, 323: 737–41
- Schluter D., Conte G.L. 2009. Genetics and ecological speciation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 9955–9962
- Schuelke M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18: 233–234
- Seehausen O. 2006. African cichlid fish: a model system in adaptive radiation research. *Proceedings of The Royal Society Biological sciences*, 273: 1987-1998
- Seehausen O. 2007. Chance, historical contingency and ecological determinism jointly determine the rate of adaptive radiation. *Heredity*, 99: 361–363
- Seehausen O., Takimoto G., Roy D., Jokela, J. 2008. Speciation reversal and biodiversity dynamics with hybridization in changing environments. *Molecular Ecology*, 17: 30–44
- Selkoe K.A., Toonen R.J. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9: 615–629
- Sket B. 1965. Taxonimische Problematik der Art *Asellus aquaticus* L.. *Rac. Ect. Razprave-Dissertationes Slovenske akademije znanosti in umetnosti*, CL. IV, 8: 177–221

- Sket B., Velkovich F. 1981. Phreatische Fauna in Ljubljansko polje Ljubljana-Ebene, Jugoslavien – ihre ökologische Verteilung und zoogeographische Beziehungen. *International Journal of Speleology*, 11: 105–121
- Sket B. 1994. Distribution of *Asellus aquaticus* and its hypogean populations at different geographic scales, with a note on *Proasellus istrianus*. *Hydrobiologia*, 278: 39–47
- Sket B. 1997. Distribution of *Proteus* Amphibia: Urodela: Proteidae and its possible explanation. *Journal of Biogeography*, 24: 263–280
- Skrbinšek T., Potočnik H., Kos I., Trontelj P., 2007. Varstvena genetika medveda. Končno poročilo projekta »Varstvena genetika medveda, risa in jelenjadi v Sloveniji«, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 49 str.
- Sobell J.M., Chen G.F., Watt L.R., Schemske D.W. 2009. The biology of speciation. *Evolution*, 64: 295–315
- Stepišnik U., Ferk M., Gostinčar P., Černuta L. 2012. Holocene high floods on the Planina polje, classical dinaric karst, Slovenia. *Acta Carsologica*, 41: 5–13
- Strecker U., Bernatchez L., Wilkens H. 2003. Genetic divergence between cave and surface populations of *Astyanax* in Mexico Characidae, Teleostei. *Molecular Ecology*, 12: 699–710
- Strecker U., Hausdorf B., Wilkens H. 2012. Parallel speciation in *Astyanax* cave fish Teleostei in Northern Mexico. *Molecular phylogenetics and evolution*, 62: 62–70
- Thorpe R.S., Surget-Groba Y., Johansson H. 2010. Genetic tests for ecological and allopatric speciation in Anoles on an island archipelago. *PLoS genetics*, 6, doi: 10.1371/journal.pgen.1000929: 12 str.
- Tobler M., Schlupp I., Heubel K.U., Riesch R., García de León F.J., Giere O., Plath M. 2006. Life on the edge: hydrogen sulfide and the fish communities of a Mexican cave and surrounding waters. *Extremophiles*, 10: 577–585
- Tobler M., DeWitt T.J., Schlupp I., García de León F.J., Herrmann R., Feulner P.G.D., Tiedemann R., Plath M. 2008. Toxic hydrogen sulfide and dark caves: phenotypic and genetic divergence across two abiotic environmental gradients in *Poecilia mexicana*. *Evolution*, 62: 2643–2659
- Tobler M. 2009. Does a predatory insect contribute to the divergence between cave- and surface-adapted fish populations? *Biology Letters*, 5: 506–509
- Tobler M., Palacios M., Chapman L.J., Mitrofanov I., Bierbach D., Plath M., Arias-Rodriguez L., García de León F.J., Mateos M. 2011. Evolution in extreme environments: replicated phenotypic differentiation in livebearing fish inhabiting sulfidic springs. *Evolution*, 65: 2213–2228
- Toews D.P.L., Brelsford A. 2012. The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. *Molecular Ecology*, 21: 3907–3930
- Trontelj P., Douady C.J., Fišer C., Gibert J., Gorički Š., Lefébure T., Sket B., Zakšek V. 2009. A molecular test for cryptic diversity in ground water: how large are the ranges of macro-stygobionts? *Freshwater Biology*, 54: 727–744

- Trontelj P., Polak S. 2012. Replicated adaptive radiations in leptodirine cave beetles. V: 21st International Conference on Subterranean Biology, 2.-7. September, 2012, Košice, Slovaška. Kováč L., Uhrin M., Mock A., Úptáček P. (ur.). Košice, Pavol Šafárik University in Košice: 109–110
- Trontelj P. 2012. Natural selection. V: Encyclopedia of Caves, 2nd ed. Culver D. C., White W. B. (eds). Amsterdam, Elsevier Academic Press: 543–549
- Trontelj P., Blejec A., Fišer C. 2012. Ecomorphological convergence of cave communities. *Evolution*, 66: 3852–3865
- Turk S., Sket B., Sarbu S. 1996. Comparison between some epigeal and hypogean populations of *Asellus aquaticus*. *Hydrobiologia*, 337: 161–170
- Turk-Prevorčnik S., Blejec A. 1998. *Asellus aquaticus infernus*, new subspecies from romanian hypogean waters. *Journal of Crustacean Biology*, 18: 763–773
- Vähä J.P., Primmer C.R. 2006. Efficiency of model-based Bayesian methods for detecting hybrid individuals under different hybridization scenarios and with different numbers of loci. *Molecular Ecology*, 15, 63–72
- Vähä J.P., Erkinaro J., Niemelä E., Primmer C.R. 2007. Life-history and habitat features influence the within-river genetic structure of Atlantic salmon. *Molecular Ecology*, 16: 2638–2654
- Van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P. 2004. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4: 535–538
- Verovnik R., Sket B., Prevorčnik S., Trontelj P. 2003. Random amplified polymorphic DNA diversity among surface and subterranean populations of *Asellus aquaticus* Crustacea: Isopoda. *Genetica*, 119: 155–165
- Verovnik R., Sket B., Trontelj P. 2004. Phylogeography of subterranean and surface populations of water lice *Asellus aquaticus* Crustacea: Isopoda. *Molecular Ecology*, 13: 1519–1532
- Verovnik R., Sket B., Trontelj P. 2005. The colonization of Europe by the freshwater crustacean *Asellus aquaticus* Crustacea: Isopoda proceeded from ancient refugia and was directed by habitat connectivity. *Molecular Ecology*, 14: 4355–4369
- Verovnik R., Prevorčnik S., Jugovic J. 2009. Description of a neotype for *Asellus aquaticus* Linne, 1758 Crustacea: Isopoda: Asellidae, with description of a new subterranean *Asellus* species from Europe. *Zoologischer Anzeiger*, 248: 101–118
- Via S. 2009. Natural selection in action during speciation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 9939–9946
- Vick P., Blum M. 2010. The isopod *Asellus aquaticus*: a novel arthropod model organism to study evolution of segment identity and patterning. *Paleodiversity* 3, Supplement: 89-97
- Vonlanthen P., Bittner D., Hudson A.G., Young K.A., Muller R., Lundsgaard-Hansen B., Roy D., Di Piazza S., Largiader C.R., Seehausen O. 2012. Eutrophication causes speciation reversal in whitefish adaptive radiations. *Nature*, 482: 357–362

- Weir B.S., Cockerham C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358–1370
- Winter M., Devictor V., Schweiger O. 2013. Phylogenetic diversity and nature conservation: where are we? *Trends in Ecology and Evolution*, 28: 199–204
- Wilkens H., Hüppop K. 1986. Sympatric speciation in cave fishes? Studies on a mixed population of epi- and hypogean *Astyanax* Characidae, Pisces. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 24: 223–230
- Wilkens H. 2011. Variability and loss of functionless traits in cave animals. Reply to Jeffery. *Heredity*, 106: 707–708
- Zakšek V., Sket B., Gottstein S., Franjević D., Trontelj P. 2009. The limits of cryptic diversity in groundwater: phylogeography of the cave shrimp *Troglocaris anophthalmus* Crustacea: Decapoda: Atyidae. *Molecular Ecology*, 18: 931–46

ZAHVALA

Delo je financirala Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS) v okviru programa mladih raziskovalcev (pogodba št 1000-09-310036) in programske skupine P1-0184.

Najprej bi se zahvalila mentorju Petru Trontlju, da mi je dal priložnost za sodelovanje pri raziskovalnem delu na področju evolucijske biologije. Hvala za vse nasvete in podporo tekom teh nekaj let. Tekom študija sem se lahko udeležila tudi nekaj konferenc, kjer sem predstavila svoje delo mednarodni publiki. Hvala soavtorjem, ki so pomagali pri celostni podobi predstavitev.

Rada bi se zahvalila Ajdi Moškrič in Maji Jelenčič za pomoč pri delu v laboratoriju. Hvala tudi Valeriji Zakšek in Tjaši Lokovšek, ki sta mi v laboratoriju priskočili na pomoč s koristnimi nasveti. Zaposlenim v laboratoriju na Katedri za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo z oddelka za Zootehniko, bi se rada zahvalila za izvedbo analize na kapilarnem genetskem analizatorju ABI 3500. Analize mikrosatelitov sta me naučila in kasneje tudi veliko pomagala Maja Jelenčič in Tomaž Skrbinšek, predvsem hvala tudi za vso tehnično podporo, kot je namestitev programov na računalnik. Za pomoč pri filogenetskih analizah bi se rada zahvalila Ajdi Moškrič, Valeriji Zakšek in Rudiju Verovniku.

Najlepša hvala vsem, ki ste mi pomagali pri nabiranju in zbiranju vzorcev: Gregor Bračko, Mihai Baci, Traian Brad, Teo Delić, Cene Fišer, Žiga Fišer, Žiga Fujan, Špela Gorički, Jure Jugovic, Janja Matičič, Marko Matičič, Ajda Moškrič, Dumitru Pegulescu, Slavko Polak, Matija Prelovšek, Simona Prevorčnik, Serban Sarbu, Boris Sket, Rudi Verovnik, Miloš Vittori, Peter Trontelj, Maja Zgajster, Valerija Zakšek.

Iskreno hvala Simoni Prevorčnik, za vse morfološke preglede živali in pomoč pri pripravi vzorcev za izolacijo DNK. S tem si mi res prihranila kar nekaj časa in pomembno dopolnila rezultate mojih genetskih analiz. Tudi slike vodnih osličkov iz fenotipsko mešanih populacij so njena zasluga.

Hvala komisiji za pripombe, ki so mi pomagale disertacijo spraviti v končno obliko in potrpežljivost, saj je ves postopek trajal precej dlje, kot sem si na začetku zamislila.

Objava znanstvenega članka se je izkazala za precej bolj težavno, kot smo mislili na začetku. Tu gre predvsem zahvala Petru Trontlju za ves čas investiran v piljenje rokopisa in dopisovanje z uredniki. Hvala tudi ostalim soavtorjem, Simoni Prevočnik, Rudiju Verovniku in Serban Sarbu.

Vsem ostalim mladim raziskovalcem, s katerimi smo si delili prostore, hvala za številne koristne diskusije in prijetno vzdušje v službi.

Lokaliteta, bližnje mesto, država	Koda lokalitete	COI haplotip	28S rRNK	Koordinate	GenBank št. COI	GenBank št. 28S rRNK
¹ Ålborg, Nordjylland, DK	AA	AA1-AA3	EUR1	9° 55' 10"//57° 02' 50"	DQ144816 - DQ144818	DQ144746
¹ Bakovci, Murska Sobota, SI	MU	MU1-MU3, MU5	--	16° 09' 56"//46° 36' 23"	AY531776 - AY531779	--
¹ Drava, Ptuj, SI	DR	DR3, DR5-DR18,DR21, DRcR	EUR1	15° 56' 11"//46° 23' 05"	DQ144753 - DQ144768, DQ144889	DQ144746
¹ rekaZeta, Dobre polje, YU	CG	CG1, CG4	EUR1	18° 59' 46"//42° 39' 32"	DQ144775, DQ144776	DQ144746
¹ Dekmanca, Kozje, SI	SO	SO1	--	15° 37' 56"//46° 57' 21"	DQ144798	--
¹ Dolenje, Ajdovščina, SI	VP	VP1-VP5	ZBVP	13° 55' 11"//45° 52' 10"	DQ144783 - DQ144787	DQ144744
¹ Ettringen, Augsburg, DE	WR	WR1, WR2	EUR1	10° 39' 12"//48° 06' 15"	DQ144831, DQ144832	DQ144746
¹ Homps, Lezignan, FR	FR	FRDNKS, FRKSLY	--	2° 43' 10"//43° 16' 01"	AY531783, AY531784	
¹ Kassel, Hessen, DE	KS	FRDNKS, FRKSLY	EUR1	9° 27' 25"//51° 18' 17"	AY531783, AY531784	DQ144746
¹ Krka, Novo Mesto, SI	KR	KR1, KR5	KOKR	15° 11' 36"//45° 49' 22"	AY531785, AY531786	DQ144741
¹ Osdorf, Hamburg, DE	DE	DEGA	--	9° 59' 38"//53° 36' 41"	AY531808	--
¹ Osp, Koper, SI	OSP	OSP1, OSP2, OSP4	EUR1	13° 51' 05"//45° 34' 26"	DQ144769 - DQ144771	DQ144746
¹ Pentling, Regensburg, DE	RG	RG1, RG2	--	12° 02' 42"//48° 58' 50"	DQ144819, DQ144820	--
¹ Prilipe, Brežice, SI	SA	SA1, SA4, SA5	--	15° 38' 28"//45° 52' 44"	DQ144795 - DQ144797	--
¹ S. Giovanni al Timavo, Monfalcone, IT	TM	TM1, TM4, TM5	EUR1	13° 35' 44"//45° 47' 18"	DQ144792 - DQ144794	DQ144746
¹ Saint-Usage, Cote-d'Or, FR	GR	GR1-GR3, GRLY	EUR1	5° 15' 55"//47° 06' 40"	DQ144772 - DQ144774, DQ144834	DQ144746
¹ San Pancrazio, Verona, IT	IT	IT1, IT3, IT5, IT6	EUR1	11° 02' 03"//45° 26' 08"	DQ144779 - DQ144782	DQ144746
¹ Krška jama, Krška vas, Ivančna Gorica, SI	KJ	KJ1	--	14° 46' 33"//45° 53' 25"	AY531821	

Lokaliteta, bližnje mesto, država	Koda lokalitete	COI haplotip	28S rRNK	Koordinate	GenBank št. COI	GenBank št. 28S rRNK
¹ Viršnica jama, Velika Račna, Grosuplje, SI	VR	VR1, VR2, VR5	VRzR	14° 42' 12"//45° 54' 25"	AY531780 - AY531782	DQ144743
¹ Dolga vas, Kočevje, SI	KO	KO1, KO2, KO5	KOKR	14° 52' 35"//45° 37' 28"	AY531769 - AY531771	DQ144741
¹ Pijava Gorica, Ljubljana, SI	BR	RBBR	--	14° 34' 34"//45° 57' 46"	AY531810	--
¹ Sušje, Ribnica, SI	RB	RB1, RBBR	ZBVP	14° 41' 17"//45° 45' 13"	AY531809, AY531810	DQ144744
¹ Zbilje rezervar, Ljubljana, SI	ZB	ZB1-ZB5	ZBVP	14° 25' 31"//46° 09' 24"	AY531814 - AY531818	DQ144744
¹ Baške Oštarije, Karlobag, HR	BO	BO1, BO2, BO4, BO5	BOJZ	15° 10' 53"//44° 31' 36"	DQ144788 - DQ144791	DQ144745
¹ Jezerane, Senj, HR	JZ	JZ1, JZ2	BOJZ	15° 13' 33"//45° 02' 48"	DQ144799, DQ144800	DQ144745
¹ Popovo polje, Trebinje, BA	PO	PO1, PO2, PO4, PO5	--	18° 19' 48"//42° 42' 50"	DQ144801 - DQ144804	--
¹ Püspökladny, Hajdu-BAar, HU	Pu	Pu1, Pu3, Pu5	EUR1	21° 06' 37"//47° 23' 35"	DQ144807 - DQ144809	DQ144746
¹ Olsztyn, PL	PL	PL1, PL4	EUR2	20° 26' 12"//53° 48' 41"	DQ144821 - DQ144822	DQ144748
¹ Nyeki Duna-oxbow Gemenc, HU	DN	DN2-DN5, FRDNKS	--	18° 51' 36"//46° 11' 64"	DQ144810 - DQ144813, AY531783	--
¹ Tisza reservoir, Kisköre, HU	TS	TS1, TS2	--	20° 40' 59"//47° 35' 22"	DQ144814, DQ144815	--
¹ Hagymás-lapos, Tiszafüred, HU	HU	HU1, HU2, HU4, HU5	--	20° 55' 29"//47° 33' 29"	DQ144890 - DQ144893	--
¹ Cave Zoodhos I, otok Santorini, GR	SN	SN1-SN3, SN5	SN3	25° 30' 20"//36° 27' 10"	DQ144827 - DQ144830	DQ144747
¹ Čret, Ptuj, SI	cR	DRcR	EUR1	15° 48' 11"//46° 28' 33"	DQ144889	DQ144746
¹ Neuville sur Saone, Lyon, FR	FR	LY4, GRLY, FRKSLY	EUR1	4° 50' 30"//45° 52' 00"	DQ144833, DQ144834, AY531784	DQ144746
¹ Lonjica, Zagreb, HR	LN	LN1, LN2, LN5	EUR2	16° 20' 26"//45° 51' 27"	DQ144835 - DQ144837	DQ144748

Lokaliteta, bližnje mesto, država	Koda lokalitete	COI haplotip	28S rRNK	Koordinate	GenBank št. COI	GenBank št. 28S rRNK
¹ Malečka, Varaždin, HR	VA	VA2, VA4, VA5, VA11, VA13, VA14	EUR1	16° 28' 38"//46° 18' 39"	DQ144846, DQ144847, DQ144843, DQ144849, DQ144850, DQ144864	DQ144746
¹ Žirovnica, Škofja Loka, SI	zR	zR1, zR3	VRzR	14° 07' 38"//46° 02' 59"	DQ144841, DQ144842	DQ144743
² Ulva blizu Uppsala, SW	UP	UP1, UP2, UP3, UP4	--	17°34'32"//59°54'45"	FJ749276-FJ749279	--
¹ Pevestorf, Gartow, Oberelbe, DE	GA	GA1, GA4, GA5, DEGA	--	11° 27' 21"//53° 03' 33"	DQ144838 - DQ144840, AY531808	--
¹ Wageningen, NL	WA	WA1, WA6	EUR2	5° 39' 46"//51° 58' 04"	DQ144844, DQ144845	DQ144748
¹ Matelica, Ancona, IT	AN	AN1, AN2, AN5, AN11, AN14	EUR1	13° 00' 42"//43° 15' 18"	DQ144851, DQ144852, DQ144863, DQ144887, DQ144888	DQ144746
¹ Rieti, Lazio, IT	LA	LA1	EUR1	12° 51' 40"//42° 24' 11"	DQ144848	DQ144746
¹ Topčider, Beograd, YU	BG	BG1, BG3	EUR1	20° 28' 03"//44° 45' 45"	DQ144853, DQ144854	DQ144746
¹ Kastoria lake, Kastoria, GR	KA	KA1, KA3	--	21° 15' 16"//40° 30' 58"	DQ144855, DQ144856	--
¹ Babine Grede, Slavonski Brod, HR	BB	BB1-BB4	--	18° 38' 24"//45° 03' 20"	DQ144859 - DQ144852	--
¹ Spring Šum, Struga, Ohrid, MK	sM	sM1, sM4	--	20° 35' 43"//41° 13' 34"	DQ144857, DQ144858	--
¹ Provatonas, Alexandroupoli, GR	AX	AX1	--	26° 14' 39"//41° 01' 30"	DQ144865	--
¹ Nestos delta, Xerias, GR	XE	XE1, XE4, XE5	EUR1	24° 43' 28"//41° 00' 04"	DQ144866 - DQ144868	DQ144746
¹ Kozjak, Prespa, MK	PS	PS1, PS4	PS4	21° 02' 27"//41° 03' 33"	DQ144870, DQ144871	DQ144749
¹ Strimoniko, Serres, GR	SE	SE1	--	23° 17' 21"//41° 04' 08"	DQ144869	--
¹ Sv. Naum, Ohrid, MK	SV	SV1, SV2, SV5	--	20° 46' 54"//40° 56' 52"	DQ144872 - DQ144874	--
¹ Lake Paralimni, Thiva, GR	TH	TH1-TH5	EUR1	23° 22' 40"//38° 26' 49"	DQ144875 - DQ144879	DQ144746

Lokaliteta, bližnje mesto, država	Koda lokalitete	COI haplotip	28S rRNK	Koordinate	GenBank št. COI	GenBank št. 28S rRNK
¹ Vrissa, Farsala, GR	FA	FA1, FA3-FA5	--	22° 18' 58"//39° 16' 12"	DQ144880 - DQ144883	--
¹ Evros delta, Feres, GR	EV	EV1, EV2	EUR1	26° 10' 39"//40° 51' 03"	DQ144884, DQ144885	DQ144746
¹ Don reka, Sheffield, UK	UK	UK1	EUR2	1° 14' 52"//53° 29' 40"	DQ144886	DQ144748
³ Rakov rokav, Planinska jama, Planina, SI	RR	RR1, RR8, CPRR	--	14° 14' 40"//45° 48' 58"	AY531802 -AY531804	--
³ Planinsko Polje, Rakek, SI	PP	PPPJ, PP2, PPJS1	VRzR	14°15'13,26"//45°49'39,5"	AY531761, AY531798, AY531806	DQ144743
³ Pivški rokav, Planinska jama, Planina, SI	PR	PR1, PR5, CJPR1, CJPR2, PPJS1, PPJS2	LJPR	14° 14' 40"//45° 48' 58"	AY531775, AY531799 - AY531801, AY531806, AY531807	DQ144742
⁴ Planinsko polje, Rakek, SI	UB	UB1, PPJS1, PPJS2	--	14°15'18,33"//45°51'12,3"	AY531806, AY531807	--
⁴ Planinsko polje, Rakek, SI	UN	UN1-UN4, PPJS1,	--	14°14'34,8"//45°52'15,7"	AY531806	--
^{4,5} Sotočje, Planinska jama, Planina, SI	SOT	CJPR1, SOTPR, PR1, CJPR2, PR5, SOTRR2, SOTRR1, CPRR, RR1, PPJS1	--	14° 14' 40"//45° 48' 58"	AY531775, AY531799 - AY531801	--
reka Unica, Planinska jama, Planina, SI	PUN	--	--	14° 14' 40"//45° 48' 58"	--	--
Jama Škratovka, Planina, SI	ŠKR	--	--	14°15'49,18" // 45°49'35,58"	--	--
⁵ Zelške jame, Rakov Škocjan, SI	ZJ	ZJ, ZJ2, PPJS1	--	14°18'12,29" // 45°47'26,39"	AY531806	--
⁵ Tkalca jama, Rakov Škocjan, SI	TKJ	PPJS2, TKJ1, TKJ2, RSCR, PPJS1	--	14°17'12,31" // 45°47'38,84"	AY531806, AY531807, AY531820	--
¹ Veliki Otok, Postojna, SI	CP	CP1,CP2, CP8, CPPR, PPJS2	--	14° 11' 50"//45° 47' 17"	AY531759, AY531760, AY531796, AY531802, AY531807	--

Lokaliteta, bližnje mesto, država	Koda lokalitete	COI haplotip	28S rRNK	Koordinate	GenBank št. COI	GenBank št. 28S rRNK
³ Rakov Škocjan, SI	RS	RS1, PPJS2, RS4, RSCR, PPJS1	--	14°17'17,62"//45°47'43,15"	AY531806, AY531807, AY531820	--
¹ Otok, Cerknica, SI	CR	CR1, CR2, CR5, CR8, RSCR	--	14° 22' 51"//45° 43' 54"	AY531811 - AY531813, AY531819, AY531820	--
¹ Gašpinova jama, Logatec, SI	LO	LO3, LO4, NJLO, LJLO	--	14° 14' 26"//45° 54' 38"	AY531822 - AY531825	--
⁵ Logarček, Laze, SI	LOG	NJLO, LOG, PPJS1	--	14°16'5,44" // 45°51'53,94"	AY531824	--
⁵ Katavotron 2 Pod stenami, jakovica, SI	KAT	KAT, NJLO, UN2	--	14°14'35,49" // 45°52'21,6"	AY531824	--
⁵ Vranja jama, Jakovica, SI	VRJ	VRJ, NJLO	--	14°14'46,57" // 45°52'24,91"	AY531824	--
^{3,5} Najdena jama, Jakovica, SI	NJ	NJ6, NJLO	--	14°14'43,47" // 45°52'35"	AY531824	--
¹ Malo Okence, Vrhnika, SI	LJ	LJ1, LJ2, LJ5, LJLO	LJPR	14° 17' 56"//45° 57' 05"	AY531825 - AY531828	DQ144742
⁵ Postojnska jama, Postojna, SI	POSJ	PJ9, POS1, POS2, PPJS1	--	14°12'13,37" // 45°46'57,87"	AY531806	--
reka Pivka, Postojna, SI	POS	--	--	14°12'13,37" // 45°46'57,87"		--
³ Pivka jama, Veliki otok, SI	PJ	PJ1, PPJS2, PJ9, PJ4, PPPJ, PPJS1	--	14°12'16,6" // 45°48'17,06"	AY531797, AY531806, AY531807	--
⁴ Crna jama, Postojna, SI	CJ	PPJS2, CJ5, CJ6, CJPR1, CJPR2, CJPR3, CJ1, CJ2, PPJS1	--	14° 12' 43"//45°48'57"	AY531807, AY531806, KJ676735, AY531800	--
⁵ Golobina, Dane, SI	GOL	GOL	--	14°26'14,41" // 45°42'40,35"		--
⁵ Jama Obrh Čolniči, Gorenje jezero, SI	COL	COL1-COL3	--	14°24'57,46" // 45°43'17,02"		--
⁴ Nețoi Str #1, Mangalia, ROM	NW	NW1, NW2	ROM1, EUR1	28° 34' 12.65"//43° 49' 10.69"	KJ676763, KJ676764	DQ144746, KJ676728

Lokaliteta, bližnje mesto, država	Koda lokalitete	COI haplotip	28S rRNK	Koordinate	GenBank št. COI	GenBank št. 28S rRNK
⁴ D. Ana Str #13, Mangalia, ROM	AW	MCAW	ROM1	28° 34' 01.72"//43° 49' 23.61"	KJ676756	KJ676728
⁴ Mobile jama, Mangalia, ROM	MC	MCAW	ROM1	28° 33' 43.65"//43° 49' 36.31"	KJ676756	KJ676728
⁴ Karaoban jezero, Mangalia, ROM	KAL	KAL1, KAL2, KAL5, KAL7	EUR1	28° 34' 00.04"//43° 50' 49.31"	KJ676751 - KJ676754	DQ144746
⁴ Hagieni, ROM	HA	HA1	--	28° 28' 27.31"//43° 48' 08.24"	KJ676750	--
⁴ Mangalia, Turkish Baths, ROM	DO	DO6, DO9, DO13	EUR1	28° 29' 27.26"//43° 49' 11.69"	KJ676747 - KJ676749	DQ144746
⁴ lake-shore well, Limanu, ROM	MA	MA7	EUR1	28° 32' 9"// 43° 48' 5"	KJ676755	DQ144746
⁴ Arsa, ROM	AR	AR4	--	28° 27' 54.20"//43° 50' 21.10"	KJ676745	--
⁴ Limanu bridge spring, ROM	MD	MD1, MD2, MD5	ROM2	28° 31' 01.54"//43° 48' 44.77"	KJ676757 - KJ676759	KJ676729
⁴ Murighial jezero, Tulcea, ROM	MG	MG1-MG5	--	28° 48' 16"//45° 10' 22"	KJ676760 - KJ676762, KJ676769, KJ676770	--
⁴ Sapanta, ROM	SP	BMSP	--	23°41'45.78"//47°58'10.44"	KJ676744	--
⁴ Baia Mare, ROM	BM	BMSP, BM1, BM2, BM5	EUR1	23°41'45.78"//47°58'10.44"	KJ676741 - KJ676744	DQ144746
⁴ Ploesti, ROM	RO	RO1, RO4	--	26°01'27"//44°56'17"	KJ676765, KJ676766	--
⁴ Crimea, Simferopol, UKR	SI	SI1	--	34°08'01"//44°56'14"	KJ676767	--
⁴ Crimea, Jalta, UKR	JA	JA1	--	34°10'09"//44°30'35"	KJ676746	--
⁴ Crimea, Jalta, Vodopadnaja, UKR	VO	VO1	--	34°08'37"//44°29'23"	KJ676768	--

Lokaliteta, bližnje mesto, država	Koda lokalitete	COI haplotip	28S rRNK	Koordinate	GenBank št. COI	GenBank št. 28S rRNK
¹ Trebiciano cave, Trieste, IT	--	<i>Asellus kosswigi</i>	<i>Asellus kosswigi</i>	13° 55' 00"//45° 41' 03"	AY531762	DQ144740
¹ <i>Asellus hilgendorffii</i>	--	JP2	JP1	--	AY531829	DQ144750
¹ <i>Baikalasellus sp.</i>	--	BA4	BA4	--	DQ144778	DQ144737
¹ <i>Proasellus coxalis</i>	--	PA4, PA5	PA	--	DQ144777, DQ144752	DQ144751

¹ Verovnik R., Sket B., Trontelj P. 2005. The colonization of Europe by the freshwater crustacean *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda) proceeded from ancient refugia and was directed by habitat connectivity. *Molecular Ecology*, 14: 4355–4369

² Verovnik R., Prevorčnik S., Jugovic J. 2009. Description of a neotype for *Asellus aquaticus* Linne, 1758 (Crustacea: Isopoda: Asellidae), with a description of a new subterranean *Asellus* species from Europe. *Zoologischer Anzeiger*, 248: 101-118

³ Verovnik R., Sket B., Trontelj P. 2004. Phylogeography of subterranean and surface populations of water lice *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda). *Molecular Ecology*, 13: 1519–1532

⁴ Konec M., Prevorčnik S., Sarbu S.M., Verovnik R., Trontelj P. 2015. Parallels between two geographically and ecologically disparate cave invasions by the same species, *Asellus aquaticus* (Isopoda, Crustacea). *Journal of Evolutionary Biology*, doi:10.1111/jeb.12610, 12 str.

⁵ disertacija, katere del je ta priloga

Priloga B: Seznam vseh testiranih začetnih oligonukleotidov za mikrosatelitske lokuse

Ime začetnika	Nukleotidno zaporedje 5' - 3'
A10_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTCGGGCTTTTGCTCAAC
A10_R	ATACCGCTCTAACCACACTCG
A104F	CATCAGTGGCACCTCGTG
A104R	GGTTTTCCCAGTCACGACGTTGGCCTTCAAATACCTCA
A105_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTCTCGGAAAACCTGGTGTCTT
A105_R	AAATGAGGCGCTGGTTATAG
a105F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTTCCGAGGTAACGATTTTCG
a105R	AGAAGTCGCCGGAATGTG
A106F	AGGGGAAAGAGCGAGTGAA
A106R	GGTTTTCCCAGTCACGACGTCGCTGGAAAATGCTCTCAA
A107_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTACAAGGGTGATGGAGTGG
A107_R	TGAGCCAGGAAGTTTGATAA
a107F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTATGTTGCCGTGGACACCT
a107R	GCCATATTGTGAGCCAGGA
A108_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTTCCGACTCTAATCTTCTCGC
A108_R	CAGAAAACGCACATTTACCAC
a10F	ACTCGGGCTTTTGCTCAAC
a10R	GGTTTTCCCAGTCACGACGTGCTTCGGGTATTGGAGGAA
A11_F	CATAAGTGTGTTTGCACAGTG
A11_R	GGTTTTCCCAGTCACGACGTTGGGGTTCCTTGAATTAG
A110_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTCAATGCCATAAGTGTGTTTG
A110_R	TCGATCCATTTTCGTAACAATTC
A111_F	CGAAAAACAAGTTTCTTAAACG
A111_R	GGTTTTCCCAGTCACGACGTTTCCGTCATCATTTTCATCAG
A114_F	AACGCACATAAACATACACAGC
A114_R	GGTTTTCCCAGTCACGACGTCTCCCTCTCCCTTGGTC
A114a_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTCCAACACATTTCCATTGATAC
A114a_R	GCGACCTTTTAGTTATCCCTG
A117_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTCTTGAGACGGGCTCTTGA
A117_R	TCCGACTACAACGAACAGG
A118F	CATCAGTGGCACCTCGTG
A118R	GGTTTTCCCAGTCACGACGTTGGCCTTCAAATACCTCA
A119a_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTAGAACGACCTTCGCTGTC
A119a_R	GGGCTGTTGTATTGTCAGG
a119F	GGGAACTCCTCCTGGGTTT
a119R	GGTTTTCCCAGTCACGACGTTTCAACATGGCAGACGAA
A11F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTGCAGCAGGCTAAAAATTG
A11R	ACACGGAAGCGTTCATGC
A123_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTTTCCGTCATGTACTTCG
A123_R	TTTCCCTGTAACGAGTGCC
A124F	AGCGCGAGGTGTGTGAAG
A124R	GGTTTTCCCAGTCACGACGTACACGGAAGCGTTCATGC
A125_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTCTCGCAACTGGGTTAATCTC
A125_R	AAAAATAGAGGAGTCGGAGTCG
a125F	CGCAACTTGGGTTAATCTCG

Ime začetnika	Nukleotidno zaporedje 5' - 3'
a125R	GGTTTTCCCAGTCACGACGTCCGAGTCGGCTGATTTG
A129_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTGACGACAGTCTGGCAGAAAG
A129_R	TCCCTGTATGTGTGTGCATG
A129a_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTCCGACCCATACATACTCAC
A129a_R	TTAGCCATAAAGGTCCCTCAC
A12F	GGCACATGAAGCGAAGAA
A12R	GGTTTTCCCAGTCACGACGTGCCGTGACGTTTATCTCCA
A130_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTATGCCAGGAGGCGTAGAG
A130_R	GTGCGTGTGTTGAGGGTG
A130a_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTGACAGGTGTTTTGGTCTCC
A130a_R	CTTGGTCAGTCTTGGCTTAC
A130b_F	TTCAGGTGTGGAGAAGACTG
A130b_R	GGTTTTCCCAGTCACGACGTGGCACTTGATGTGATGTTG
A131F	CATCAGTGGCACCTCGTG
A131R	GGTTTTCCCAGTCACGACGTTGGCCTTCAAATACCTCA
A133_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTGGGATGACGATGATTTGG
A133_R	TTCCTTTTATTTACACGCAGTG
a133F	TCATCGTCGGCGCTAAAC
a133R	GGTTTTCCCAGTCACGACGTCCGTCATGCTCGTCAAA
A135F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTACACGGAAGCGTTCATGC
A135R	AGCGCGAGGTGTGTGAAG
A138_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTCTTCGGAAAGTTTGAGACTG
A138_R	GAACAGGTGTGTGTGTATGT
A139_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTGCTCTGGGTGATGTCAG
A139_R	GATGCGGTTCAACTCGTT
A142_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTAACCGAATGCTGCACAGTAC
A142_R	GCTCGAAGAGGACCAGAAAC
A143_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTACATCGACACGTCAGTGATC
A143_R	AATCCGTTCTGTGGACTGTC
A144_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTGCAGGAGAATGCTGAAGATAC
A144_R	CAGGAGCCTGAGTACGAATAC
A145_F	GCATCACTCACAGGTATGAAG
A145_R	GGTTTTCCCAGTCACGACGTGGTATCCGTGGCAAGTAATA
A2_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTCCGATAGAGGATAAAGTGG
A2_R	TTCGGAATAAAAAGAATACCG
a2F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTCCCATGCACTTACCGTTG
a2R	CACTTCTCCGCAACTTCG
A201_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTCCCACAATCCATGCTTTG
A201_R	TTTGGGTGTTTTGTCCG
A204_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTCAATTTTCCGAGGTAAC
A204_R	GGGCTAACTAACAATGTAGGC
A205_F	TTGTGATGTTGAGGTGTGTTG
A205_R	GGTTTTCCCAGTCACGACGTAGGGCAAATCTCTGTGG
A208_F	GCGGCCTAAGATAAGTTGG
A208_R	GGTTTTCCCAGTCACGACGTCCGCAATGGGACCTGTAC
A213_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTGCCTGGATTGAAGATGC
A213_R	ACCCGAACACGATGACAC
A216_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTGCCCTTCACTACCTCTCG
A216_R	GGAGCACCTATTCCTTTCTC

Ime začetnika	Nukleotidno zaporedje 5' - 3'
A220_F	GCGCTTCTCTCTTTGCTGTT
A220_R	GGTTTTCCCAGTCACGACGTTGCGCCGTAGTTTACAG
A225_F	CGAACAGACGAAGCAACTC
A225_R	GGTTTTCCCAGTCACGACGTTCCCTCTCCTGACCAATACC
A226_F	CGTCATACAGGTCCATCAGC
A226_R	GGTTTTCCCAGTCACGACGTCCTCACAAACTGCGAAAAC
A227_F	GGAAGGAAGGTCTTATTTAGGC
A227_R	GGTTTTCCCAGTCACGACGTTGAAGTTGAGAGTCCCTGATA
A228_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTGCACAGTGACAATCGTATTTTC
A228_R	CGTTTCTTAGGAGTTTTTCGTC
A229_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTGACCTGTACCAACGCACCTA
A229_R	CTGCCGAATTTAAGCCTCTC
A230_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTGCTTCATTACTGGGTTGATTAG
A230_R	CGTCAGCCATCTCTCTCA
A234_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTCTACGCATTCTCCAAATTGTC
A234_R	CTTACACCTGCCCATGACTAC
A235_F	GGGGAGGACACTTTGTTGT
A235_R	GGTTTTCCCAGTCACGACGTTGGGTCGTTTGTCTGAG
A235a_F	CACGCACCTTCAGATTGG
A235a_R	GGTTTTCCCAGTCACGACGTACGCTCGCTGGTGAAC
A236_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTGCAGTTTGTGCTCTACACG
A236_R	GCAGCCACGAATAAATCAT
A243_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTCCGTCTTTCAGGAACTCG
A243_R	CGTGTGTGTGTTTGTGTGTAG
A245_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTTTTCCAAACTTCTCTTCTGG
A245_R	ATCGACCGAATGTAGATCATC
A249_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTACCGTCATCCCCTAACC
A249_R	CGAAGGTCGTTTGTTTGC
A249a_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTCAAACGACCTTCGCTGTC
A249a_R	TAGGGCTGTTGTATTGTCAAG
A251_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTTCTCTTCGCCAGTCTGTC
A251_R	TGCTGTGGAGTATCATCAGG
A255_F	ACGGTAAACTCTCCTGACTCTG
A255_R	GGTTTTCCCAGTCACGACGTGATGGTCTGGAGGAACGTAC
A258_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTGGCAGAATCAGGCACTTC
A258_R	CTTGCTGTTGCTGCTCAA
A261_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTGTCGCTGGTGAACAGTTG
A261_R	TCCCATCTGAGAGTGTCTTG
A262_F	CATTATCCAATGAGCAGAAGAC
A262_R	GGTTTTCCCAGTCACGACGTGTCGCTACGAGAGTGTATA
A264_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTGGAGGTGAGGAACAATGAAGT
A264_R	ATGCGTGTGTATGTGTGTTTG
A266_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTGTGGTAGCACGATGTGAACA
A266_R	GAGCGTAGTCAGGACAGGC
A269_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTGGAATCGTCGCCTCTTTG
A269_R	TTGGTTGTGGTTTCAAGTCG
A272_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTCTTTTGTCTGCCTAATTTCTC
A272_R	CAGAGTGATGTCCCATCTATG
A274_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTGTGTGGATTGGGTGAGATG

Ime začetnika	Nukleotidno zaporedje 5' - 3'
A274_R	TCCTGCGAGTTAGTTTCTTTC
A275_F	CTAGGCGTCCTGTATTACGTC
A275_R	GGTTTTCCCAGTCACGACGTCTCGATGAGGGAATATGAAC
A275a_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTGGGCAGTATCTCCGAAGG
A275a_R	GTCACGAGCGGTGTAACG
A276_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTGGCTGAAAAGAGAAAGTAAAC
A276_R	AAGATGACATTATGGGTCTGAG
A3F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTACACGGAAGCGTTCATGC
A3R	GGCTGCAGCAGGCTAAAA
A5_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTACCTTGAAAAGTGGTGTTCC
A5_R	GGTCCCCCTAAAAAAGTTC
A6_F	GTGCTCTACACGCAGTTACG
A6_R	GGTTTTCCCAGTCACGACGTGGGTTTTTCCCAGTCCAC
A7_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTAAACGCACACAGGGGTTT
A7_R	CGGTGGCTCATCCAAGAT
A9_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTGGTGTTGCTGTGTCAAATGTC
A9_R	TTGGCCTTCAAATAACCTCAC
a9F	TGCACACGAATCCATCCA
a9R	GGTTTTCCCAGTCACGACGTGGCCTTCAAATAACCTCAC
B104_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTGGAAGCACAACAACAACC
B104_R	AGAACCCTGAGCATCAATC
B11_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTATGGAAAACCGCAGATTG
B11_R	TGGGGCACAAGAAACTTC
B115_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTATCGTTGAAGGTGAGGAAG
B115_R	ATCCGTTGAGTTTTGGAAG
B12_F	GCTGTCTTCCTCGTCTTCTT
B12_R	GGTTTTCCCAGTCACGACGTCTGTGGTGATGATGATTG
B12a_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTTTTGTTGTGTGATGGTTGAC
B12a_R	GAGCGTCTTTCAGCAATAAC
B2_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTACCACAATACACGGAGAAATC
B2_R	CTTACGTTTCGAGTTCCTGAAC
b2F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTAACGCCCAAACAGACCA
b2R	ATCGTGGGCATGTTTCGTC
B6_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTGACAGGACGCCTTTTATCAC
B6_R	ACGACAACAAACAGGAGGAG
C105_F	TGCTGCCTCATCCTTATCC
C105_R	GGTTTTCCCAGTCACGACGTGAACGGAAATGGCTTGGA
C106_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTCTTGACACTTCAGCAAC
C106_R	CGCATAGGCTGGATACAGAA
C107_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTCTGTGAGTGTGCGATGTAC
C107_R	AAGAGGATCGTCAACGAGTC
C109_F	TGAGACGCAGGTTCAAAGATAC
C109_R	GGTTTTCCCAGTCACGACGTGCAATGATGCTTTATGCTA
C115_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTGAACAAACCCACCAACAAC
C115_R	CGATTCAAGATGATGAGGAAG
C202_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTCAATGTGCTTGCGATACTC
C202_R	AGGCATCATCCTCTTTGTC
C208_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTTTGCACCATGAGGAAGATG
C208_R	GCATTCAAGAGCAACACTGG

Ime začetnika	Nukleotidno zaporedje 5' - 3'
C210_F	ATTCACCAAGACAGTCACATG
C210_R	GGTTTTCCCAGTCACGACGTAAGAGCGAATGACGTTGTAG
C214_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTTGTCCTCCTCTTCGTC
C214_R	GGAAAGGTATGGTTGATTCC
C4_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTCGCCAGGCATAAGATTTAA
C4_R	GCCATGACCAAGATCAATG
c4F	GGACGCCAGGCATAAGATT
c4R	GGTTTTCCCAGTCACGACGTGAAAGCAGCAGAGCAAGG
C6_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTACCACAGATTGGCTTGAAAG
C6_R	GGAGAAGATGAACTTGATGAGG
C7_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTATGATGCGTGAATGATACTTC
C7_R	CAGCAGAACAAGGATTGATAG
C8_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTATGGAGCAGCGGAATTTTTTA
C8_R	CGAGGATGATGATGAGAGCA
D101F	GCTTCAACGGCTCACATAG
D101R	GGTTTTCCCAGTCACGACGTGTCGGCTCCATAAATCTG
D4_F	GGTTTTCCCAGTCACGACGTCTCGGTGTTACACGCTAAAAC
D4_R	TCCTTATTTGGGTGCTAGAGG
M13 labeled	GGTTTTCCCAGTCACGACGT

V tej preglednici imajo začetniki za vsak lokus dodano M13 zaporedje, da smo jih lahko testirali s tailing protokolom. Majhna črka v imenu začetnika pomeni, da smo za isti lokus oblikovali še en par začetnikov. S sivo so označeni začetniki, s katerimi PCR reakcija ni uspela.

Priloga C: Podatki o izbranih mikrosatelitskih lokusih

Lokus	Motiv	Nukleotidno zaporedje začetnega oligonukleotida (5'-3')
A2**	(GT) ₁₅ G(GT) ₃	F: CCCATGCACTTACCGTTG R: CACTTCTCCGCAACTTCG
A108**	(CA) ₅ AA(CA) ₇	F: TCCGACTCTAATCTTCTCGC R: CAGAAAACGCACATTTACCAC
A110	(GT) ₁₀	F: CGAATGCCATAAGTGTGTTTG R: TCGATCCATTTTCGTAACAATTC
A11**	(CA) ₁₁	F: GCAGCAGGCTAAAAATTG R: ACACGGAAGCGTTCATGC
A123**	(CA) ₈ TATA(CA) ₆ (CA) ₇	F: TTCCGTGCATGTACTTCG R: TTTCCCTGTAACGAGTGCC
A129**	(CA) ₅(CA) ₁₁	F: GACGACAGTCTGGCAGAAAG R: TCCCTGTATGTGTGTGCATG
A138**	(CA) ₈ CTA (CA) ₅	F: CTTCGGAAAGTTTGAGACTG R: GAACAGGTGTGTGTGTGTATGT
C106 [#]	(CAG(CAT) ₃ CTTCAT) ₄	F: GGTTTTCCCAGTCACGACGTCCTTGGACACTTCAGCAAC R: CGCATAGGCTGGATACAGAA
A105**	(CA) ₁₃	F: CTCGAAAACACTGGTGTCTT R: AAATGAGGCGCTGGTTATAG
A133	(CA) ₁₁	F: GGTTTTCCCAGTCACGACGTGGGATGACGATGATTTGG R: TTCCTTTTATTTACACGCAGTG
A111 [#]	(CA) ₅ CG(CA) ₅ CG(CA) ₆	F: CGAAAAACAAGTTTCCTAAACG R: GGTTTTCCCAGTCACGACGTTTCCGTCATCATTTCATCAG
A9	(GT) ₁₂	F: TGCACACGAATCCATCCA R: GGTTTTCCCAGTCACGACGTGGCCTTCAAATAACCTCAC
A12	(CA) ₁₂	F: GGCACATGAAGCGAAGAA R: GGTTTTCCCAGTCACGACGTGCCGTGACGTTTATCTCCA
A104	(GT) ₁₁	F: CATCAGTGGCACCTCGTG R: GGTTTTCCCAGTCACGACGTTGGCCTTCAAATAACCTCA
A106	(GT) ₁₅ G(GT) ₃	F: AGGGGAAAGAGCGAGTGAA R: CGCTGGAAAATGCTCTCAA
A227	(AC) ₂₀ AT(AC) ₅	F: GGAAGGAAGGTCTTATTTAGGC R: TGAAGTTGAGAGTCCCTGATA
A229	(AC) ₇₄	F: GACCTGTACCAACGCACCTA R: CTGCCGAATTTAAGCCTCTC
A114	(AC) ₆ (TACA) ₂ (AC) ₅	F: AACGCACATAAACATACACAGC R: TCTCCCTCTCCCTTGGTC
A234	(AC) ₁₈ CG(AC) ₁₈	F: CTACGCATTCTCCAAATTGTC R: CTTACACCTGCCCATGACTAC
A236	(AC) ₆ CT(AC) ₁₀	F: GCAGTTTGTGCTCTACACG R: GCAGCCACGAATAAATCAT
C6	(TCA) ₄ TCG(TCA) ₄	F: ACCACAGATTGGCTTGAAAG R: GGAGAAGATGAACTTGATGAGG
A262	(GT) ₈ GA(GT) ₅	F: CATTATCCAATGAGCAGAAGAC CGTCGCTACGAGAGTGTATA
C7	(CAT) ₈	F: GGTTTTCCCAGTCACGACGTATGATGCGTGAATGATACTTC R: CAGCAGAACAAGGATTGATAG
B6	(GTT) ₆	F: GGTTTTCCCAGTCACGACGTGACAGGACGCCTTTTATCAC R: ACGACAACAACAGGAGGAG
A129a	(CA) ₆	F: GGTTTTCCCAGTCACGACGTCGCACCCATACATACTCAC R: TTAGCCATAAAGGTCCCTCAC

Priloga D: Rezultati populacijsko genetskih analiz (testi Hardy-Weinbergovega ravnovesja, vezavno neravnovesje in Garza-Williamsonov indeks)

lokus	št osebkov	PR	RR	ZJ	NJ	LOG	KAT	COL
		78	93	34	49	13	12	30
a2	Na	4	7	3	9	6	5	1
	Ho	0.064	0.398	0.088	0.538	0.667	0.667	/
	He	0.063	0.441	0.086	0.549	0.833	0.674	/
	P	1	0.448	1	0.066	0.052	0.939	/
A11	Na	1	5	2	3	2	4	1
	Ho	/	0.656	0.500	0.404	0.154	0.500	/
	He	/	0.663	0.454	0.383	0.148	0.431	/
	P	/	0.915	0.705	0.208	1	1	/
A108	Na	8	3	3	7	5	5	2
	Ho	0.538	0.581	0.088	0.596	0.538	0.417	0.033
	He	0.583	0.552	0.140	0.666	0.698	0.725	0.033
	P	0.222	0.874	0.146	0.171	0.309	0.005	1
A123	Na	5	6	5	9	5	6	2
	Ho	0.167	0.441	0.676	0.635	0.769	0.417	0.367
	He	0.246	0.448	0.586	0.767	0.729	0.496	0.381
	P	0.002*	0.390	0.547	0.003*	0.356	0.697	1
A129	Na	4	4	3	4	2	2	3
	Ho	0.474	0.065	0.088	0.269	0.462	0.333	0.167
	He	0.522	0.063	0.086	0.244	0.443	0.290	0.228
	P	0.713	1	1	1	1	1	0.296
A138	Na	2	4	2	2	1	4	2
	Ho	0.038	0.402	0.029	0.019	/	0.250	0.200
	He	0.038	0.395	0.029	0.019	/	0.239	0.183
	P	1	0.860	1	1	/	1	1
A9	Na	2	7	1	4	3	5	2
	Ho	0.026	0.376	/	0.422	0.769	0.727	0.167
	He	0.025	0.567	/	0.416	0.655	0.706	0.223
	P	1	0*	/	0.233	0.154	0.553	0.299
A12	Na	6	10	3	3	6	4	4
	Ho	0.436	0.591	0.500	0.620	0.692	0.250	0.375
	He	0.456	0.756	0.481	0.638	0.714	0.569	0.329
	P	0.00681	0.00022*	0.500	0.042 [#]	0.038 [#]	0.01352	1
A104	Na	2	8	2	4	4	5	3
	Ho	0.026	0.527	0.000	0.360	0.769	0.667	0.167
	He	0.025	0.630	0.163	0.477	0.680	0.670	0.215
	P	1	0.00042[#]	0*	0.00016[#]	0.367	0.393	0.327

lokus	št oseb	PR	RR	ZJ	NJ	LOG	KAT	COL
		78	93	34	49	13	12	30
A234	Na	2	4	2	5	3	1	2
	Ho	0.013	0.652	0.059	0.333	0.154	/	0.267
	He	0.013	0.648	0.058	0.315	0.551	/	0.282
	P	1	0.536	1	0.71759	0.003*	/	1
C6	Na	2	3	1	3	2	3	3
	Ho	0.013	0.344	/	0.400	0.538	0.417	0.292
	He	0.013	0.354	/	0.384	0.409	0.489	0.297
	P	1	0.820	/	0.336	0.499	0.464	0.502
A236	Na	2	2	1	2	2	2	3
	Ho	0.013	0.036	/	0.591	0.308	0.250	0.167
	He	0.013	0.035	/	0.496	0.271	0.533	0.158
	P	1	1	/	0.233	1	0.199	1
A262	Na	5	2	1	2	2	1	1
	Ho	0.269	0.000	/	0.000	0.000	/	/
	He	0.249	0.319	/	0.489	0.271	/	/
	P	0.225	0*	/	0*	0.005*	/	/
A111	Na	1	3	1	1	2	2	2
	Ho	/	0.516	/	/	0.154	0.083	0.375
	He	/	0.505	/	/	0.148	0.228	0.361
	P	/	0.911	/	/	1	0.131	1
C106	Na	4	4	2	3	2	3	2
	Ho	0.038	0.097	0.029	0.600	0.077	0.667	0.125
	He	0.038	0.093	0.029	0.555	0.323	0.518	0.120
	P	1	1	1	0.564	0.027*	0.740	1
A133	Na	5	6	4	2	4	2	2
	Ho	0.628	0.462	0.471	0.520	0.231	0.400	0.067
	He	0.710	0.505	0.588	0.504	0.286	0.505	0.066
	P	0.044	0.890	0.177	1	0.233	0.574	1
A114	Na	8	1	1	3	3	2	1
	Ho	0.231	/	/	0.282	0.429	0.083	/
	He	0.749	/	/	0.429	0.385	0.228	/
	P	0*	/	/	0.041*	1	0.13	/
A229	Na	32	23	13	14	7	9	4
	Ho	0.872	0.950	0.917	0.111	0.846	0.091	0.586
	He	0.928	0.936	0.895	0.888	0.763	0.853	0.690
	P	0.241	0.044#	0.016#	0*	0.22	0	0.673
B6	Na	1	2	1	1	1	1	2
	Ho	/	0.012	/	/	/	/	0.034
	He	/	0.012	/	/	/	/	0.100
	P	/	1	/	/	/	/	0.051

lokus	št osebkov	PR	RR	ZJ	NJ	LOG	KAT	COL
		78	93	34	49	13	12	30
A129a	Na	1	2	2	3	2	3	2
	Ho	/	0.024	0.029	0.096	0.462	0.333	0.172
	He	/	0.024	0.029	0.093	0.443	0.301	0.216
	P	/	1	1	1	1	1	0.337
C7	Na	1	5	3	3	2	1	
	Ho	/	0.242	0.265	0.173	0.077	/	
	He	/	0.430	0.442	0.256	0.077	/	
	P	/	0*	0.033*	0.021*	1	/	
A105	Na	8	2	2	2	2	1	
	Ho	0.833	0.022	0.059	0.038	0.308	/	
	He	0.770	0.021	0.058	0.038	0.271	/	
	P	0.666	1	1	1	1	/	
A227	Na	14	21	10	13	10	4	
	Ho	0.859	0.835	0.765	0.237	0.667	0.333	
	He	0.806	0.900	0.801	0.865	0.895	0.773	
	P	0.122	0.201	0.643	0*	0.159*	0.054	
A106	Na	4	7	3	3	5	2	
	Ho	0.064	0.427	0.088	0.024	0.250	0.000	
	He	0.063	0.462	0.086	0.070	0.797	0.440	
	P	1	0.617	1	0.012*	0*	0.021	
A110	Na	2	5	2	3	1	3	1
	Ho	0.013	0.652	0.500	0.078	/	0.300	/
	He	0.013	0.653	0.454	0.147	/	0.279	/
	P	1	0.842	0.707	0.020*	/	1	/

lokus	št osebkov	SOT	PUN
		112	50
a2	Na	9	7
	Ho	0.357	0.500
	He	0.671	0.615
	P	0	0.086
A11	Na	4	3
	Ho	0.411	0.633
	He	0.608	0.668
	P	0	0.743
A108	Na	7	8
	Ho	0.598	0.580
	He	0.734	0.715
	P	0	0.026
A123	Na	8	9
	Ho	0.375	0.388
	He	0.664	0.621
	P	0	0
A129	Na	5	4
	Ho	0.304	0.220
	He	0.361	0.343
	P	0.249	0.032
A138	Na	4	4
	Ho	0.223	0.367
	He	0.304	0.336
	P	0.016	1
A9	Na	6	4
	Ho	0.223	0.380
	He	0.549	0.539
	P	0	0.007
A12	Na	9	9
	Ho	0.554	0.760
	He	0.796	0.813
	P	0	0.017
A104	Na	8	6
	Ho	0.295	0.560
	He	0.557	0.626
	P	0	0.368
A110	Na	4	5
	Ho	0.402	0.620
	He	0.606	0.682
	P	0	0.546

lokus	št osebkov	SOT	PUN
		112	50
A234	Na	5	6
	Ho	0.411	0.500
	He	0.524	0.559
	P	0.002	0.068
C6	Na	2	3
	Ho	0.241	0.420
	He	0.277	0.339
	P	0.176	0.342
A236	Na	2	2
	Ho	0.009	0.200
	He	0.488	0.389
	P	0	0.00132
A262	Na	5	4
	Ho	0.126	0.082
	He	0.519	0.523
	P	0	0
A111	Na	3	3
	Ho	0.288	0.420
	He	0.425	0.460
	P	0.001	0.380
C106	Na	3	3
	Ho	0.081	0.140
	He	0.518	0.315
	P	0	0.00022
A133	Na	7	6
	Ho	0.652	0.500
	He	0.770	0.600
	P	0	0.209
A114	Na	5	6
	Ho	0.043	0.064
	He	0.592	0.502
	P	0	0
A229	Na	32	20
	Ho	0.869	0.960
	He	0.938	0.940
	P	0.005	0.816
B6	Na	1	3
	Ho	/	0.040
	He	/	0.040
	P	/	1

lokus	št osebkov	SOT	PUN
		112	50
A129a	Na	2	1
	Ho	0.027	/
	He	0.027	/
	P	1	/
C7	Na	6	6
	Ho	0.143	0.174
	He	0.354	0.410
	P	0	0
A105	Na	9	7
	Ho	0.286	0.320
	He	0.603	0.412
	P	0	0
A227	Na	22	18
	Ho	0.793	0.860
	He	0.919	0.925
	P	0	0.214
A106	Na	7	6
	Ho	0.321	0.480
	He	0.655	0.579
	P	0	0.406

lokus	št osebkov	CR	RS	TKJ	PP	CP, POS	POSJ	CJ	PJ
		30	30	44	72	24	32	25	31
A2	Na	1	1	2	2	2	2	4	4
	Ho	/	/	0.023	0.028	0.000	0.000	0.080	0.040
	He	/	/	0.023	0.028	0.418	0.347	0.451	0.406
	P	/	/	1	1	0*	0*	0*	0*
A11	Na	5	6	5	4	5	5	5	5
	Ho	0.367	0.567	0.302	0.361	0.217	0.033	0.120	0.207
	He	0.354	0.491	0.373	0.384	0.614	0.721	0.771	0.690
	P	0.751	0.829	0.161	0.232	0*	0*	0*	0*
A108	Na	7	8	6	9	5	5	4	5
	Ho	0.174	0.533	0.605	0.239	0.261	0.280	0.400	0.200
	He	0.722	0.789	0.721	0.561	0.637	0.724	0.688	0.676
	P	0*	0.004*	0.314	0*	0*	0*	0.009*	0*
A123	Na	2	3	2	3	5	4	3	4
	Ho	0.067	0.172	0.136	0.086	0.174	0.032	0.120	0.065
	He	0.066	0.164	0.271	0.256	0.680	0.637	0.318	0.467
	P	1	1	0.005*	0*	0*	0*	0.001*	0*
A138	Na	4	3	4	3	2	3	4	4
	Ho	0.296	0.438	0.737	0.236	0.462	0.368	0.316	0.316
	He	0.680	0.583	0.513	0.321	0.369	0.633	0.694	0.627
	P	0*	0.100	0[#]	0.036*	1	0*	0*	0.002*
A9	Na	3	1	1	3	1	3	1	3
	Ho	0.467	/	/	0.127	/	0.069	/	0.067
	He	0.437	/	/	0.518	/	0.249	/	0.352
	P	1	/	/	0*	/	0*	/	0*
A104	Na	7	3	4	4	5	3	2	5
	Ho	0.633	0.600	0.682	0.458	0.273	0.344	0.333	0.267
	He	0.534	0.586	0.674	0.588	0.564	0.580	0.508	0.533
	P	0.668	0.731	0.669	0.1057*	0.003*	0.000	0.186	0.001*
A110	Na	5	5	4	4	3	4	5	4
	Ho	0.367	0.600	0.273	0.264	0.500	0.469	0.640	0.645
	He	0.354	0.501	0.369	0.296	0.550	0.590	0.623	0.650
	P	0.641	0.672	0.156	0.176	0.515	0.021[#]	0.241	0.022
A234	Na	1	1	2	3	4	6	3	6
	Ho	/	/	0.023	0.188	0.458	0.500	0.560	0.516
	He	/	/	0.023	0.174	0.543	0.646	0.561	0.622
	P	/	/	1	1	0.113	0.016*	0.380	0.252
C6	Na	2	2	2	4	3	4	3	3
	Ho	0.200	0.067	0.209	0.225	0.958	0.969	0.760	0.871
	He	0.235	0.066	0.226	0.268	0.568	0.646	0.667	0.639
	P	0.415	1	0.518	0[#]	0[#]	0[#]	0[#]	0[#]

lokus	št osebkov	CR	RS	TKJ	PP	CP, POS	POSJ	CJ	PJ
		30	30	44	72	24	32	25	31
A262	Na	5	3	2	6	3	3	3	3
	Ho	0.167	0.067	0.023	0.361	0.208	0.281	0.125	0.167
	He	0.328	0.066	0.023	0.647	0.680	0.522	0.487	0.474
	P	0.0028*	1	1	0*	0*	0.0065*	0*	0*
A111	Na	1	1	1	2	2	2	2	2
	Ho	/	/	/	0.014	0.292	0.281	0.440	0.467
	He	/	/	/	0.014	0.254	0.289	0.429	0.499
	P	/	/	/	1	1	1	1	1
C106	Na	1	1	2	3	3	2	2	1
	Ho	/	/	0.071	0.157	0.000	0.083	0.053	/
	He	/	/	0.070	0.365	0.456	0.496	0.149	/
	P	/	/	1	0*	0*	0*	0.082	/
A236	Na	2	2	3	2				
	Ho	0.000	0.000	0.023	0.000				
	He	0.066	0.066	0.130	0.057				
	P	0.017#	0.01674	0*	0*				
A129	Na	1	1	1	1				
	Ho	/	/	/	/				
	He	/	/	/	/				
	P	/	/	/	/				
A12	Na	3	2	2	5				
	Ho	0.100	0.067	0.068	0.044				
	He	0.186	0.127	0.067	0.167				
	P	0.01361#	0.10147	1	0*				

*analiza z Microchecker prisotni nični aleli # analiza z Microchecker nični aleli niso prisotni

Na – število alelov, Ho – opažena heterozgotnost, He – pričakovana heterozgotnost

Vezavno neravnovesje PLANINSKA JAMA - SOTOČJE

	A2	A11	A108	A123	A129	A138	A105	A9	A12	A133	A104	A110	A234	A227	A106	A114	C6	A236	A229	A262	A111	C106	B6	A129a	C7
A2		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-	-	X
A11	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-	-	X
A108	X	X		X	X	x	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-	-	X
A123	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-	-	X
A129	X	X	X	X		x	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	x	X	-	X	X	X	-	-	X
A138	X	X	x	X	x		X	X	X	X	X	X	x	-	X	X	x	X	-	x	x	X	-	X	-
A105	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-	-	X
A9	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-	-	X
A12	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-	-	X
A133	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-	-	X
A104	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	x	X	X	X	X	X	-	x	X
A110	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	x	X	X	X	X	X	-	-	X
A234	X	X	X	X	X	x	X	X	X	X	X	X		X	X	X	x	X	x	X	X	X	-	-	X
A227	X	X	X	X	X	-	X	X	X	X	X	X	X		X	X	x	X	-	X	X	X	-	-	X
A106	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	-	-	X
A114	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	-	-	X
C6	X	X	X	X	x	x	X	X	X	X	x	x	x	x	X	X		X	-	x	X	X	-	-	x
A236	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	-	-	X
A229	X	X	X	X	-	-	X	X	X	X	X	X	x	-	X	X	-	X		X	x	X	-	-	-
A262	X	X	X	X	X	x	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	x	X	X		X	X	-	-	X
A111	X	X	X	X	X	x	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	x	X		X	-	x
C106	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		-	X
B6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-
A129a	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
C7	X	X	X	X	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	x	X	-	X	x	X	-	-	

Vezavno neravnovesje PLANINSKA JAMA - UNICA

	A2	A11	A108	A123	A129	A138	A105	A9	A12	A133	A104	A110	A234	A227	A106	A114	C6	A236	A229	A262	A111	C106	B6	A129a	C7
A2		X	X	X	X	-	X	X	X	x	X	x	x	x	x	x	-	x	-	-	x	X	-	-	-
A11	X		x	x	-	-	x	-	X	-	x	X	x	-	x	-	-	X	-	-	-	X	-	-	-
A108	X	x		X	-	-	x	-	x	-	X	-	-	-	x	x	x	x	x	-	-	x	-	-	-
A123	X	x	X		x	x	X	x	X	x	x	x	-	-	X	x	-	X	-	x	-	X	-	-	-
A129	X	-	-	x		-	x	-	-	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	-	-	x	-	-	-
A138	-	-	-	x	-		x	-	-	-	x	-	-	-	-	x	-	X	-	-	-	x	-	-	-
A105	X	x	x	X	x	x		-	X	x	-	-	-	x	X	X	-	X	-	-	x	X	-	-	-
A9	X	-	-	x	-	-	-		x	-	X	-	-	x	X	-	-	x	-	-	-	X	-	-	-
A12	X	X	x	X	-	-	X	x		-	X	X	-	-	X	x	x	X	x	-	x	X	-	-	x
A133	x	-	-	x	-	-	x	-	-		-	-	-	-	x	x	-	X	-	-	-	X	-	-	x
A104	X	x	x	X	-	x	-	X	X	-		x	-	x	X	-	x	x	-	-	x	X	-	-	-
A110	x	X	-	x	-	-	-	-	X	-	x		-	x	X	-	-	X	-	-	-	X	-	-	-
A234	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	x	-	-	-	X	-	-	-
A227	x	-	-	-	-	-	x	x	-	-	x	x	-		-	-	-	X	-	-	-	x	-	-	x
A106	x	x	x	X	x	-	X	X	X	x	X	X	-	-		x	-	X	-	x	x	X	-	-	x
A114	x	-	x	x	x	x	X	-	x	x	-	-	-	-	x		-	x	-	-	x	X	-	-	-
C6	-	-	x	-	-	-	-	-	x	-	x	-	-	-	-	-		-	-	-	x	-	-	-	-
A236	x	X	x	X	-	X	X	x	X	X	x	X	x	X	X	x	-		x	x	X	X	-	-	x
A229	-	-	x	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	x		-	-	-	-	-	-
A262	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	x	-		-	x	-	-	X
A111	x	-	-	-	-	-	x	-	x	-	x	-	-	-	x	x	x	X	-	-		x	-	-	x
C106	X	X	x	X	x	x	X	X	X	X	X	X	X	x	X	X	-	X	-	x	x		-	-	-
B6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-
A129a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-
C7	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	x	x	-	-	x	-	X	x	-	-	-	-

Vezavno neravnovesje LOGARČEK

	A2	A11	A108	A123	A129	A138	A105	A9	A12	A133	A104	A110	A234	A227	A106	A114	C6	A236	A229	A262	A111	C106	B6	A129a	C7	
A2	X		X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-
A11	-	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-
A108	X	-	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A123	-	-	-	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	X
A129	-	-	-	-	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-
A138	-	-	-	-	-	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A105	-	-	-	-	-	-	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-
A9	-	-	-	-	-	-	-	X		-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-
A12	-	-	-	-	-	-	-	-	X		-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-
A133	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A104	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	X		-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-
A110	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A234	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A227	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A106	X	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X		-	-	-	X	-	-	-	-	-	-
A114	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-
C6	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	X		-	-	-	-	-	-	-	-
A236	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	X		-	-	-	-	-	-	-
A229	X	X	-	X	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	X	X		-	-	-	-	-	-
A262	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	X		-	-	-	-	-
A111	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X		-	-	-	-
C106	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	X		-	-	X
B6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X		-	-
A129a	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X		-
C7	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	X	

Vezavno neravnovesje CERKNIŠKO JEZERO

	A2	A11	A108	A123	A129	A138	A9	A12	A104	A110	A234	C6	A236	A262	A111	C106
A2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A11	-		-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-
A108	-	-		-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A123	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A129	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A138	-	-	x	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A9	-	-	-	-	-	-		-	X	-	-	x	-	-	-	-
A12	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-
A104	-	-	-	-	-	-	x	-		-	-	-	-	-	-	-
A110	-	X	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-
A234	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-
C6	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-		-	-	-	-
A236	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-
A262	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-
A111	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
C106	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Vezavno neravnovesje TKALCA JAMA

	A2	A11	A108	A123	A129	A138	A9	A12	A104	A110	A234	C6	A236	A262	A111	C106
A2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A11	-		-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	x	-	-
A108	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	x
A123	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A129	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A138	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A9	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
A12	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-
A104	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
A110	-	X	-	-	-	-	-	-	-		-	-	x	x	-	-
A234	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-
C6	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	x
A236	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-		-	-	-
A262	-	x	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-		-	-
A111	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
C106	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	

Vezavno neravnovesje POSTOJNA

	A2	A11	A108	A123	A138	A9	A104	A110	A234	C6	A262	A111	C106
A2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A11	-	-	x	X	-	-	x	X	-	-	x	-	-
A108	-	x	-	x	-	-	x	x	-	-	-	-	-
A123	-	X	x	-	-	-	x	-	-	-	x	-	-
A138	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A104	-	x	x	x	-	-	-	-	x	-	-	-	-
A110	-	X	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A234	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-
C6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A262	-	x	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A111	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C106	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Vezavno neravnovesje POSTOJNSKA JAMA

	A2	A11	A108	A123	A138	A9	A104	A110	A234	C6	A262	A111	C106
A2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A11	-	-	X	x	-	X	-	X	-	-	-	-	x
A108	-	X	-	-	x	x	-	x	-	-	-	-	-
A123	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-
A138	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A9	-	X	x	-	-	-	X	-	-	-	-	-	x
A104	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-
A110	-	X	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A234	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A262	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A111	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x
C106	-	x	-	-	-	x	-	-	-	-	-	x	-

Vezavno neravnovesje ČRNA JAMA

	A2	A11	A108	A123	A138	A9	A104	A110	A234	C6	A262	A111	C106
A2		-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	X
A11	-		-	x	-	-	-	X	-	x	-	-	x
A108	-	-		-	x	-	-	-	-	-	-	-	-
A123	x	x	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
A138	-	-	x	-		-	-	-	-	x	-	-	-
A9	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
A104	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-
A110	-	X	-	-	-	-	-		-	x	-	-	-
A234	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-
C6	-	x	-	-	x	-	-	x	-		-	-	-
A262	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	x
A111	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
C106	X	x	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	

Vezavno neravnovesje PIVKA JAMA

	A2	A11	A108	A123	A138	A9	A104	A110	A234	C6	A262	A111	C106
A2		x	x	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-
A11	x		x	-	x	-	-	X	x	-	x	-	-
A108	x	x		X	x	-	-	-	-	-	-	-	-
A123	-	-	X		-	-	-	-	-	-	-	x	-
A138	-	x	x	-		-	-	-	x	-	-	-	-
A9	x	-	-	-	-		X	-	-	-	x	-	-
A104	-	-	-	-	-	X		-	-	-	x	x	-
A110	-	X	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-
A234	-	x	-	-	x	-	-	-		-	-	-	-
C6	-	-	-	-	-	-	-	-	x		-	x	-
A262	-	x	-	-	-	x	x	-	-	-		-	-
A111	-	-	-	x	-	-	x	-	-	x	-		-
C106	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

statistično značilno po Holm-Bonferroni metodi je označeno z odebeljeno pisavo

Garza – Williamsonov index

lokus	PR		RR		ZJ		LOG		KAT		NJ		COL	
	RA	GW	RA	GW	RA	GW	RA	GW	RA	GW	RA	GW	RA	GW
a2	6	0.57	11	0.58	3	0.75	21	0.273	26	0.19	26	0.33	0	1
A11	0	1	5	0.83	1	1	1	1	5	0.67	2	1.00	0	1
A108	10	0.73	3	0.75	3	0.75	6	0.71	5	0.83	11	0.58	1	1
A123	10	0.45	6	0.86	7	0.63	10	0.45	16	0.35	16	0.53	1	1
A129	4	0.80	5	0.67	5	0.50	5	0.33	5	0.33	6	0.57	8	0.33
A138	5	0.33	3	1	2	0.67	0	1	6	0.57	1	1	1	1
A105	15	0.50	1	1	1	1	3	0.50	0	1	1	1	/	/
A9	1	1	10	0.64	0	1	8	0.33	5	0.83	4	0.80	1	1
A12	6	0.86	12	0.77	2	1	5	1.00	5	0.67	2	1.00	3	1
A133	9	0.50	6	0.86	3	1	6	0.57	2	0.67	2	0.67	1	1
A104	1	1	*		1	1	9	0.40	5	0.83	4	0.80	2	1
A110	5	0.33	5	0.83	3	0.50	0	1.00	6	0.43	3	0.75	0	1
a234	10	0.18	4	0.80	5	0.33	4	0.60	0	1	6	0.71	1	1
a227	19	0.70	23	0.88	14	0.67	23	0.42	8	0.44	19	0.65	/	/
a106	6	0.57	11	0.58	3	0.75	13	0.36	1	1	3	0.75	/	/
C6	2	0.67	3	0.75	0	1	2	0.67	2	1	2	1	7	0.38
A236	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	3	0.75
A229	65	0.49	36	0.62	13	0.93	27	0.25	56	0.16	63	0.22	3	1
A262	7	0.63	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1
B6	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1
A129a	0	1	1	1	1	1	2	0.67	3	0.75	3	0.75		*
C7	0	1	7	0.63	4	0.6	1	1	0	1	5	0.5	/	/
A111	*		*		*		*		*		*		*	
A114	*		*		*		*		*		*		*	
C106	*		*		*		*		*		*		*	

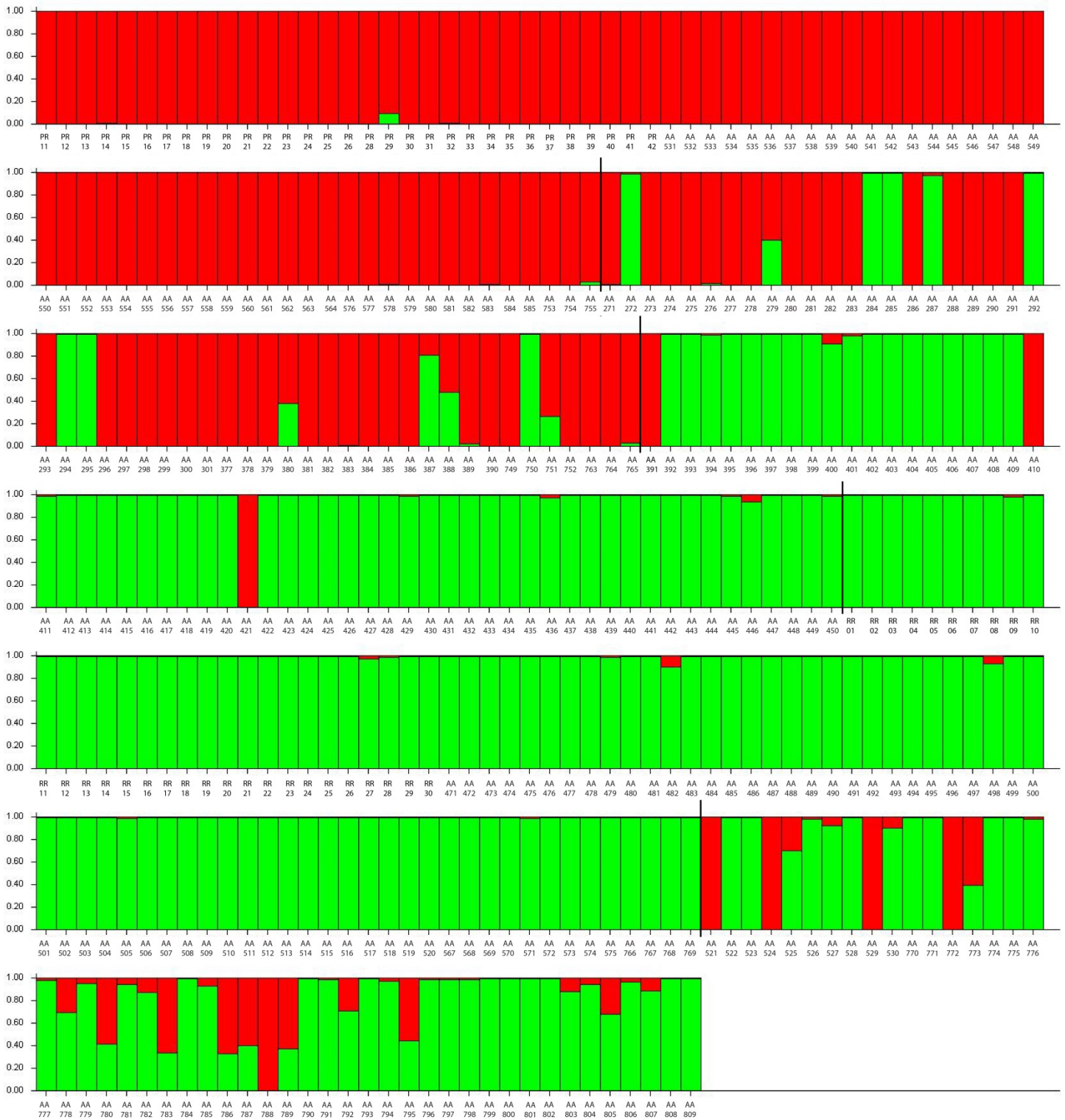
RA- razpon alelov ((dolžina najdaljšega alela - dolžina najkrajšega)/dolžina motiva); GW – Garza Williamsonov indeks; * ne sledi modelu SMM; / - ni podatkov

lokus	PP		RS		CR		TK		CP		POSJ		CJ		PJ	
	RA	GW	RA	GW	RA	GW	RA	GW	RA	GW	RA	GW	RA	GW	RA	GW
A108	14	0.60	8	0.89	14	0.47	8	0.67	7	0.63	10	0.45	9	0.40	10	0.45
A123	18	0.16	18	0.16	12	0.15	6	0.29	22	0.22	22	0.17	10	0.27	22	0.17
A129	0	1	0	1	0	1	0	1	/	/	/	/	/	/	/	/
A138	3	0.75	3	0.75	3	1	4	0.80	3	0.50	3	0.75	8	0.44	8	0.44
A12	10	0.45	1	1	3	0.75	1	1	/	/	/	/	/	/	/	/
A104	11	0.33	10	0.27	15	0.44	11	0.33	11	0.42	9	0.30	8	0.22	13	0.36
A110	9	0.40	17	0.28	17	0.28	17	0.22	8	0.33	8	0.44	8	0.56	8	0.44
a234	4	0.60	0	1	0	1	4	0.40	4	0.80	10	0.55	4	0.60	6	0.86
C6	3	1	1	1	1	1	1	1	2	1	3	1	2	1	2	1
A236	3	0.50	3	0.50	1	1	5	0.50	/	/	/	/	/	/	/	/
A262	10	0.55	7	0.38	9	0.50	13	0.14	3	0.75	3	0.75	3	0.75	3	0.75
A2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
A11	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
A9	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
A111	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
C106	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

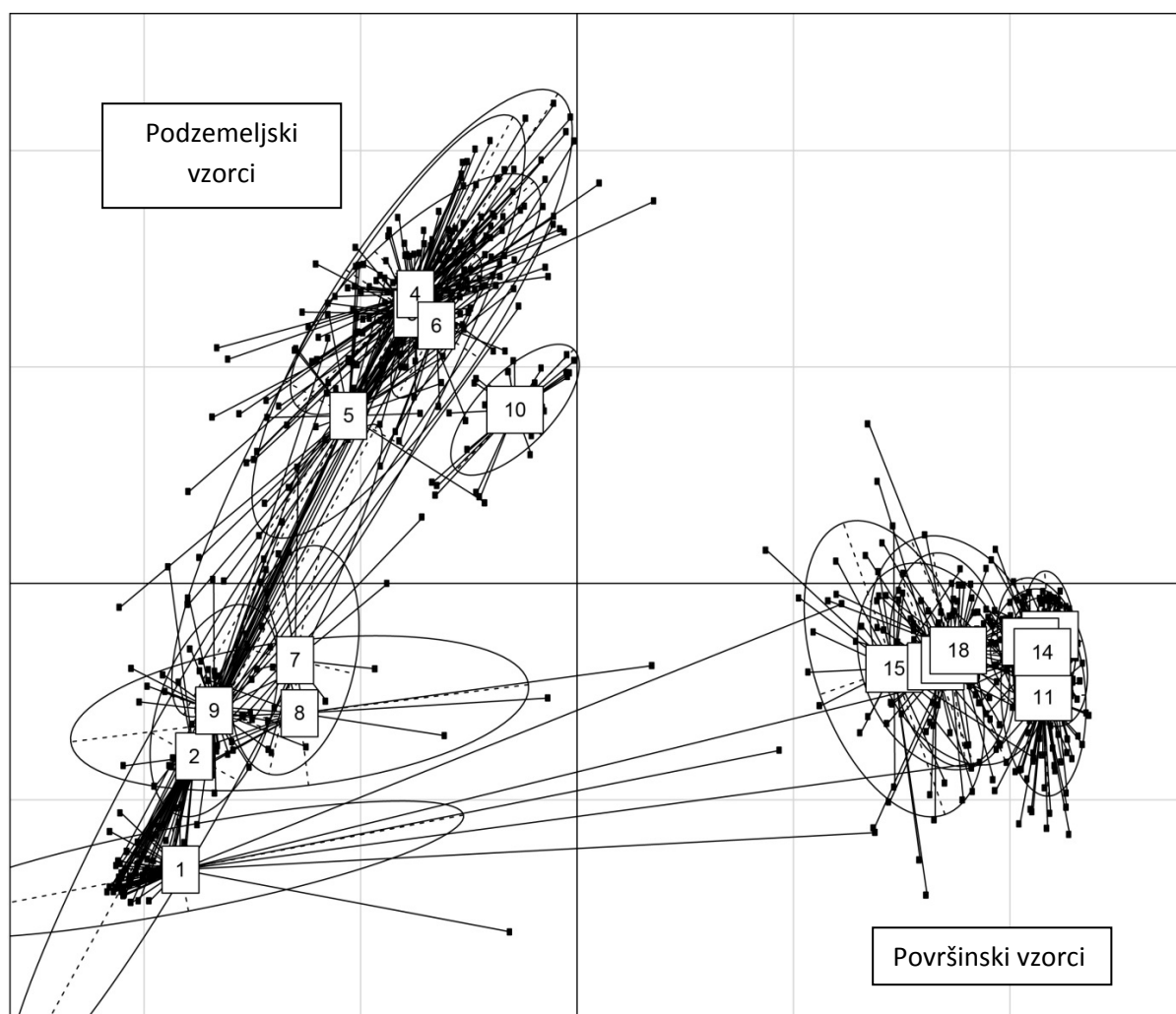
RA- razpon alelov ((dolžina najdaljšega alela - dolžina najkrajšega)/dolžina motiva); GW – Garza Williamsonov indeks; * ne sledi modelu SMM; / - ni podatkov

Priloga E: Rezultati dodelitvenega testa za vzorce iz Planinske jame

(Structure, 25 lokusov, K=2).

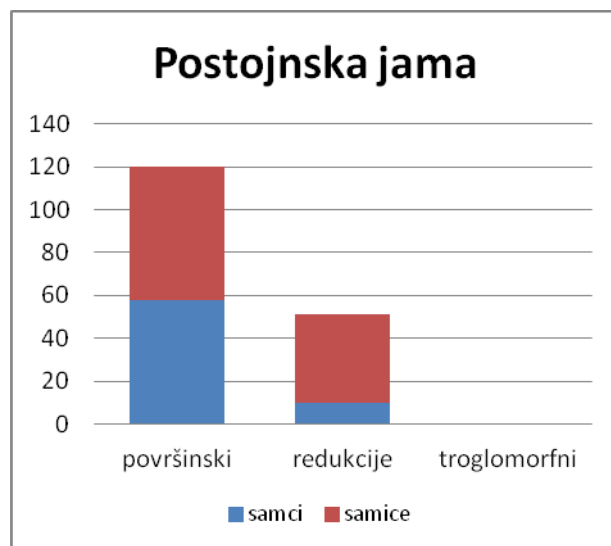
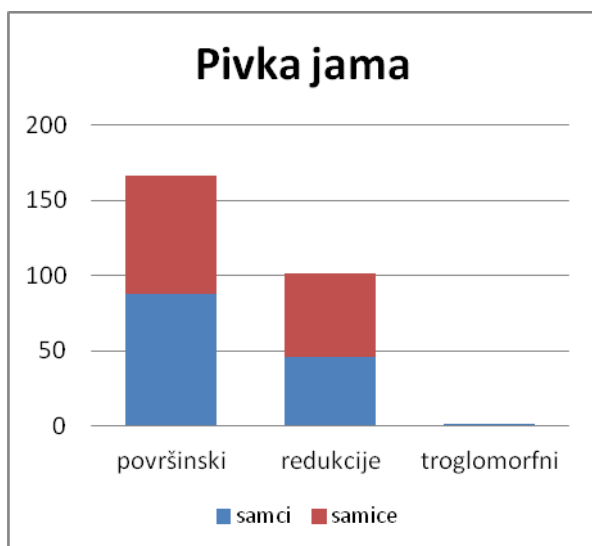
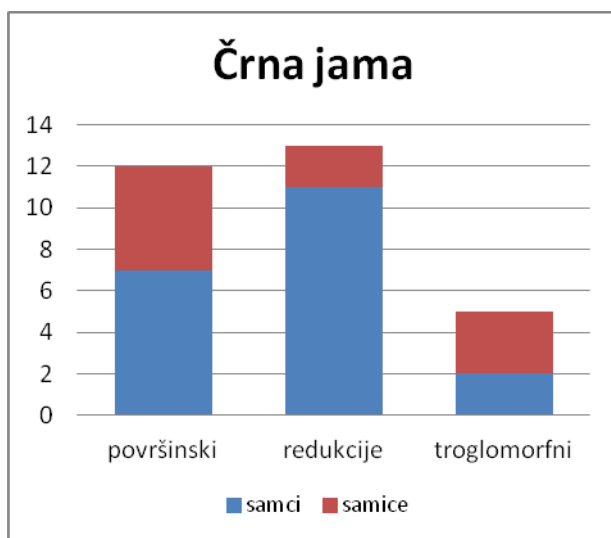
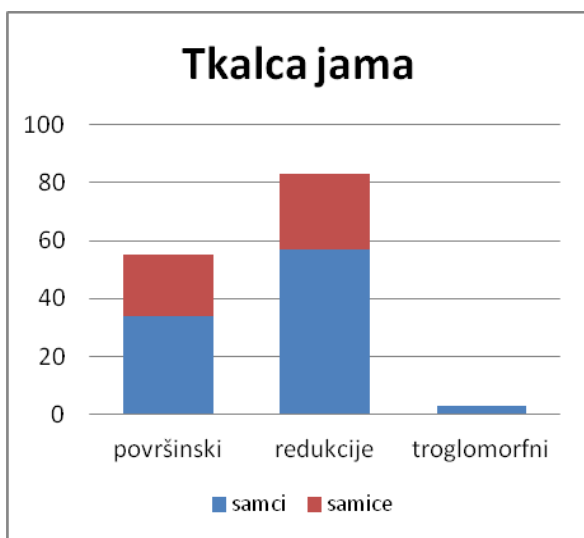


Priloga F: Rezultat analize deleža skupnih alelov na vseh vzorcih



Slika : Delež skupnih alelov (13 lokusov), prikazan z evklidskimi razdaljami. Elipse označujejo 95% interval zaupanja in označujejo posamezno populacijo. 1 – Pivški rokav, 2 – Sotočje 1, 3 – Sotočje 2, 4 – Rakov rokav, 5 – Planinska jama Unica, 6 – Zelške jame, 7 – Logarček, 8 – Katavotron, 9 – Najdena jama, 10 – jama Čolniči, 11 – Planinsko polje, 12 – Rakov Škocjan, 13 – Cerknško jezero, 14 – Tkalca jama, 15 – Postojna, 16 – Postojnska jama, 17 – Črna jama, 18 – Pivka jama. V naboru podatkov so tudi troglomorfni osebki nabrani v Črni jami in površinski osebki nabrani v Pivškem rokavu Planinske jame.

Priloga G: Fenotipi vodnih osličkov iz fenotipsko mešanih populacij, razdeljeni po spolu

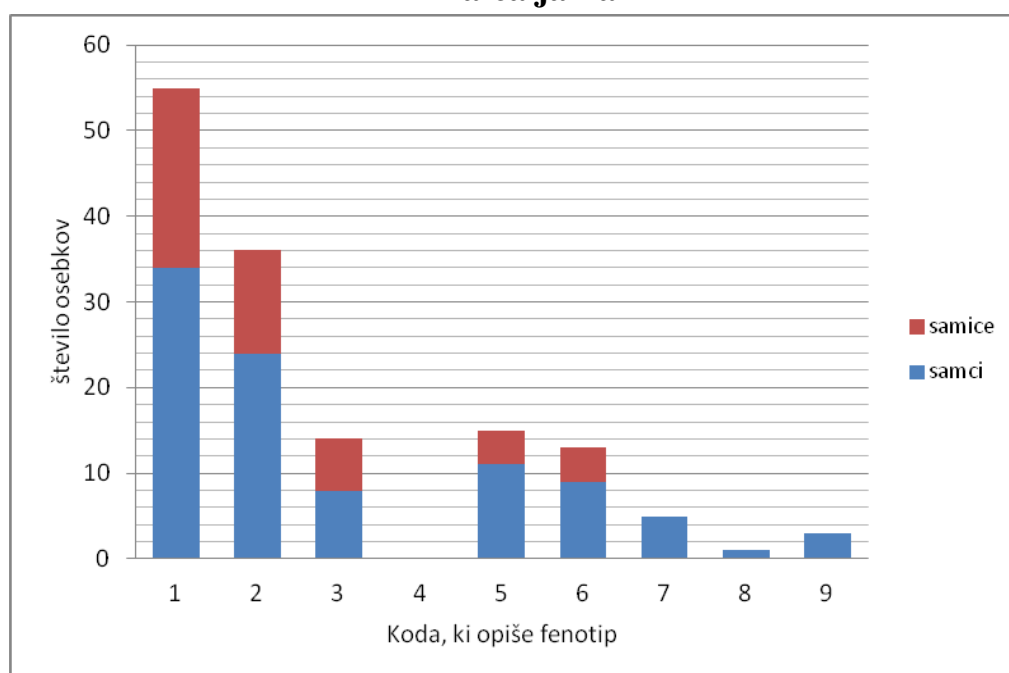


Fenotipi vodnih osličkov iz fenotipsko mešanih populacij razdeljeni v tri glavne razrede, označen je še spol osebkov.

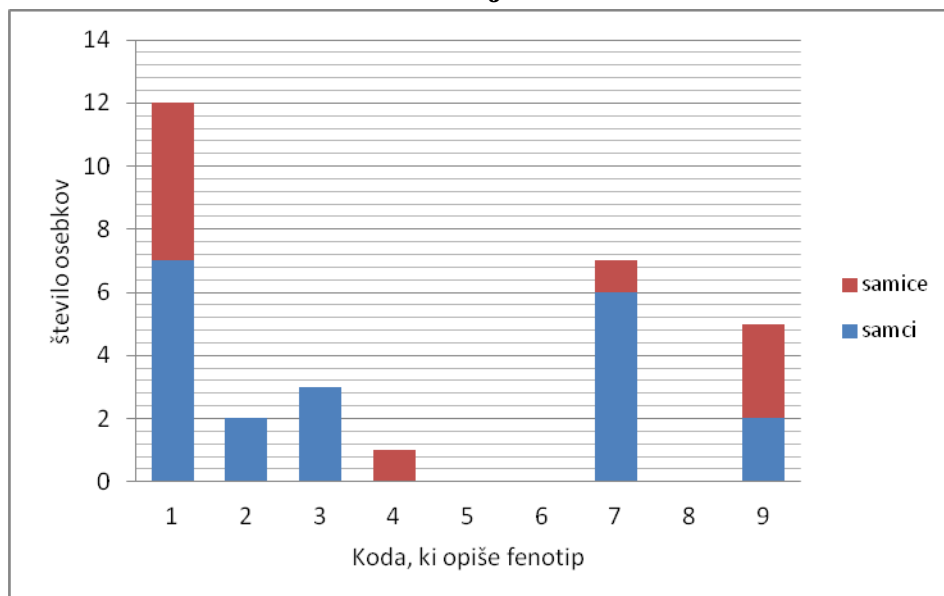
Preglednica: Kombinacija pigmentacije telesa, pigmentacija oči in prisotnost omatidijev ter koda , ki jo opiše.

Koda	Pigmentacija telesa	Pigmentacija oči	omatidiji
1	normalna	normalna	prisotni
2	delno reduciran	normalna	prisotni
3	delno reduciran	delno reduciran	prisotni
4	izrazito reduciran	normalna	prisotni
5	izrazito reduciran	delno reduciran	prisotni
6	izrazito reduciran	izrazito reduciran	prisotni
7	izrazito reduciran	popolnoma reduciran	prisotni
8	popolnoma reduciran	popolnoma reduciran	ostanki
9	popolnoma reduciran	popolnoma reduc	ni

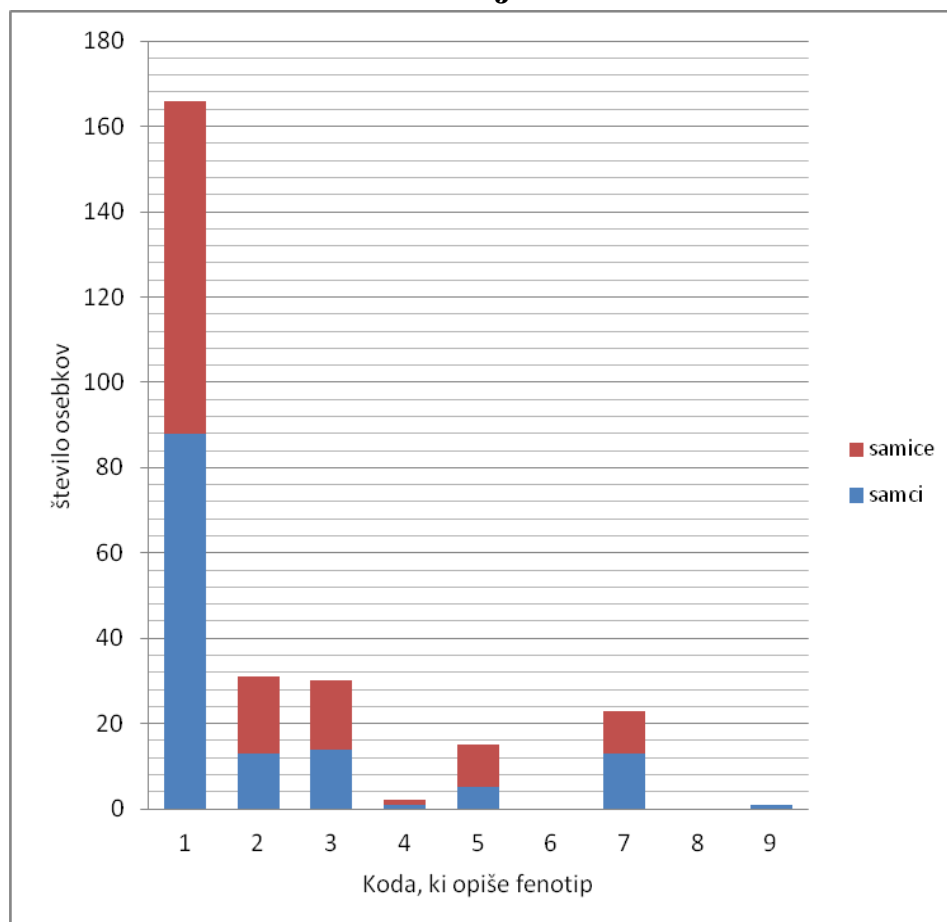
Tkalca jama



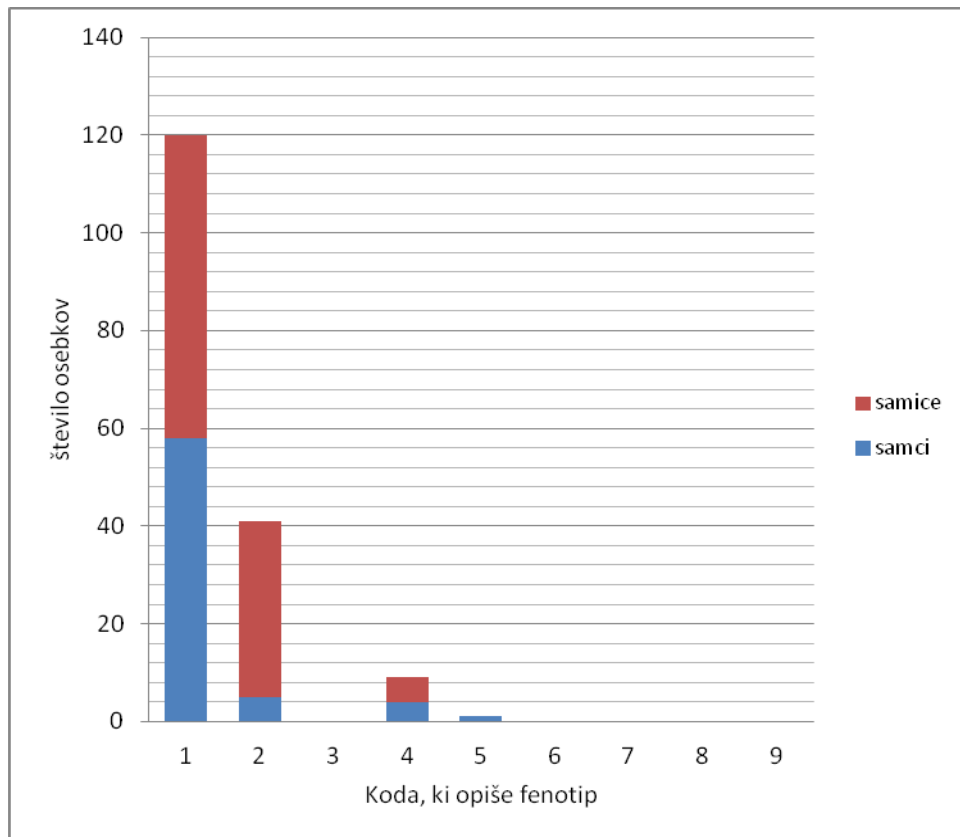
Črna jama



Pivka jama



Postojnska jama



Priloga H: Vavčerske številke vodnih osličkov uporabljenih v disertaciji, vnešene v podatkovno bazo *Subbio database*

Lokaliteta vzorčenja	Koda	Vavčerske številke
Planinska jama – Pivški rokav	PR	AA001-AA006 (PR11-PR16), AA011-AA034 (PR17-PR40), AA131-AA132 (PR41, PR42), AA302-AA306, AA531-AA564, AA576-AA585, AA753-AA755
Planinska jama – Rakov rokav	RR	AA053-AA082 (RR01-RR30), AA471-AA520, AA565-AA575, AA766-AA769
Planinska jama – sotočje 1	SOT1	AA271-AA301, AA377-AA390, AA749-AA752, AA763-AA765
Planinska jama – sotočje 2	SOT2	AA391-AA450
Planinska jama – Unica	PUN	AA521-AA530, AA770-AA809
Planinsko polje	PP, UB, UN	AA083-AA130, AA349-AA376, AA834-AA845
Črna jama	CJ	AA165-AA194
Cerkniško jezero	CR	AA113-AA120, AA195-AA216
Rakov Škocjan	RS	AA307-AA336
Pivka jama	PJ	AA240-AA270
Tkalca jama	TKJ	AA337-AA342, AA586-AA607, AA850-AA865
Škratovka	ŠKR	AA343-AA348
Zelške jame	ZJ	AA608-AA641
Postojnska jama	POSJ	AA642-AA673
Jama Obrh-Čolniči	COL	AA674-AA679, AA682, AA683, AA935-AA957
Logarček	LOG	AA810-AA821, AA824
Katavotron 2	KAT	AA825-AA833
Golobina	GOL	AA866-AA876
Vranja jama	VRJ	AA877-AA879
Najdena jama	NJ	AA880-AA928
Postojna – Črni potok	CP	AA958-AA977
Postojna – Pivka pred vhodom v jamo	POS	AA978-AA981
Lokaliteta vzorčenja	Koda	Vavčerske številke
<i>Romunija</i>		
Nețoi Str #1, Mangalija	NW	AA035-AA046 (ROM1-ROM12), AA175-AA160, AA725-AA738
D. Ana Str #13, Mangalija	AW	AA133-AA144
Movele jama	MC	AA451-AA453
Karaoban jezero	KAL	AA460-AA466, AA701-AA724
Hagieni	HA	AA454-AA459
Mangalija, Turkish Baths	DO	AA145-AA156
Limanu obala	MA	AA161-AA164
Arsa	AR	AA699-AA700
Limanu bridge spring	MD	AA468-AA470, AA739-AA748